

6. Reinert J.F., Kaiser P.E., Seawright J.A. Analysis of the Anopheles (Anopheles) quadrimaculatus complex of sibling species (Diptera: Culicidae) using morphological, cytological, molecular, genetic, biochemical, and ecological techniques in an Integrated approach // J. Am. Mosq. Control Assoc. 1997. Suppl. 13. P. 1–102.
7. Reid J.A., Knight K.L. // Annals of Trop. and Parasitol. 1961. V. 55. No 4. P. 475–488.
8. Денисова З.М. Материалы по изучению вариаций гипопигиев самцов *An. maculipennis atroparvus* и *An. maculipennis sacharovi*. // Мед. паразитология и паразитарные болезни. 1948. Т. 3. № 17. С. 221–227.
9. Денисова З.М. Вариации гипопигиев самцов некоторых подвидов малярийного комара *An. maculipennis* // Энтомологическое обозрение. 1964. Т. 43. № 4. С. 815–822.
10. Шабанова Ю.В., Сибатаев А.К. Сравнительный анализ морфологии имаго малярийных комаров азиатской части территории России // Вестник Томского государственного университета. 2004. Приложение №10. С. 141–144.

Поступила в редакцию 21. 06. 2006

УДК 577.17; 577.12.05

И.Ф. Головацкая, Ю.М. Винникова

## РОЛЬ ГИББЕРЕЛЛИНОВ И БРАССИНОСТЕРОИДОВ В РЕГУЛЯЦИИ РОСТА И РАЗВИТИЯ АРАБИДОПСИСА

Томский государственный университет

Гиббереллины (ГК) являются большой группой фитогормонов с более чем 120 представителями. Однако относительно немногие из них имеют существенную биологическую активность, обладая собственнo гормональной функцией. Физиологическое действие ГК проявляется в стимуляции ростовых процессов за счет усиления растяжения клеток и повышения митотической активности меристематических тканей. ГК ингибируют действие продуктов генов *GAI*, *SPY* и *GAR2*, подавляющих рост растения [1, 2]. Повышение уровня ГК существенно стимулирует удлинение побега, главным образом, за счет увеличения длины междоузлий, в то время как дефицит ГК может определять карликовость растений. ГК участвуют во всех стадиях развития растения [3], однако остается недостаточно изученной роль ГК в процессах формирования генеративных органов и цветения. На многолетних растениях показано, что повышение уровня ГК на стадии детерминации генеративного пути развития меристем подавляет образование генеративных органов. В то же время снижение уровня ГК на более поздних этапах формирования элементов цветка в меристеме так же неблагоприятно сказывается на генеративном развитии. У некоторых розеточных растений обработка ГК индуцирует цветение даже в условиях неблагоприятного светового дня. Это дало основание академику М.Х. Чайлахяну для представления ГК как необходимой части гипотетического гормона цветения флоригена [4].

Брассиностероиды (БР) – группа полигидроксильных стероидов, играющих большую роль в жизни растений. Они вызывают клеточное растяжение, усиливают гравитропизм, задерживают опадание листьев, повышают дифференцировку ксилемы, участвуют в процессах роста пыльцевой трубки, черешков и листьев [5, 6]. Это происходит благодаря регуляции

БР генной экспрессии, АТФ-азной активности и формирования клеточной стенки [6].

БР активны в различных биотестах, специфичных для других гормонов, что позволяет предполагать взаимодействие между ними. Некоторые тесты показывают, что БР и ГК действуют независимо друг от друга, однако имеются данные о синергическом или аддитивном эффекте. БР и ГК могут действовать параллельно в регуляции морфологических аспектов роста в темноте, однако БР опосредуют гиббереллиновый контроль экспрессии генов *CAB2* и *RbcS*. Такая иерархия гормонов подтверждается неспособностью ГК снимать повышенную экспрессию этих генов в выращенных в темноте проростках мутанта *det2* или восстанавливать эффект обработки ингибитором биосинтеза БР [7]. Предполагают также пересечение путей биосинтеза БР и ГК [8]. Экзогенный БР (24-эпибрассинолид) на свету может вызывать увеличение содержания эндогенных ГК и АБК [9]. Менее изучено совместное действие ГК и БР в процессах развития растений.

