

УДК 581.1

## УНИВЕРСАЛЬНЫЙ СТРЕССОВЫЙ БЕЛОК GRUSP ВОВЛЕЧЕН В ГИББЕРЕЛЛИН-ЗАВИСИМУЮ ИНДУКЦИЮ ЦВЕТЕНИЯ РАСТЕНИЙ *Arabidopsis thaliana*

© 2021 г. Д. С. Горшкова<sup>1,2</sup>, И. А. Гетман<sup>1</sup>, Л. И. Сергеева<sup>1,3</sup>,  
член-корреспондент РАН Вл. В. Кузнецов<sup>1,2</sup>, Е. С. Пожидаева<sup>1,\*</sup>

Поступило 23.12.2020 г.  
После доработки 05.04.2021 г.  
Принято к публикации 08.04.2021 г.

Исследовано влияние инсерции Т-ДНК в 3'-UTR область гена *At3g58450 Arabidopsis thaliana*, кодирующего универсальный стрессовый белок GRUSP (Germination-Related Universal Stress Protein). Установлено, что данная мутация замедляет переход трансгенной линии *grusp-115* к цветению на длинном дне из-за сниженного содержания эндогенных биоактивных гиббереллинов ГК1 и ГК3 по сравнению с растениями дикого типа Col-0. Экзогенные ГК ускоряли цветение растений обеих линий, однако не изменяли временную разницу наступления цветения между Col-0 и *grusp-115*. Помимо изменений в метаболизме ГК, у *grusp-115*, очевидно, имеются нарушения процессов реализации сигнала, индуцирующего цветение. Это подтверждается результатами экспрессии генов флорального интегратора *FLOWERING LOCUS T (FT)* и флорального репрессора *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, являющихся ключевыми регуляторами цветения и действующими разнонаправленно. Мы предполагаем, что на формирование фенотипа *grusp-115* также может влиять низкий уровень экспрессии *FT*, обусловленный повышенной экспрессией *FLC*.

**Ключевые слова:** цветение, фитогормоны, универсальный стрессовый белок, *At3g58450*, GRUSP

**DOI:** 10.31857/S2686738921040119

Переход к репродуктивной фазе является важнейшим этапом в онтогенезе цветковых растений. У растения длинного дня (ДД) *Arabidopsis thaliana* (L.) Neuh ключевыми фитогормонами, контролирующими индукцию цветения, являются гиббереллины (ГК) [1], которые строго необходимы и в условиях короткого дня (КД) [2]. На ДД гиббереллины вовлекаются в индукцию цветения опосредованно через регуляцию экспрессии и функционирования основных флоральных интеграторов фотопериодического пути цветения *FLOWERING LOCUS T (FT)* и *SOC1*. Накопление ГК в листьях приводит к деградации транскрипционных репрессоров группы DELLA и ин-

дуцирует транскрипцию гена FT [3, 4] за счет активации транскрипционных факторов CO и SPL [5]. В апикальной меристеме ГК-зависимая деградация DELLA-белков приводит к активации экспрессии LEAFY и SOC1, что, в свою очередь, обеспечивает переход к цветению [6].

Помимо гиббереллинов, важная роль в зацветании принадлежит абсцизовой кислоте (АБК). В зависимости от условий произрастания и физиологического состояния растения воздействие АБК способно как ускорять, так и задерживать переход от вегетативной стадии онтогенеза к репродуктивной [7]. В основе задержки цветения растений в условиях ДД лежит функционирование АБК-зависимых транскрипционных факторов ABI4 и ABI5 [8, 9]. ABI4 ингибирует переход к цветению, подавляя биосинтез ГК и стимулируя экспрессию флорального репрессора *FLOWERING LOCUS C (FLC)* [8–10]. Дополнительный вклад в активацию FLC вносят DELLA-белки, обеспечивая тем самым тесную взаимосвязь с ГК-зависимыми ответами [11].

<sup>1</sup> Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>3</sup> Вагенингенский университет и Исследовательский центр, Вагенинген, Нидерланды

\*e-mail: alenapoj@mail.ru

Универсальный стрессовый белок GRUSP (Germination-Related Universal Stress Protein), кодируемый геном *At3g58450 A. thaliana* [12, 13], является потенциальным участником механизмов, контролирующих баланс между АБК и ГК на разных стадиях развития растения. Экспрессия *At3g58450* значительно возрастает в проростках Col-0, обработанных АБК, а нарушение его транскрипции приводит к АБК-гиперчувствительности трансгенных семян *grusp-115* [12].

