

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 574.24

ВОЗМОЖНОЕ УЧАСТИЕ ГИББЕРЕЛЛИНОВ В ОБРАЗОВАНИИ КАРЛИКОВЫХ ФОРМ ЯБЛОНИ СИБИРСКОЙ *Malus baccata* (L.) Borkh. В УСЛОВИЯХ ЛЕСОСТЕПНОГО ЭКОТОНА

А. В. Столбикова, А. А. Шишпаренок, А. В. Рудиковский, Е. Г. Рудиковская,
Л. В. Дударева

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132

E-mail: alecsandrit@rambler.ru, sansanich90@inbox.ru, prod@sifibr.irk.ru, rudal69@mail.ru,
laser@sifibr.irk.ru

Поступила в редакцию 11.04.2017 г.

В переходной зоне между лесом и степью (в экотоне) на территории Республики Бурятия обнаружены низкорослые (до 110 см в высоту) деревья яблони сибирской *Malus baccata* (L.) Borkh., которые отличаются по росту от других (до 250 см в высоту) деревьев этой популяции. Для выяснения причин карликовости с помощью физиологических методов изучали влияние гиббереллинов на ростовые процессы. В результате экзогенного нанесения GA3 на конусы нарастания низкорослой яблони наблюдали достоверное усиление ростовых процессов в верхушечной части побегов у опытных образцов по сравнению с контролем. Обнаруженная чувствительность деревьев к этому гормону позволяет предполагать отсутствие мутаций в генах белков-репрессоров сигнала, инициирующего растяжение интеркалярных меристем, следовательно, отсутствие нарушений в гиббереллин-сигнальной системе. Фитогормональные экстракты листьев яблони не снимали низкорослость у карликовых мутантов гороха ни в одном из вариантов опыта (в средах с экстрактами листьев длина проростков гороха была достоверно ниже, чем в гормональных средах, и не превосходила контроль). Это может указывать на присутствие в листьях эндогенного ретардантного соединения или комплекса соединений негормональной природы, которые, вероятно, принимают участие в регуляции ростовых процессов и формировании карликового габитуса у растений *M. baccata*. Установленное ранее пониженное содержание индолил-3-уксусной кислоты в карликах по сравнению с высокорослыми деревьями и связанные с этим различия в ИУК/АБК индексах, а также выявленная гиббереллин-зависимость карликовой яблони могут свидетельствовать об участии фитогормонов в формировании карликового статуса *M. baccata* как адаптации к стрессовым условиям произрастания, прежде всего к недостаточной увлажненности на территории лесостепного экотона Селенгинской Даурии.

Ключевые слова: яблоня сибирская *Malus baccata* (L.) Borkh., экотоны, карликовость, гиббереллины, ретарданты.

DOI: 10.15372/SJFS20180106

ВВЕДЕНИЕ

В переходных областях между экосистемами (экотонами) складываются уникальные условия обитания и взаимодействия биологических организмов. Это приводит к появлению и развитию адаптаций, в результате которых могут возникнуть новые виды и экологические формы, т. е.

экотоны – это «естественные лаборатории» для изучения эволюционных процессов, например видообразования. Одна из таких пограничных зон находится на территории Республики Бурятия в Селенгинской Даурии у подножия Хамбинского хребта. Здесь в условиях лесостепного экотона обнаружены карликовые формы яблони сибирской *Malus baccata* (L.) Borkh. Высказано

предположение, что переход от высокорослых к карликовым формам яблонь в Бурятии обусловлен недостатком влаги в весенне-летний период, неравномерностью выпадения осадков и тонким плодородным слоем почвы (Рудиковский и др., 2008). Как правило, деревья приобретают карликовый габитус на территориях с недостаточной водообеспеченностью, когда почва имеет сильно уплотненную структуру и скудность состава, что характерно для степных, горных и северных районов (Куприянов, Лабазников, 1999; Кузнецова, Слагода, 2016). Однако при выращивании яблони сибирской в более благоприятных условиях экспериментального участка Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (СИФИБР СО РАН) в г. Иркутске карликовость деревьев сохранялась (Рудиковский и др., 2010). Микросателлитный анализ показал, что карликовая форма, являющаяся экологическим морфом вида *M. baccata*, образует отдельный фенотип (Кузнецова и др., 2008). Очевидно, что подобные изменения в морфологии и генетике яблони не могут происходить без изменений в физиологических процессах.