В связи с этим целью нашей работы явилось изучение роли эндогенных гиббереллинов (ГК<sub>1</sub> и ГК<sub>4</sub>) и экзогенного брассинолида в процессах роста и развития арабидопсиса.

### Методика

В исследованиях использовали растения исходной линии *Ler* и мутанта *ga4-1 Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. экотипа *Landsberg erecta*. Мутант *ga4-1*, полученный на основе *Ler*, относится к типу прорастающих гиббереллиновых полукарликов, то есть для их прорастания не требуется обработка экзогенными ГК, так как мутация затрагивает поздние этапы биосинтеза ГК. У *ga4-1* блокирован процесс образования фер-

мента 3β-гидроксилазы, катализирующей происходящий в цитоплазме процесс превращения неактивных групп ГК в активные ГК [10]. Показано участие этого фермента в превращении ГК<sub>9</sub> и ГК<sub>20</sub> в ГК<sub>4</sub> и ГК<sub>1</sub> [3]. Выращивание проростков *Ler* и *ga4-1* арабидопсиса осуществляли на воде и 10<sup>-9</sup> М растворе brassинолида (БЛ) в темноте и на свету. Источником белого света служили люминесцентные лампы типа ЛД-40. Семидневные проростки фиксировали 40%-м раствором этилового спирта. Длину гипокотилей и корней измеряли при помощи бинокулярной лупы БМ-51-2 (8,75х), длину и ширину черешков и пластинок семядолей – микроскопа «БИОЛАМ» Р2У42 (80х). Для каждого варианта исследовали 25 проростков.

Длительное выращивание растений арабидопсиса проводили в почвенной культуре с однократной обработкой 10<sup>-9</sup> М раствором brassинолида на стадии замачивания семян (опыт) или без нее (контроль).

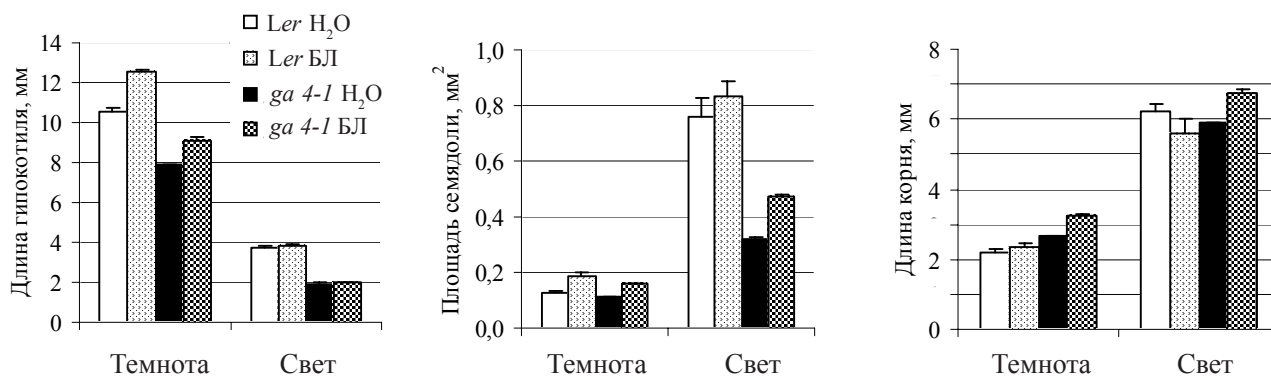


Рис. 1. Ростые параметры 7-дневных проростков *Ler* и *ga4-1*, выросших из необработанных (H<sub>2</sub>O) и обработанных 10<sup>-9</sup> М раствором БЛ семян в темноте и на свету

Сниженный уровень ГК у *ga4-1* частично снимал подавление фотоморфогенеза в темноте, так как проростки мутанта были частично деэтиолированными при росте в темноте и характеризовались отсутствием апикального изгиба, более короткими гипокотилями и длинными корнями (на 26 и 21 % соответственно) по сравнению с диким типом (рис. 1). Однако мутация гена *GA4* обусловила и ингибирование роста семядолей по продольной оси, что не типично для деэтиолированных проростков. Маленькие семядоли мутанта имели укороченные пластинки, укороченные и более широкие черешки (на 23, 15 и 72 % соответственно) относительно *Ler*. Наши данные об уменьшении размеров семядолей *ga4-1* согласуются

Авторы выражают благодарность проф. В.А. Хрипачу (Ин-т биоорганической химии НАН Беларуси) за любезно предоставленный препарат brassинолида.