Цель данного исследования заключается в том, чтобы впервые изучить взаимосвязь позднецветущего фенотипа трансгенной линии *grusp-115*, характеризующейся пониженной экспрессией гена *At3g58450* из-за вставки Т-ДНК в его 3'-UTR область, с содержанием эндогенных гиббереллинов и экспрессией генов, контролирующих переход растения к репродуктивному развитию.

В исследовании использовали растения дико-го типа *A. thaliana* (L.) Heynh экотипа Columbia (Col-0) и гомозиготной трансгенной линии *GABI\_kat 115C08 (grusp-115)* [12]. Растения выращивали в почве в климатической камере с 16-часовым фотопериодом при интенсивности освещения  $100 \text{ мкЕ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$  и температуре  $+21^\circ\text{C}$ .

Развитие растений Col-0 и *grusp-115* анализировали в соответствии со шкалой стадий роста, которая используется для идентификации и интерпретации фенотипических различий и определения конкретных стадий роста у *A. thaliana* так, как описано ранее [14]. Индикатором наступления генеративной стадии является появление головки соцветия в розетке растения. Время цветения выражено в количестве дней после стратификации или количестве розеточных листьев на момент появления цветочной почки.

Содержание активных ГК определяли в 10 мг лиофилизированных образцов, полученных из розеточных листьев 4-недельных растений Col-0 и *grusp-115* [15]. Из исследований, основанных на использовании изотопов, известно, что обработка экзогенными ГК приводит к эффективному поглощению ГК листьями и к их последующему транспорту в апексы побегов в биологически активной форме [16]. В связи с чем реакцию растений на экзогенные ГК изучали с использованием  $100 \text{ мкМ}$  водного раствора ГК4 + 7 ("Sigma", США). Для этого проростки, начиная с возраста 14 дней, дважды в неделю в течение 12 нед опрыскивали раствором ГК в присутствии 0.02% (v/v) Твин-20. Контрольные растения опрыскивали раствором, содержащим только 0.2% (v/v) Твин-20.

Уровни транскриптов генов *FLC (At5g10140)* и *FT (At1g65480)* оценивали методом ПЦР в режиме реального времени (qRT-PCR) так, как было описано ранее [13]. Для амплификации фрагментов генов использовали пары праймеров: *FLC* 5'-AAAGTAGCCGACAAGTCACC-3' и 5'-GGATGC-

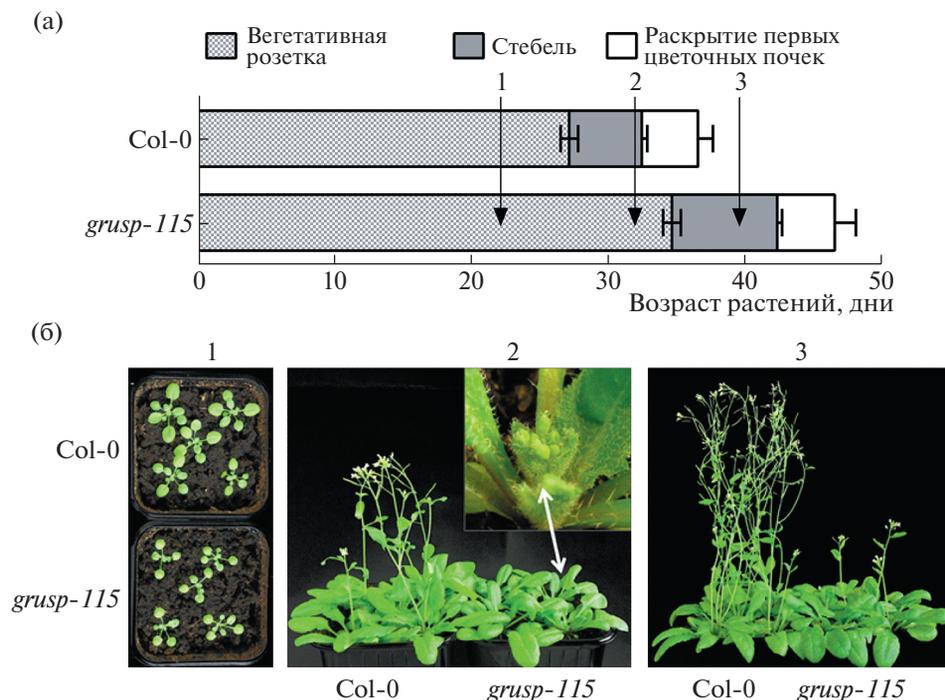
GTCACAGAGAACAG-3'; *FT* 5'-GCCAGAACTTCAACACTCGC-3' и 5'-AGCCACTCTCCCTCTGACAA-3'. Эксперименты проводили в 3-кратной биологической повторности. Достоверность различий проверяли при помощи критерия Стьюдента (*t*-критерий).