Известно, что в ответ на действие стрессоров в растениях активируются неспецифические реакции, приводящие к повышению их устойчивости и последующей адаптации. Так, в ответ на недостаток влаги в растениях включаются механизмы гормональной регуляции водообмена: происходит интенсивное накопление абсцизовой кислоты (АБК), которая может индуцировать процессы устьичной регуляции, увеличивать синтез осмотически активных веществ и стрессовых белков. Кроме того, есть данные, что АБК влияет на процессы транспорта, синтеза и сигналинг индоллил-3-уксусной кислоты (ИУК), вследствие чего уменьшается растяжение клеток (Рорко et al., 2010). Ранее было показано, что у найденных в Селенгинской Даурии карликовых форм яблони снижено содержание ИУК и связанное с этим показателем соотношение ИУК/АБК (для высокорослых деревьев коэффициент всегда был больше единицы, а для карликовых меньше) (Рудиковский и др., 2015).

С другой стороны, рост и дифференциация растительных тканей определяются взаимодействием разных типов фитогормонов, в том числе гиббереллинами (ГБ). Синтезируясь в основном в листьях, они влияют на удлинение стебля за счет активации процессов деления и растяжения клеток интеркалярных меристем. Крупный зеленый лист синтезирует больше ГБ, чем меньший

по площади, и подает более мощный сигнал в интеркалярную меристему. Клетки активнее делятся и растягиваются там, где больше гиббереллина, и междоузлие под крупным листом оказывается длиннее. Известно, что низкий эндогенный уровень ГБ наряду с генетическими мутациями может быть причиной снижения роста растений (Сельскохозяйственная биотехнология, 2003; Билова и др., 2016).

Мы предположили, что причиной карликовости яблони сибирской в Селенгинской Даурии может быть не только выявленное нами изменение содержания ауксинов в результате адаптации к неблагоприятным условиям произрастания, но и снижение содержания гиббереллинов и/или нарушение в гиббереллин-сигналинговой системе. Поэтому целью представляемой работы было выявление возможного участия гиббереллинов в формировании экологической карликовой формы яблони сибирской *Malus baccata* (L.) Vorkh. в условиях лесостепного экотона Селенгинской Даурии. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи: проверить гиббереллин-зависимость карликовой формы яблони путем экзогенного нанесения GA3 на ее конусы нарастания и провести сравнительный анализ активности гиббереллинов в обеих формах яблони.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили карликовая и высокорослая формы *M. baccata*, произрастающие в долине реки Селенги (Республика Бурятия), а также на экспериментальном участке СИФИБР СО РАН, расположенном в черте г. Иркутска.

Опыт по установлению гиббереллин-зависимости карликовой формы яблони сибирской проводили с помощью биотеста дважды – в 2013 и 2015 гг. (в июне и июле соответственно, в 18 ч). В первом эксперименте использовали по 12 конусов нарастания для контрольной и опытной групп, во втором – по 19. Изначально отмечали точку отсчета, отметку ставили на расстоянии 15 см от верхушки. На конусы нарастания наносили по 10 мкг гибберелловой кислоты (GA3) в водном растворе Твин-20. Контроль обрабатывали 10 мкл водного раствора Твин-20. Обработку проводили 1 раз в неделю в течение месяца, вечером в ясную погоду. Первое измерение проводили в конце месяца, а через неделю – повторное накопительное, которое позволяет количественно оценить влияние гиббереллина.

