

KATARZYNA MARCINIAK, WERONIKA GRZEGORZEWSKA, JACEK KĘSY, ADRIANA SZMIDT-JAWORSKA, ANDRZEJ TRETYN, JAN KOPCEWICZ

*Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Gagarina 9, 87-100 Toruń
E-mail: kasia_swiniarska@o2.pl
gweni@stud.umk.pl
kesy@umk.pl
asjawors@umk.pl
prat@umk.pl
kopcew@biol.uni.torun.pl*

REGULACJA METABOLIZMU GIBERELIN U ROŚLIN

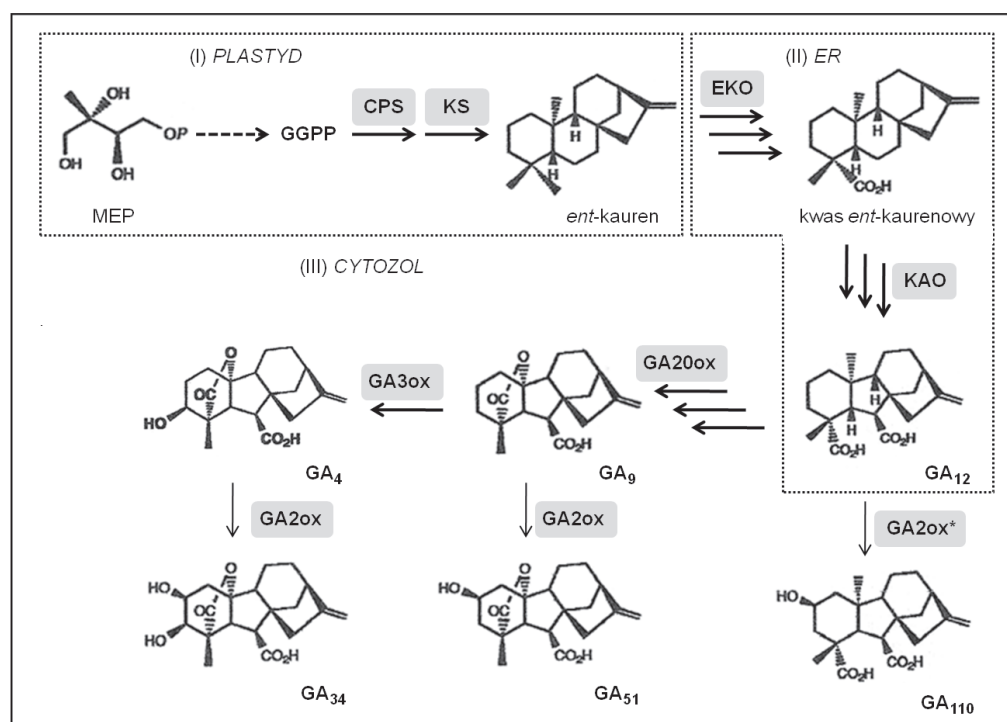
WPROWADZENIE

Prawidłowy rozwój roślin zależy zarówno od czynników endogennych, jak i egzogennych, a ich zintegrowanie jest niezwykle ważne w celu zapewnienia właściwego przebiegu wszystkich procesów wzrostowo-rozwojowych. Wewnętrzna kontrola odbywa się głównie z udziałem fitohormonów, wśród których wyróżniamy gibereliny (GA). W ontogenezie roślin GA wywierają istotny wpływ m. in. na kiełkowanie nasion, wzrost wydłużeniowy hipokotyli i międzywęźli, indukcję kwitnienia, rozwój liści i kwiatów oraz dojrzewanie owoców (DAVIES 2004, FLEET i SUN 2005). Z ponad 130 różnych GA zidentyfikowanych u roślin, grzybów i bakterii (GA₁, GA₁₃₆, <http://www.plant-hormones.info/ga1info.htm>), tylko nieliczne (GA₁, GA₃, GA₄, GA₅, GA₆, GA₇) wykazują aktywność biologiczną, natomiast pozostałe są ich prekursorami lub produktami katabolizmu (MACMILLAN 2002).