Установлено, что задержка прорастания трансгенных семян *grusp-115* является результатом изменений в экспрессии генов метаболизма ГК, в том числе генов биосинтеза, *GA20ox1* и *GA3ox1* [13]. Снижение интенсивности экспрессии генов биосинтеза ГК также может быть причиной и более длительной стадии вегетативного роста, наблюдаемой у *grusp-115* (рис. 1а).

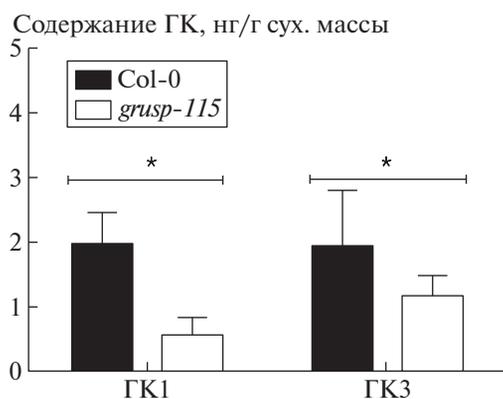
У Col-0 через 28–30 дней после стратификации сформировалась хорошо видимая головка соцветия, в то время как у *grusp-115* наблюдалась задержка формирования соцветия до 35 дней. Более того, удлинение стебля у Col-0 началось через 3–5 дней после появления цветочной почки, в то время как у *grusp-115* этого не происходило, и головка соцветия дольше сохранялась внутри листьев розетки (рис. 1б; номер 2 – растения 35-дневного возраста). Полноразмерные побеги с цветками и стручками сформировались у 45-дневных растений Col-0, в то время как *grusp-115* в этом возрасте находился на стадии удлинения побега и раскрытия первых цветочных почек (рис. 1б, номер 3–45-дневные растения). Таким образом, временная разница между Col-0 и *grusp-115* составила 10 дней с момента образования соцветия и удлинения побега. Впоследствии *grusp-115* сформировал полукарликовый побег со стручками, измененными по длине и форме, с небольшим количеством семян (рис. 1б). Полноценные побеги с развитыми стручками развились только через 50–55 дней.

На ДД как минимум два фактора могут играть ключевую роль при переходе растения от вегетативной стадии развития к генеративной: фотопериодизм и гиббереллины [4]. При этом фотопериодический путь играет основную роль в индукции цветения, а ГК выполняют вспомогательную функцию [4].

Наши результаты демонстрируют, что позднее зацветание *grusp-115*, вероятно, связано со сниженным содержанием биологически активных ГК1 и ГК3 (рис. 2) и может быть устранено обработкой растений экзогенными ГК (рис. 3). Важным параметром роста и развития *A. thaliana* является количество розеточных листьев [2, 14]. В условиях ДД Col-0 формирует 10–14 розеточных листьев, после чего апикальная меристема побега перестраивается в меристему соцветия [14]. В нашем исследовании растения Col-0 сформировали в среднем по 11 розеточных листьев за период вегетативного роста, в то время как *grusp-115* переходили к цветению только при наличии 14 ли-