Для определения эндогенного содержания ГБ листья карликовой и высокорослой яблонь сибирских фиксировали жидким азотом и хранили при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ до начала анализа. Навеску листьев (1.5 г) гомогенизировали в жидком азоте. Гормоны экстрагировали 80%-м метанолом, центрифугировали и очищали от пигментов методом твердофазной экстракции на патронах C18 Sep-Pak (США). Для этого через 2 последовательно соединенных патрона пропускали: 5 мл 100%-го метанола; 5 мл 0.5%-го раствора HCOOH в деионизированной воде; метанольный экстракт из листьев яблони, подкисленный HCOOH (до 0.5%-го раствора). Метанол выпаривали под вакуумом досуха, разбавляли водой и водный экстракт, содержащий фитогормоны, использовали для анализа.

О содержании в тканях эндогенных гиббереллинов можно судить по способности растительного экстракта, содержащего фитогормоны, увеличивать рост карликовых растений, например гороха. Биотест проводили на семенах карликового гороха сорта Шустрик согласно методике А. Н. Бояркина, М. И. Дмитриева (1966). Семена предварительно промывали теплой водой с мылом, обрабатывали 3%-м раствором H_2O_2 в течение 20–30 мин (для стерилизации поверхности от патогенной микрофлоры). Затем заливали прокипяченной и остуженной до температуры $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ дистиллированной водой и оставляли для набухания на 6 ч в термостате при $26\text{ }^{\circ}\text{C}$. Подготовленный горох раскладывали в чашки Петри на фильтровальную бумагу, заранее смоченную в экспериментальной среде. В качестве экспериментальных сред использовали очищенный водный экстракт листьев карликовой и высокорослой яблонь, стандартные растворы GA3 в концентрациях: 0.0001, 0.00001 и 0.000001 %. В качестве контроля использовали одновозрастные растения, выращенные на деионизированной воде. Горох выращивали в вегетационной камере в течение 4 сут в темноте при $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ и относительной влажности 80 %. По окончании опыта измеряли длину проростков с точностью до 1 мм. Каждый эксперимент проводили в 16 биологических повторностях.

Средние значения и их стандартные отклонения, нормальность распределения выборки (W-критерий Шапиро-Уилка), а также достоверность различий сравниваемых средних значений (U-критерий Манна-Уитни) вычисляли с помощью программных пакетов Excel и Sigma Plot.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты эксперимента с нанесением GA3 на конусы нарастания карликовых деревьев представлены на рис. 1.

В ходе эксперимента, проведенного летом 2013 г., наблюдали более интенсивное (на 50 %) удлинение конусов нарастания, обработанных экзогенным GA3, по сравнению с контролем: (30.75 ± 3.22) и (20.50 ± 3.21) см соответственно. Повторный эксперимент, проведенный в 2015 г., подтвердил тенденцию: скорость роста обработанных конусов увеличивалась на 29.62 %: (16.14 ± 1.2) см – контроль, (20.92 ± 1.91) см – опыт. Таким образом, установлено, что клетки меристемы верхушечной части побегов карликовой формы сибирской яблони чувствительны к гиббереллину. Известно, что гены растений, например SLN1, RHt, GAI и RG, кодируют репрессор, блокирующий активацию роста стебля. Гиббереллин снимает их отрицательную регуляцию путем индуцирования деградации этих белков (Richards et al., 2001). Если ген-блокатор подвергается мутации в той части, которая отвечает за взаимодействие с гормоном, и белок даже в его присутствии продолжает работать как репрессор, растение становится гиббереллин-нечувствительным карликом. Этот процесс подробно изучен Silverstone (2001) на арабидопсисе и Gubler (2002) на модельной системе – алейроновом слое ячменя (цит. по: Кулаева, Кузнецов, 2004), у которого гиббереллин индуцирует синтез и секрецию α -амилазы. В обоих случаях важна последовательность DELLA на N-конце и C-конце молекулы. Мутации в DELLA районе в SLN1-гене (у ячменя) и в RGA-гене (у арабидопсиса) ослабляли ответ на гиббереллин и вызывали карликовость растения (Кулаева, Кузнецов, 2004). В нашем случае торможения ростовых процессов в карликовой яблоне после обработки гормоном не наблюдалось. Напротив, наблюдали увеличение роста таких побегов по сравнению с контролем. Это позволяет утверждать,



Рис. 1. Длина побегов карликовой яблони после экзогенного нанесения GA3.