## Результаты и обсуждение

При выращивании арабидопсиса в темноте и на свету до 7-дневного возраста отметили разный фенотип у проростков двух линий. Этиолированные проростки дикого типа *Ler*, содержащие достаточный уровень активных ГК, имели вытянутые гипокотили со свернутыми семядолями (рис. 1), то есть они развивались строго по программе скотоморфогенеза. Согласно мнению других авторов, ГК играют важную роль в развитии проростков в темноте, способствуя процессам скотоморфогенеза и подавляя фотоморфогенез в темноте через регуляцию светоиндуцируемых генов [7].

с данными об изменении роста семядолей проростков при нарушении гиббереллинового баланса вследствие действия brassинозола, ингибитора биосинтеза ГК [6].

Отмеченные различия ростовых параметров проростков мутанта и исходной линии были связаны с начальным уровнем эндогенных ГК. Исследуемый мутант характеризовался нарушением работы фермента ГК-3β-гидроксилазы (*GA4*), обеспечивающей биосинтез активных ГК на стадии проростков (рис. 2) [11]. Однако прорастание *ga4-1* не требовало экзогенных ГК, так как у зародышей работал другой фермент ГК-3β-гидроксилаза (*GA4H*), что позволило частично обеспечить проростки активными ГК [12].

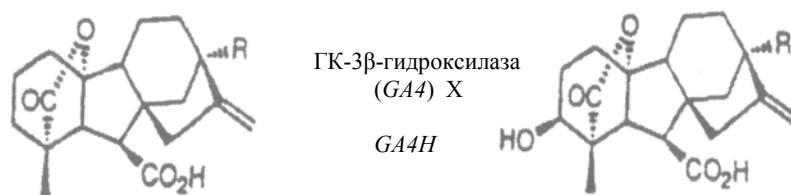


Рис. 2. Блокирование (X) этапа превращения неактивных гиббереллинов ГК<sub>9</sub> и ГК<sub>20</sub> в биологически активные ГК<sub>1</sub> и ГК<sub>4</sub> у мутанта *ga4-1* [9, 10]

Выбранный для исследований мутант изначально содержал меньшее количество активных ГК. В сравнении с исходной линией *Ler*, в побегах *ga4-1* отсутствовали ГК<sub>37</sub>, ГК<sub>36</sub>, ГК<sub>34</sub>, ГК<sub>27</sub>, ГК<sub>13</sub>, ГК<sub>8</sub>, ГК<sub>4</sub> и ГК<sub>1</sub>, но было повышено содержание предшественников активных ГК [1].

Оба гена, кодирующих ферменты из группы ГК-20-оксидаз с 3β-гидроксилазной активностью, отличаются не только временем экспрессии, но и регуляцией. Если биологически активные ГК подавляют уровни транскриптов гена *GA4*, то экспрессия гена *GA4H* не регулируется по принципу обратной связи. Подобный контроль отсутствует и у мутантов с нарушениями ГК-ответа [13].

Выращивание проростков на свету изменило рост обеих линий арабидопсиса. У проростков *Ler* замедлилось растяжение гипокотыля и ускорилось растяжение корня и поверхности семядоли (на 65 %, в 2 и 6 раз соответственно) по отношению к темноте (рис. 1). Недостаток ГК<sub>1/4</sub> у *ga4-1*, вероятно, обуславливал изменение трансдукции или трансляции светового сигнала, так как отмечали отличие ростовых реакций его проростков на действие света по сравнению с исходной линией. Ингибирующий эффект света на рост гипокотыля *ga4-1* увеличивался на 10 %, в то время как стимулирующий эффект при регулировании роста семядоли снижался в 2 раза, чем у *Ler*.