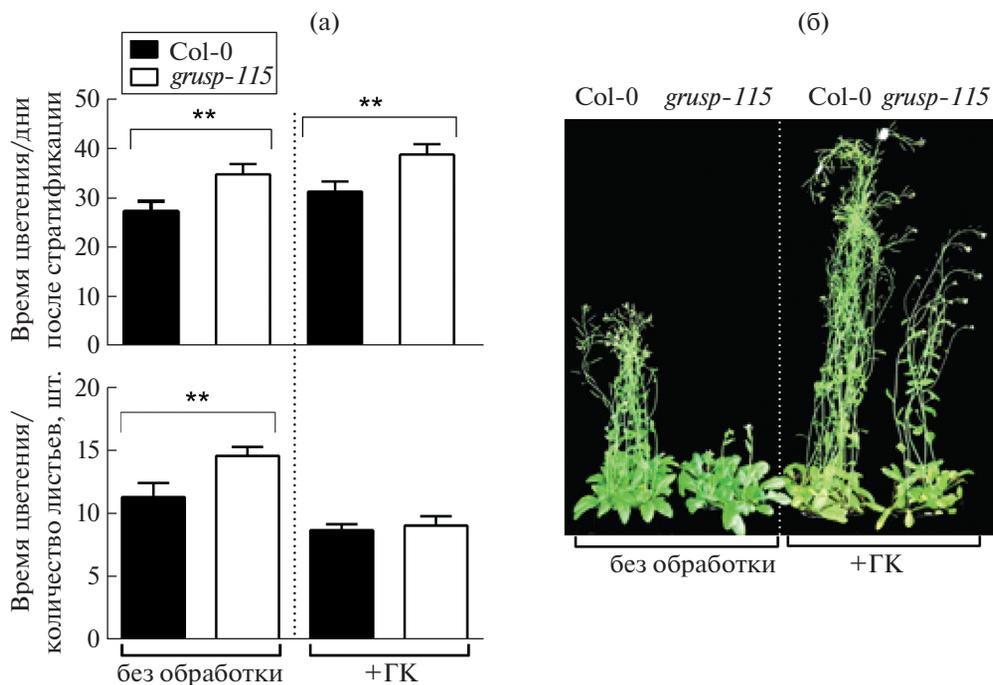
**Рис. 1.** Характеристика растений Col-0 и *grusp-115* в условиях роста на длинном дне: а – диаграмма развития растений согласно Бойес (Boyes) [14]. Цифрами обозначена группа растений, чей возраст соответствует (1) – 23, (2) – 34 и (3) – 42 дням роста после стратификации, и у которых были собраны образцы розеточных листьев для анализа содержания транскриптов генов *FT* и *FLC* методом qRT-PCR; б – внешний вид (1) – 23, (2) – 34 и (3) – 42- дневных растений.



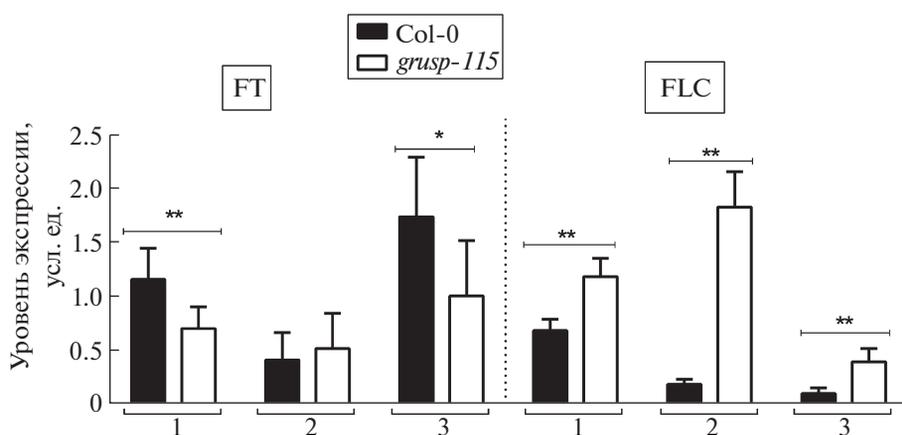
**Рис. 2.** Содержание биоактивных гиббереллинов ГК1 и ГК3 в тканях 4-недельных вегетативных розеток растений Col-0 и *grusp-115*. Звездочкой обозначены статистически достоверные различия между Col-0 и *grusp-115* согласно критерию Стьюдента (\* –  $p < 0.1$ ).

ствьев (рис. 3а). Обработка растений экзогенными ГК ускоряла переход к репродуктивной стадии Col-0, который наблюдался при наличии у растений не 11, а лишь 9 листьев. Растения *grusp-115* реагировали на обработку ГК сходным образом (рис. 3б). Они зацветали так же, как Col-0, после формирования 9 розеточных листьев (рис. 3а). Таким образом, отставание в переходе к цветению,

выраженное в количестве розеточных листьев, полностью устранялось у *grusp-115* при обработке экзогенными гиббереллинами. ГК-зависимое восстановление позднецветущего фенотипа *grusp-115* до фенотипа Col-0 подтверждает идею о том, что трансгенная линия испытывает дефицит эндогенных ГК (рис. 2). В то же время обработка ГК *grusp-115* не устраняла более поздний (на 10 дней)



**Рис. 3.** Реакция растений Col-0 и *grusp-115* на обработку 100 мкМ раствором экзогенных гиббереллинов ГК<sub>4+7</sub>: а – время цветения растений, выраженное в количестве дней после стратификации и количестве розеточных листьев на момент появления цветочной почки в розетке; б – фенотип растений до и после обработки ГК через 42 дня роста. Звездочками обозначены статистически достоверные различия между Col-0 и *grusp-115* согласно критерию Стьюдента (\*\* –  $p < 0.05$ ).