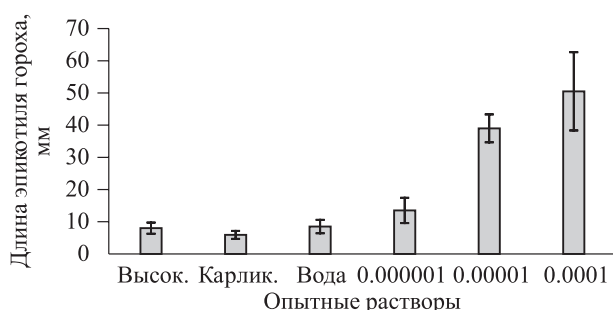


Рис. 2. Зависимость длины эпикотиля гороха от количества гиббереллина в средах для выращивания с экстрактами из листьев высокорослой и карликовой яблонь, деионизированной водой и в стандартных растворах с концентрациями GA3, %: 0.000001, 0.00001 и 0.0001.

что мутации в генах белков-репрессоров исследуемой карликовой формы яблони сибирской нет и гиббереллиновый сигнал, инициирующий растяжение интеркалярных меристем, не блокировался. Результаты биотеста на определение эндогенного содержания ГБ представлены на рис. 2.

Как можно видеть, стандартный раствор GA3 усиливал рост карликового гороха пропорционально концентрации гиббереллина. Суммарные гормональные экстракты из листьев высокорослой и карликовой яблонь достоверно не увеличивали рост гороха по сравнению с контролем (длина проростков (см) в разных средах: высокорослой – 8.0 ± 1.7 , карликовой – 5.9 ± 1.2 и водной – 8.5 ± 2.1). Так как формы *Malus baccata*, произрастающие в Республике Бурятия, имеют явные отличия в росте (карликовые деревья высотой до 110 см, высокорослые 200–250 см) (Рудиковский и др., 2008), то очевидно, что высокорослая яблоня имеет нормальный гиббереллиновый статус. Поскольку гормональные вытяжки из листьев яблони не смогли нивелировать карликовость у гороха, то логично предположить, что в листьях яблони присутствует некий ретардантный фактор или комплекс факторов. Их наличие, по-видимому, делает невозможным количественное определение гиббереллинов вышеописанным способом. В роли таких факторов могут выступать, например, флавоноиды. К настоящему времени доказано, что яблоня обладает высоким содержанием таких веществ не только в плодах, но и в листьях деревьев (Vrhovsek et al., 2004; Marks et al., 2007; Ненько и др., 2014). При этом показано, что флоридзин, являясь природным ингибитором, может тормозить ростовые процессы у яблони (Сарапуу, 1965). Другое мажорное фенольное соединение в яблоне – хлорогеновая

кислота – может выступать ингибитором ИУК оксидазы. Установлено также, что кверцетин может негативно влиять на транспорт ауксинов, которые в свою очередь влияют на рост клеток растяжением (Brown et al., 2001). Поэтому с большой степенью вероятности можно предположить наличие в тканях яблони сибирской ретардантных соединений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что низкорослые формы яблони сибирской не являются гиббереллин-нечувствительными мутантами. В связи с этим логично предположить отсутствие мутаций в генах белков-репрессоров гиббереллинового сигнала. Карликовые свойства деревьев яблони сибирской, возможно, наряду с другими причинами обусловлены наличием эндогенного ретардантного соединения или комплекса соединений, по всей вероятности, фенольной природы. Являясь вторичными метаболитами, фенольные соединения могут реагировать на изменения внешней среды и активно участвовать в процессах адаптации растения к любым видам стресса. Очевидно, что в условиях водного дефицита и высокой солнечной радиации активное накопление фенолкарбоновых кислот в листьях яблони может одновременно с протекторной функцией угнетающе влиять на его рост в целом.