Регуляторная роль света, по-видимому, проявлялась в контроле биосинтеза фитогормонов. Другими авторами показано, что действие света осуществляется через изменение содержания ферментов биосинтеза эндогенных гормонов, в том числе и ГК. Так, в прорастающих семенах на белом свету отмечается высокий уровень *GA4* и *GA4H*. Экспрессию генов *GA4* и *GA4H* у этиолированных проростков вызывают и действием импульса красного света (КС). Уровень мРНК *GA4* резко увеличивается после действия КС (в течение 4 часов), затем после прорастания уменьшается и снова поднимается [11, 14]. Количество мРНК *GA4H* увеличивается постепенно, после действия КС, и достигает максимума через 12 часов. Это позволило предположить, что экспрессию *GA4H* регулирует РНУВ, тогда как экспрессия *GA4* находится под контролем других фитохромов. По нашим данным, в регуляции уровня ГК большую роль играет продолжительность действия и интенсивность КС [15, 16], что может быть связано или с активацией разных фитохромов, или с усилением активности ГК-2-оксидазы, способствующей превращению активных групп ГК в неактивные [14].

Более поздняя активация фермента *GA4H* на свету [14], вероятно, замедляет образование активных форм ГК и может также быть причиной торможения растяжения проростков мутанта *ga4-1*. Кроме того, различия в размерах семядолей у *Ler* и *ga4-1*, возможно, опосредованы не только ростовыми, но и фотосинтетическими процессами, регулируемые эндогенны-

ми ГК. Так, согласно нашим данным [17], содержание *хлорофилла б* в стареющих листьях фасоли зависело от уровня экзогенных ГК.

Поддержание скотоморфогенеза является одной из функций и БЛ, связанной с удлинением гипокотылей [6]. Ранее нами [9] было показано, что действие экзогенного БР (24-эпибрассинолида) на рост арабидопсиса может осуществляться через взаимодействие с эндогенными гормонами. Для выяснения взаимодействия БР и ГК в растении исследовали влияние экзогенного 10<sup>-9</sup>М БЛ на рост проростков с нормальным уровнем ГК и дефектным по содержанию активных групп ГК (см. рис. 1). Влияние БЛ на растяжение гипокотылей обеих линий в темноте было одинаковым (15–18 %), то есть действие БЛ и ГК<sub>1/4</sub> осуществлялось независимо друг от друга. Однако от уровня эндогенных ГК зависел эффект БЛ на рост семядолей. Увеличение площади семядоли *Ler* происходило за счет растяжения пластинки в длину и черешка в продольном и поперечном направлении (на 18, 29 и 45 % соответственно) по сравнению с контролем на воде. Площадь семядоли *ga4-1* изменялась за счет увеличения ширины пластинки и длины черешка (на 54 и 51 % соответственно) и уменьшения ширины черешка (на 37 %).

У линий, различающихся по уровню эндогенных ГК, отмечена разная отзывчивость ростовых реакций на действие экзогенного БЛ. Эффект экзогенного гормона на рост семядоли проявился сильнее у дикого типа в присутствии активных ГК, тогда как чувствительность корня мутанта к БЛ была сильнее, чем у *Ler*, его прирост составил 22 % против 8 % у дикого типа.

Сравнительный анализ роста мутанта (опыт) и дикого типа (контроль) в темноте показал, что площадь семядоли *ga4-1*БЛ не только восстанавливалась до величины дикого типа *Ler* H<sub>2</sub>O, но и превышала ее на 23 %, то есть экзогенный БЛ заменял недостаток активных групп ГК. Однако длина гипокотыля мутанта *ga4-1* БЛ только частично восстанавливалась до размеров дикого типа *Ler* H<sub>2</sub>O, что показывает важность совместного действия ГК и БЛ для роста осевых органов и согласуется с данными [6] об аддитивном влиянии ГК и БЛ на рост этиолированных проростков.

Одновременное действие света и БЛ вызывало аддитивный эффект в увеличении площади семядоли *Ler* и синергический эффект в увеличении площади семядоли и длины корня *ga4-1* (см. рис. 1).

Последствия предпосевной обработки БЛ семян арабидопсиса проявились не только в характере роста проростков, но и вегетативных и репродуктивных органов, а также времени протекания стадий жизненного цикла растений. Эффект БЛ во многом зависел от уровня эндогенных ГК.

В жизненном цикле растений дикого типа и мутанта выделили 6 фаз онтогенеза (рис. 3, ось абсцисс).