**Рис. 4.** Относительный уровень экспрессии генов *FT* и *FLC* в розеточных листьях растений Col-0 и *grusp-115*. Образцы отбирали на разных стадиях роста растений, соответствующих их возрасту в 23 (1), 34 (2) и 42 (3) дня после стратификации. Звездочками обозначены статистически достоверные различия между Col-0 и *grusp-115* согласно критерию Стьюдента (\* –  $p < 0.1$ , \*\* –  $p < 0.05$ ).

переход к цветению трансгенной линии по сравнению с Col-0 (рис. 3а).

Для поиска других возможных причин временного отставания перехода к цветению линии *grusp-115* от Col-0 был проанализирован уровень

экспрессии ключевых флоральных генов *FT* и *FLC* в розетках двух сравниваемых линий на разных стадиях развития растений (рис. 4). Для этого использовали розеточные листья растений 23-, 34- и 42-дневного возраста, обозначенные под

номера 1, 2, и 3 соответственно. Ген *FT* экспрессировался на низком уровне в листьях любого возраста (рис. 4), но с максимальной интенсивностью в возрасте 42 дней (3), что соответствует цветущему растению со сформированными соцветиями (рис. 1б). Растения *grusp-115* демонстрировали сниженный уровень экспрессии гена *FT* как на стадии вегетативного роста в возрасте 23 дней (1), так и на стадии перехода к цветению в возрасте 42 дней (рис. 4; (3)).

Репрессор цветения *FLC*, подавляющий экспрессию ряда флоральных генов, в том числе и *FT*, тормозит переход к генеративной стадии развития [6]. На рис. 4 видно, что уровень экспрессии гена *FLC* выше у *grusp-115* на всех изученных стадиях роста (1–3; рис. 1а), чем у Col-0. Эта разница максимальна в возрасте 34 дней (2), когда растения Col-0 уже находятся на стадии формирования побегов соцветия, а *grusp-115* все еще находятся в вегетативном состоянии. Более того, уровень транскриптов *FLC* повышен у *grusp-115* даже после появления бутонов (3), что объясняет у него пониженную экспрессию гена *FT*.