Карликовость яблони сибирской, вероятно, может быть рассмотрена как адаптивная модификация, расширяющая возможности организма для выживания и размножения в конкретных условиях внешней среды. Возникающие в подобных условиях наследственные изменения могут подхватываться естественным отбором, что позволяет виду более активно осваивать новые экологические ниши и достигать более эффективной приспособляемости к ним.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 11-04-00793).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Билова Т. Е., Рябова Д. Н., Анисимова И. Н. Молекулярные основы формирования карликовости у культурных растений. Сообщение I. Нарушения роста из-за мутаций генов метаболизма и сигналинга гиббереллинов // Сельскохозяйств. биол. 2016. Т. 51. № 1. С. 3–16.
- Бояркин А. Н., Дмитриева М. И. Биологическая проба на гиббереллины. Методы определения

- регуляторов роста и гербицидов / Под ред. Ю. В. Ракитина. Л.: Наука. Ленингр. отд-ние, 1966. С. 99–103.
- Кузнецова Е. В., Перетолчина Т. Е., Букин Ю. С., Щербаков Д. Ю., Рудиковский А. В. Происхождение карликовых форм яблони сибирской на территории Республики Бурятия // Изв. Иркутск. гос. ун-та. Сер. Биол. Экол. 2008. Т. 1. № 1. С. 54–58.
- Кузнецова А. О., Слагода Е. А. Влияние природных факторов на растения тундровой зоны Западной Сибири // Научная и производственная деятельность – средство формирования среды обитания человечества: мат-лы Всерос. молодежн. науч.-практ. конф. с междунар. участ. / Отв. ред. Д. С. Дроздов, М. Р. Садурдинов. Тюмень: Тюменск. индустр. ун-т, 2016. С. 166–169.
- Кулаева О. Н., Кузнецов В. В. Новейшие достижения и перспективы изучения механизма действия фитогормонов и их участия в сигнальных системах целого растения // Вестн. РФФИ. 2004. № 2. С. 12–36.
- Куприянов А. Н., Лабазников С. Б. Рост древесных растений в условиях засушливых степей // Изв. Алтайск. гос. ун-та. 1999. Спец. вып. С. 126–129.
- Ненько Н. И., Киселева Г. К., Ульяновская Е. В. Оценка адаптационной устойчивости к засухе сортов яблони различного эколого-географического происхождения в условиях Краснодарского края // Вестн. АПК Ставрополя. 2014. № 2 (14). С. 173–176.
- Рудиковский А. В., Рудиковская Е. Г., Дударева Л. В., Кузнецова Е. В. Уникальные и редкие формы яблони сибирской Селенгинского района Бурятии // Сиб. экол. журн. 2008. № 2. С. 327–333.
- Рудиковский А. В., Рудиковская Е. Г., Побежимова Т. П. Рост и зимостойкость низкорослых форм в условиях города Иркутска // Сиб. вестн. сельскохоз. науки. 2010. № 12. С. 30–35.
- Рудиковский А. В., Рудиковская Е. Г., Дударева Л. В., Потемкин О. Н. Особенности биохимической и морфологической адаптации яблони сибирской (*Malus baccata* L. Borkh) к условиям недостаточного увлажнения в зоне контакта леса и сухой степи // Сиб. экол. журн. 2015. № 3. С. 422–430.
- Сарапуу Л. П. Физиологическое действие флоризина как β -ингибитора при росте и покое у яблони // Физиол. раст. 1965. № 12. С. 134–140.
- Сельскохозяйственная биотехнология: учебник для студ. высш. учеб. завед. / Под ред. В. С. Шевелухи. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Высш. шк., 2003. 469 с.
- Brown D. E., Rashotte A. M., Murphy A. S., Normanly J., Tague B. W., Peer W. A., Taiz L., Muday G. K. Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in arabidopsis // Plant Physiol. 2001. V. 126. N. 2. P. 524–535.
- Marks S. C., Mullen W., Crozier A. Flavonoid and chlorogenic acid profiles of English cider apples // J. Sci. Food Agr. 2007. V. 87. Iss. 4. P. 719–728.
- Popko J., Hänsch R., Mendel R.-R., Polle A., Teichmann T. The role of abscisic acid and auxin in the response of poplar to abiotic stress // Plant Biol. 2010. V. 12. P. 242–258.
- Richards D. E., King K. E., Ait-ali T., Harberd N. P. How gibberellin regulates plant growth and development: a molecular genetic analysis of gibberellin signaling // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molecul. Biol. 2001. V. 52. P. 67–88.
- Vrhovsek U., Rigo A., Tonon D., Mattivi F. Quantitation of polyphenols in different apple varieties // J. Agric. Food Chem. 2004. V. 52(21). P. 6532–6538.