Pierwsze etapy biosyntezy GA są wspólne dla wszystkich terpenoidów. Kolejne reakcje utleniania (m. in. grupy aldehydowej do karboksylowej, oksydacyjnej dekarboksylacji, hydroksylacji pierścienia, odwodorowania z utworzeniem podwójnego wiązania) oraz dehydratacji, z utworzeniem dodatkowego pierścienia laktonowego, prowadzą do powstania wszystkich przedstawicieli rodziny GA (Ryc. 1) (KOPCEWICZ i LEWAK 2002).

Kluczowymi enzymami zaangażowanymi w metabolizm cząsteczek hormonu i utrzymanie homeostazy w roślinie są: 20-oksydazy giberelinowe (ang. gibberellin 20-oxidases, GA20ox), 3-oksydazy giberelinowe (ang. gibberellin 3-oxidases, GA3ox) i 2-oksydazy giberelinowe (ang. gibberellin 2-oxidases, GA2ox). Podczas gdy GA20ox i GA3ox, katalizując utlenianie odpowiednio 20. i 3. atomu węgla w cząsteczkach GA, nadają im aktywność biologiczną, GA2ox odpowiada za ich dezaktywację (OLSZEWSKI i współaut. 2002). Odkryto również dwa alternatywne sposoby zmniejszania zawartości hormonu w tkankach: epoksydację, za którą odpowiedzialny jest enzym EUI (ang. elongated uppermost internode), zidentyfikowany po raz pierwszy u ryżu (*Oryza sativa*) (ZHU i współaut. 2006) oraz metylację, którą katalizują metylotransferazy giberelinowe GAMT1 i GAMT2 (ang. gibberellins methyltransferases 1/2) zidentyfikowane u rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) (VARBANOWA i współaut. 2007).

Zastosowanie w ostatnich kilkunastu latach nowoczesnych technik biologii molekularnej doprowadziło do określenia wzorców ekspresji genów kodujących białka odpowiedzialne za metabolizm GA, co pośrednio umożliwiło oznaczenie miejsc syntezy i degradacji GA oraz poznanie mechanizmów



Ryc. 1. Główne etapy (I, II, III) szlaku metabolizmu GA u rzodkiewnika zachodzące w plastydach z udziałem syntaz terpenowych (ang. terpene synthases, TPS), w siateczce śródplazmatycznej (ang. endoplasmic reticulum, ER) z udziałem monooksygenaz cytochromu P450 (ang. cytochrome P450 monooxygenases, P450) oraz w cytozolu z udziałem dioksygenaz zależnych od kwasu 2-oksoglutarynowego (ang. 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases, 2ODD).

MEP – 4-fosforan 2-C-metyl-D-erytritoli (ang. 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate); GGPP – pirofosforan geranylogeranylu (ang. geranylgeranyl diphosphate); CPS – syntaza pirofosforanu *ent*-kopalilu (ang. *ent*-copalyl diphosphate synthase); KS – syntaza *ent*-kaurenu (ang. *ent*-kaurene synthase); EKO – 19-oksydaza *ent*-kaurenu (ang. *ent*-kaurene 19-oxidase); KAO – oksydaza kwasu *ent*-kaurenowego (ang. *ent*-kaurenoic acid oxidase); GA_{20ox} – 20-oksydaza giberelinowa (ang. GA 20-oxidase); GA_{3ox} – 3-oksydaza giberelinowa (ang. GA 3-oxidase); GA_{2ox} – 2-oksydaza giberelinowa (ang. GA 2-oxidase). *Przekształcenie GA₁₂ do GA₁₁₀ katalizowane jest przez trzecią klasę 2-oksydaz giberelinowych (SCHOMBURG i współaut. 2003, wg YAMAGUCHI 2006, zmodyfikowane).

odpowiadających za regulację zawartości cząsteczek hormonu w różnych tkankach roślinnych. Zagadnienia te, stanowiące główną treść prezentowanego artykułu, do chwili

obecnej nie zostały szczegółowo opisane w polskich czasopismach naukowych. Istnieje więc potrzeba podsumowania najnowszych osiągnięć w tej ważnej dziedzinie.