Таким образом, мы впервые показали, что в основе более позднего перехода к цветению T-ДНК инсерционной трансгенной линии *grusp-115 A. thaliana* по сравнению с диким типом является низкое содержание биологически активных эндогенных ГК1 и ГК3, а также слабая экспрессия гена *FT* из-за повышенного накопления флорального репрессора *FLC*. Мы предполагаем, что белок GRUSP является новым регуляторным компонентом в сигнальных путях, обеспечивающих переход к цветению.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ, проект № 18-04-00043. Часть исследования проведена при финансовой поддержке государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 0087-2021-0003).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kinoshita A., Richter R. Genetic and molecular basis of floral induction in *Arabidopsis thaliana* // Journal of Experimental Botany. 2020. V. 71. № 9. P. 2490–2504.
2. Wilson R.N., Heckman J.W., Somerville C.R. Gibberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days // Plant Physiology. 1992. V. 100. P. 403–408.
3. Galvão V.C., Horrer D., Küttner F., et al. Spatial control of flowering by DELLA proteins in *Arabidopsis thaliana* // Development. 2012. V. 139. P. 4072–4082.
4. Porri A., Torti S., Romera-Branchat M., et al. Spatially distinct regulatory roles for gibberellins in the promotion of flowering of *Arabidopsis* under long photoperiods // Development. 2012. V. 139. P. 2198–2209.
5. Wang H., Pan J., Li Y., et al. The DELLA-CONSTANS transcription factor cascade integrates gibberellic acid and photoperiod signaling to regulate flowering // Plant Physiology. 2016. V. 172. P. 479–488.
6. Moon J., Lee H., Kim M., et al. Analysis of flowering pathway integrators in *Arabidopsis* // Plant Cell Physiology. 2005. V. 46. № 2. P. 292–299.
7. Shu K., Luo X., Meng Y., et al. Toward a molecular understanding of abscisic acid actions in floral transition // Plant Cell Physiology. 2018. V. 59. № 2. P. 215–221.
8. Wang Y., Li L., Ye T., et al. The inhibitory effect of ABA on floral transition is mediated by ABI5 in *Arabidopsis* // Journal of Experimental Botany. 2013. V. 64. № 2. P. 675–684.
9. Shu K., Chen Q., Wu Y., et al. ABI4 mediates antagonistic effects of abscisic acid and gibberellins at transcript and protein levels // The Plant Journal. 2016. V. 85. P. 348–361.
10. Shu K., Chen Q., Wu Y., et al. ABCISIC ACID-INSENSITIVE 4 negatively regulates flowering through directly promoting *Arabidopsis* FLOWERING LOCUS C transcription // Journal of Experimental Botany. 2016. V. 67. № 1. P. 195–205.
11. Li M., An F., Li W., et al. DELLA proteins interact with FLC to repress flowering transition // Journal of Integrative Plant Biology. 2016. V. 58. P. 642–655.
12. Горшкова Д.С., Гетман И.А., Воронков А.С., и др. Ген универсального стрессового белка *AtUSP* регулируется фитогормонами и вовлекается в прорастание семян *Arabidopsis thaliana* // Доклады Академии Наук. 2018. Т. 479. № 5. С. 578–581.
13. Gorshkova D.S., Pojidaeva E.S. Members of the Universal Stress Protein family are indirectly involved in gibberellin-dependent regulation of germination and post-germinated growth // Russian Journal of Plant Physiology. 2021. V. 68. № 3. P. 451–462.
14. Boyes D.C., Zayed A.M., Ascenzi R., et al. Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants // Plant Cell. 2001. Vol. 13. № 7. P. 1499–1510.
15. Kolachevskaya O.O., Sergeeva L.I., Floková K. et al. Auxin synthesis gene *tms1* driven by tuber-specific promoter alters hormonal status of transgenic potato plants and their responses to exogenous phytohormones // Plant Cell Rep. 2017. V. 36. P. 419–435.
16. Eriksson S., Böhlenius H., Moritz T., et al. GA<sub>4</sub> is the active gibberellin in the regulation of LEAFY transcription and *Arabidopsis* floral initiation // The Plant Cell. 2006. V. 18. P. 2172–2181.

**GRUSP, AN UNIVERSAL STRESS PROTEIN, IS INVOLVED  
IN GIBBERELLIN-DEPENDENT INDUCTION OF FLOWERING  
IN *Arabidopsis thaliana***

**D. S. Gorshkova<sup>a,b</sup>, I. A. Getman<sup>a</sup>, L. I. Sergeeva<sup>a,c</sup>,  
Corresponding Member of RAS V. V. Kuznetsov<sup>a,b</sup>, and E. S. Pojidaeva<sup>a,#</sup>**

<sup>a</sup> *K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russian Federation*

<sup>b</sup> *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, Russian Federation*

<sup>c</sup> *Wageningen University & Research, Wageningen, The Netherlands*

<sup>#</sup>*e-mail: alenapoj@mail.ru*

The effect of T-DNA insertion in the 3'-UTR region of *Arabidopsis thaliana* *At3g58450* gene encoding the Germination-Related Universal Stress Protein (GRUSP) was studied. It was found that under a long-day condition this mutation delays transition to flowering of *grusp-115* transgenic line that due to a reduced content of endogenous bioactive gibberellins GA1 and GA3 in comparison to the wild-type plants (Col-0). Exogenous GA accelerated flowering of both lines but did not change the time of difference in the onset of flowering between Col-0 and *grusp-115*. In addition to changes in GA metabolism, *grusp-115* evidently has disturbances in realization of the signal that induces flowering. This is confirmed by the results of gene expression of the floral integrator FLOWERING LOCUS T (FT) and the floral repressor FLOWERING LOCUS C (FLC), which are key flowering regulators and acting opposite. We hypothesize that the formation of *grusp-115* phenotype can also be affected by a low expression level of *FT* due to up-regulated *FLC* expression.

*Keywords:* flowering, phytohormones, universal stress protein, *At3g58450*, GRUSP