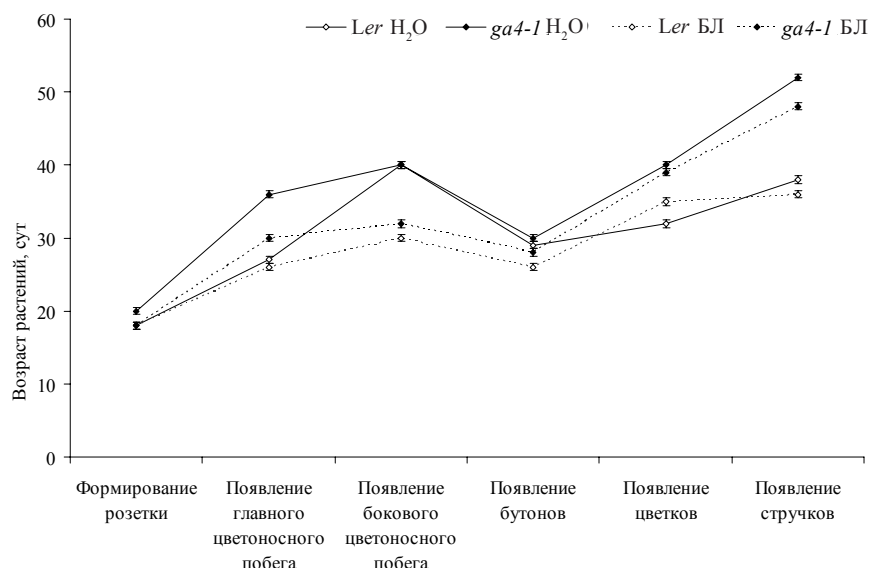


Рис. 3. Продолжительность фаз онтогенеза растений арабидопсиса в зависимости от уровня эндогенных гиббереллинов и экзогенного brassinолида на белом свете

Недостаток активных форм ГК у мутанта обуславливал замедление развития растений, удлиняя продолжительность фаз онтогенеза (рис. 3). С каждой фазой отставание в развитии мутанта увеличивалось. Формирование прикорневой розетки растений *ga4-1* происходило на 2 сут позже, чем у *Ler*. Этап генеративного развития у мутанта также был замедлен, что согласуется с данными S. Yamaguchi и соавторов [11]. Растяжение стебля главного цветonoсного побега у *ga4-1* задержалось на 9 сут. Период бутонизации и цветения *ga4-1* затягивался в среднем на 10 сут. Стадия плодоношения (образование стручков) мутанта происходила на 14 сут позже, чем у исходной линии.

Обработка экзогенным БЛ ускоряла на 2 сут формирование розетки у *ga4-1* (рис. 3). Цветonoсный

побег мутанта растягивался раньше на 3 сут по сравнению с необработанными растениями, но на 6 сут позже, чем у *Ler*. Период бутонизации и цветения растений *ga4-1* сократился по сравнению с контрольными растениями, однако сохранялось отставание по сравнению с *Ler* на 4 сут. Действие БЛ сокращало продолжительность стадии плодоношения мутанта и *Ler*. Эффект БЛ проявился в формировании и созревании стручков на 4 сут раньше, чем у необработанных БЛ растений.

Отсутствие ГК<sub>1</sub> и ГК<sub>4</sub> обуславливало снижение темпов растяжения листьев (данные не приведены), главного и боковых побегов (рис. 4) и накопления сухой биомассы растений (рис. 5, а). Обработка БЛ увеличивала как растяжение листьев и побегов, так и биомассу растений мутанта, причем последняя дос-