GENY KODUJĄCE ENZYMY ODPOWIEDZIALNE ZA METABOLIZM GA

Zsekwencjonowanie całych genomów rzodkiewnika i ryżu umożliwiło identyfikację większości genów kodujących enzymy zaangażowane w metabolizm GA (Tabela 1). Zostały one także opisane u innych gatunków roślin, zarówno jedno-, jak i dwuliściennych (HEDDEN i THOMAS 2006).

Geny, które kodują enzymy katalizujące wczesne reakcje w szlaku biosyntezy GA z reguły występują w pojedynczych, lub co

najwyżej kilku kopiach, a utrata któregośkolwiek z nich powoduje silnie karłowaty fenotyp rośliny. U rzodkiewnika zidentyfikowano po jednym genie *AtCPS* (ang. *ent*-copalyl diphosphate synthase, *GA1*), *AtKS* (ang. *ent*-kaurene synthase, *GA2*) i *AtEKO* (ang. *ent*-kaurene 19-oxidase, *GA3*) oraz dwa geny *AtKAO* (ang. *ent*-kaurenoic acid oxidase, *AtKAO1/2*). W genomie ryżu, pomimo obecności czterech różnych form genu

Tabela 1. Porównanie genów kodujących enzymy odpowiedzialne za metabolizm GA u rzodkiewnika i ryżu.

Enzym	Arabidopsis thaliana			Oryza sativa		
	Nazwa genu	Inna nazwa	Nr kodu AGI	Nazwa genu	Inna nazwa	Nr akces.
Syntaza pirofosforanu <i>ent</i> -kopalilu	<i>AtCPS</i>	GA1	At4g02780	<i>OsCPS</i>	-	AP004872
Syntaza <i>ent</i> -kaurenu	<i>AtKS</i>	GA2	At1g79460	<i>OsKS</i>	-	OSJN00255
19-oksydaza <i>ent</i> -kaurenu	<i>AtEKO</i>	GA3	At5g25900	<i>OsEKO</i>	<i>D35</i>	AP005471
Oksydaza kwasu <i>ent</i> -kaurenowego	<i>AtKAO1</i>	-	At1g05160	<i>OsKAO</i>	-	AP000616
	<i>AtKAO2</i>	-	At2g32440			
20-oksydaza giberelinowa	<i>AtGA20ox1</i>	GA5	At4g25420	<i>OsGA20ox1</i>	-	AC096690
	<i>AtGA20ox2</i>	-	At5g51810	<i>OsGA20ox2</i>	<i>SD1</i>	AP003561
	<i>AtGA20ox3</i>	-	At5g07200	<i>OsGA20ox3</i>	-	AP005840
	<i>AtGA20ox4</i>	-	At1g60980	<i>OsGA20ox4</i>	-	AC124836
	<i>AtGA20ox5</i>	-	At1g44090			
3-oksydaza giberelinowa	<i>AtGA3ox1</i>	GA4	At1g15550	<i>OsGA3ox1</i>	-	AC144738
	<i>AtGA3ox2</i>	-	At1g80340	<i>OsGA3ox2</i>	<i>D18</i>	AP002523
	<i>AtGA3ox3</i>	-	At4g21690			
	<i>AtGA3ox4</i>	-	At1g80330			
2-oksydaza giberelinowa (I)	<i>AtGA2ox1</i>	-	At1g78440	<i>OsGA2ox3</i>	-	AP003375
	<i>AtGA2ox2</i>	-	At1g30040	<i>OsGA2ox4</i>	-	AC132485
	<i>AtGA2ox3</i>	-	At2g34555			
2-oksydaza giberelinowa (II)	<i>AtGA2ox4</i>	-	At1g47990	<i>OsGA2ox1</i>	-	AC119288
	<i>AtGA2ox6</i>	-	At1g02400	<i>OsGA2ox2</i>	-	AP003143
2-oksydaza giberelinowa (III)	<i>AtGA2ox7</i>	-	At1g50960	<i>OsGA2ox5</i>	-	AP005187
	<i>AtGA2ox8</i>	-	At4g21200	<i>OsGA2ox6</i>	-	OSJN00156