POSSIBLE INVOLVEMENT OF GIBBERELLINS IN THE FORMATION OF DWARF VARIETIES OF SIBERIAN CRAB APPLE *Malus baccata* (L.) Borkh. IN THE CONDITIONS OF FOREST-STEPPE ECOTONE

A. V. Stolbikova, A. A. Shishparenok, A. V. Rudikovskiy, E. G. Rudikovskaya,
L. V. Dudareva

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch
Lermontov str., 132, Irkutsk, 664033 Russian Federation*

E-mail: alecsandrit@rambler.ru, sansanich90@inbox.ru, prod@sifibr.irk.ru, rudal69@mail.ru,
laser@sifibr.irk.ru

In the transition zone between the forest and the steppe (in the ecotone) in the territory of the Buryatia Republic, dwarf species (up to 110 cm in height) of Siberian crabapple *Malus baccata* (L.) Borkh. were found that differ from other (up to 250 cm in height) apple trees. To determine the causes of brachysm by physiological methods, the influence of gibberellins on growth processes were studied. After exogenous application GA3 to the shoot apex of the dwarf apple, we observed a significant increase in growth processes in the apical part of the shoots as compared to the shoots without application. The sensitivity to this hormone, which is found in the dwarf trees, allows to assume the absence of mutations in the genes of repressor proteins of the gibberellin signal and initiates the dilatation of intercalary meristems. The phytohormonal extracts of apple-tree leaves did not remove short stature in dwarf mutants of peas in any of the experiment variants, which may indicate the possible presence in the apple leaves of endogenous retardants. The previously established lower content of indolyl-3-acetic acid in dwarf, compared to tall trees, and the associated differences in IAA / ABC indices, as well as the revealed gibberellin dependence of a dwarf apple, may indicate the participation of phytohormones in the formation of dwarf status *M. baccata*, as an adaptation to the stressful conditions of growth, especially to insufficient moisture, in the forest-steppe ecotone of the Selenga Dauria.

Keywords: *Siberian crab apple, Malus baccata* (L.) Borkh., ecotone, brachysm, gibberellins, retardants.

How to cite: Stolbikova A. V., Shishparenok A. A., Rudikovskiy A. V., Rudikovskaya E. G., Dudareva L. V. Possible involvement of gibberellins in the formation of dwarf varieties of Siberian crab apple *Malus baccata* (L.) Borkh. in the conditions of forest-steppe ecotone // *Sibirskij Lesnoj Zhurnal* (Sib. J. For. Sci.). 2018. N. 1: 59–64 (in Russian with English abstract).