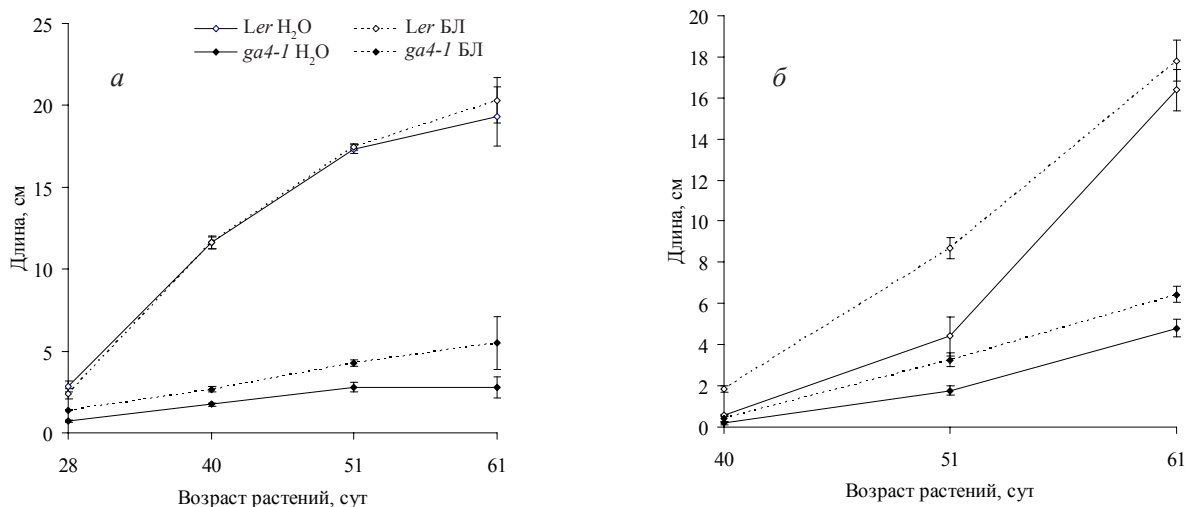


Рис. 4. Динамика длины главного (а) и боковых (б) цветonoсных побегов растений арабидопсиса в зависимости от уровня эндогенных гиббереллинов и экзогенного brassinолида

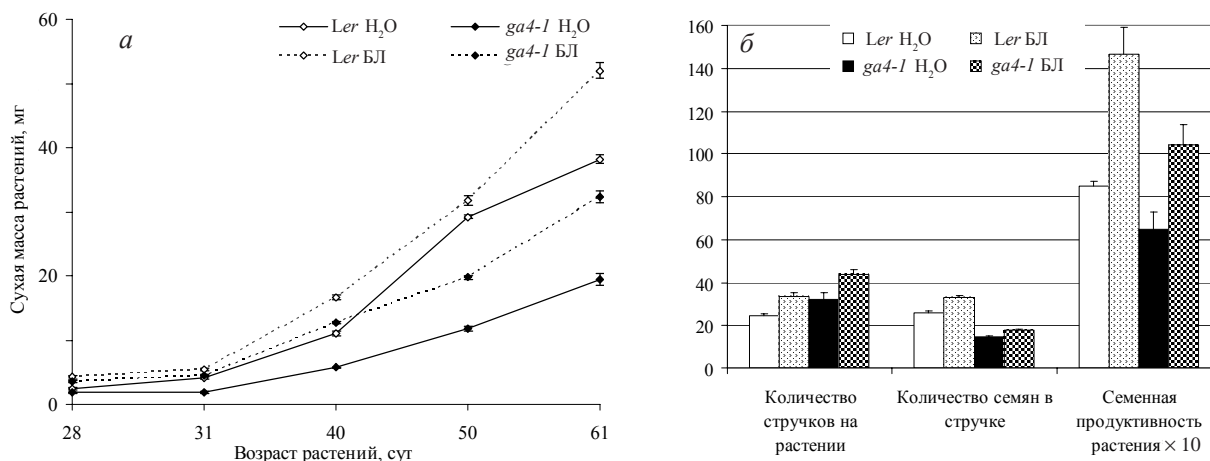


Рис. 5. Динамика сухой массы (а) и семенная продуктивность (б) растений арабидопсиса в зависимости от уровня эндогенных гиббереллинов и экзогенного брассинолида на белом свете

тигала уровня дикого типа в интервале с 28 по 40 сут (фаза цветения).

Сравнительный анализ ростовых параметров и продуктивности 61-дневных растений показал существенные отличия двух линий. Длина главного и боковых побегов мутанта была меньше таковой исходной линии (рис. 4, а). Другой отличительной чертой мутанта по биосинтезу ГК явилось повышенное ветвление главного побега, имевшего в 2 раза большее количество боковых побегов относительно *Ler*. Ветвление – признак снятия апикального доминирования, вызванного определенным соотношением индоллил-3-уксусной кислоты (ИУК) и цитокининов. Поэтому недостаток ГК, вероятно, затрагивал эндогенный уровень этих фитогормонов.

Это предположение согласуется с нашими данными, полученными при выращивании исследуемых линий арабидопсиса на монохроматическом свете (рис. 6) [18]. Растения мутанта *ga4-1* характеризовались более низким содержанием ИУК, но более высоким уровнем рибозида зеатина (РЗ) по сравнению с *Ler* как на зеленом, так и на синем свете.

Количество бутонов и цветков у растений *ga4-1* было больше в 1.6 раза такового дикого типа. Однако в последующем стручки имели меньшие (на 32 %) размеры относительно *Ler*, при этом часть из них не достигала средних размеров и не вызревала. Среднее количество вызревших стручков на растении мутанта было на 67.7 % меньше, чем у *Ler*, количество семян в стручке составило 14 (у *Ler*-25), поэтому реальная семенная продуктивность мутанта *ga4-1* в расчёте на растение также была ниже (рис. 5, б). Обработка БЛ увеличивала растяжение побегов, количество боковых побегов, биомассу растений, количество стручков и их наполняемость, и семенную продуктивность мутанта (рис. 4 и 5). Наибольший эффект БЛ проявился в присутствии активных ГК у *Ler*.

Из вышеизложенных данных следует, что активные формы ГК регулируют рост этиолированных проростков, удлиняя гипокотили и семядоли и укорачивая корни. Активные формы ГК, вероятно, участвуя в трансдукции или трансляции светового сигнала, усиливают ростовую реакцию семядолей на свет, но снижают ростовую реакцию гипокотилей.

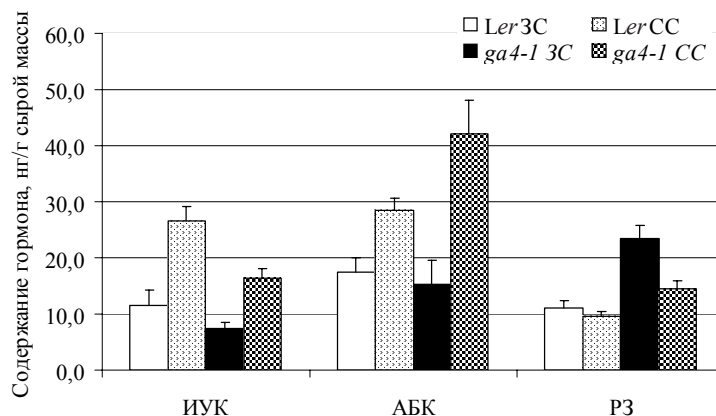


Рис. 6. Содержание ИУК, РЗ и абсцизовой кислоты (АБК) в 47-дневных растениях *A. thaliana* исходной линии *Ler* и мутанта *ga4-1*, выросших на синем (CC) и зеленом (3C) свете (синие TL-D 18W/18 и зеленые TL-D 18W/17 люминесцентные лампы фирмы «Phillips»)

ГК<sub>1/4</sub> усиливают рост вегетативных и репродуктивных органов и сокращают продолжительность стадий жизненного цикла растения арабидопсиса при выращивании на белом свете. Влияние экзогенного 10<sup>-9</sup>М БЛ частично восстанавливало полукарликовый фенотип проростка мутанта до исходной линии *Ler* в темноте и на свете, однако БЛ не мог полностью заменить недостаток ГК<sub>1/4</sub> в удлинении гипокотилей, но обеспечивал рост пластинки семядоли. Совместное действие света и БЛ вызывало аддитивный эффект в увеличении площади семядоли *Ler* и синергический эффект в увеличении площади семядоли и длины корня *ga4-1*. Предпосевная обработка БЛ семян ускоряет время

протекания фаз онтогенеза, увеличивает скорость роста обеих линий, различающихся по эндогенному уровню ГК. Действие экзогенного БЛ частично компенсирует недостаток активных форм ГК, увеличивая общую длину побегов и восстанавливая семенную продуктивность мутанта до уровня дикого типа. Этот эффект был обусловлен увеличением количества боковых побегов, количества стручков, их длины и наполняемости семенами. При недостатке эндогенных активных ГК включались регулируемые БЛ компенсаторные механизмы, в качестве которых мог выступать баланс эндогенных фитогормонов (ауксина, цитокининов и АБК).

## Литература

1. Talon M., Koorneef M., Zeevaart J.A.D. Endogenous gibberellins in *Arabidopsis thaliana* and possible steps blocked in the biosynthetic pathways of semidwarf *ga4* and *ga5* mutants // Proc. Natl. Acad. Sci. 1990. V. 87. P. 7983–7987.
2. Fu X., Sudhakar D., Peng J., et al. Expression of *Arabidopsis* GAI in transgenic rice represses multiple gibberellin responses // Plant Cell. 2001. V. 13. P. 1791–1802.
3. Hedden P., Phillips A.L. Gibberellin metabolism: new insights revealed by genes // Trends Plant Sci. 2000. V. 5. No. 12. P. 523–530.
4. Чайлахян М.Х. Факторы генеративного развития растений. XXV Тимирязевские чтения. М., 1964.
5. Хрипач В.А., Лахвич Ф.А., Жабинский В.Н. Брассиностероиды. Минск, 1993.
6. Tanaka K., Nakamura Y., Asami T., et al. Physiological roles of brassinosteroids in early growth of *Arabidopsis*. Brassinosteroids have a synergistic relationship with gibberellin as well as auxin in light-grown hypocotyl elongation // J. Plant Growth Regul. 2003. V. 22. P. 259–271.
7. Alabady D., Gil J., Blazquez M. A., Garcia-Martinez J. L. Gibberellins repress photomorphogenesis in darkness // Plant Physiol. 2004. V. 134. P. 1050–1057.
8. Kasahara H., Hanada A., Kuzuyama T., et al. Contribution of mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to biosynthesis of gibberellins in *Arabidopsis* // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. No. 47. P. 45188–45194.
9. Карначук Р.А., Головацкая И.Ф., Ефимова М.В., Хрипач В.А. Действие эпибрассинолида на морфогенез и соотношение гормонов у проростков *Arabidopsis* на зеленом свете // Физиология растений. 2002. Т. 49. Вып. 4. С. 591–595.
10. Koorneef M., van der Veen J.H. Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* // Theoretical and Applied genetics. 1980. V. 58. P. 257–263.
11. Yamaguchi S., Smith M., Brown R.G.S., Kamiya Y., Sun T. Phytochrome regulation and differential expression of gibberellin 3β-hydroxylase genes in germinating *Arabidopsis* seeds // Plant Cell. 1998. V. 10. P. 2115–2126.
12. Yamaguchi S., Kamiya Y. Gibberellin biosynthesis: its regulation by endogenous and environmental signals // Plant Cell Physiol. 2000. V. 41. No. 3. P. 251–257.
13. Cowling R. J., Kamiya Y., Seto H., Harberd N.P. Gibberellin dose-response regulation of GA4 gene transcript levels in *Arabidopsis* // Plant Physiol. 1998. V. 117. P. 1195–1203.
14. Kamiya Y., Garcia-Martinez J.L. Regulation of gibberellin biosynthesis by light // Curr. Opin. Plant Biol. 1999. V. 2. P. 398–403.
15. Карначук Р.А., Негрецкий В.А., Головацкая И.Ф. Гормональный баланс листа растений на свете разного спектрального состава // Физиология растений. 1990. Т. 37. Вып. 3. С. 527–534.
16. Головацкая И.Ф. Роль криптохрома 1 и фитохромов в регуляции фотоморфогенетических реакций растений на зеленом свете // Физиология растений. 2005. Т. 52. № 6. С. 822–829.
17. Головацкая И.Ф. Действие экдистерона на морфофизиологические процессы в растении // Физиология растений. 2004. Т. 51. № 3. С. 452–458.
18. Головацкая И.Ф., Карначук Р.А., Ефимова М.В., Шилкина А.Н. Роль гиббереллинов в процессах роста и развития арабидопсиса на селективном свете // Материалы 6 Междунар. симп. «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования» (13–17 июня 2005). Т. II. Пушино-на-Оке, 2005. С. 47–49.

Поступила в редакцию 12. 10. 2006