Sekwencje nukleotydowe genów rzodkiewnika zostały zidentyfikowane w trakcie projektu AGI (ang. *Arabidopsis Genome Initiative*), natomiast numery sekwencji nukleotydowych ryżu pochodzą z banku genów NCBI. Enzymy GA2ox klasy I i II wykazują powinowactwo do GA o szkieletcie 19-węglowym (C₁₉-GA2ox), natomiast GA2ox klasy III wykazują powinowactwo do GA o szkieletcie 20-węglowym (C₂₀-GA2ox).

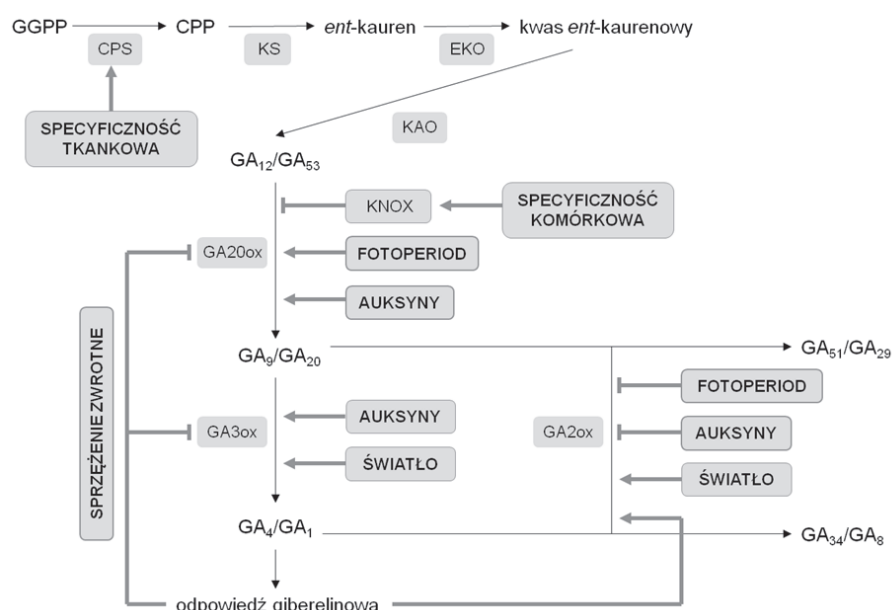
OsCPS (*OsCPS1-4*), dziewięciu form *OsKS* (*OsKS1-9*) i pięciu form *OsEKO* (*OsEKO1-5*), tylko jeden gen z każdego rodzaju zaangażowany jest w syntezę GA. Gen *OsKAO*, w odróżnieniu od *AtKAO*, występuje jako pojedynczy. Z kolei geny kodujące enzymy uczestniczące w końcowych etapach biosyntezy GA, występują jako liczne rodziny, o różnych czasowo-przestrzennych wzorach ekspresji. U rzodkiewnika zidentyfikowano pięć genów *GA20ox* (*AtGA20ox1-5*) i cztery *GA3ox* (*AtGA3ox1-4*), natomiast u ryżu

cztery geny *GA20ox* (*OsGA20ox1-4*) oraz dwa *GA3ox* (*OsGA3ox1/2*). W przypadku *GA20ox*, u rzodkiewnika zidentyfikowano osiem genów *AtGA20ox* (*AtGA20ox1-8*), a u ryżu poznano sześć *OsGA20ox* (*OsGA20ox1-6*). W związku z tym, że skutki utraty jednego genu mogą być rekompensowane w określonym stopniu przez produkty innych genów z tej samej rodziny, roślinne mutanty charakteryzują się fenotypami półkarłowatymi (SAKAMOTO i współaut. 2004, YAMAGUCHI 2008).

REGULACJA METABOLIZMU GA

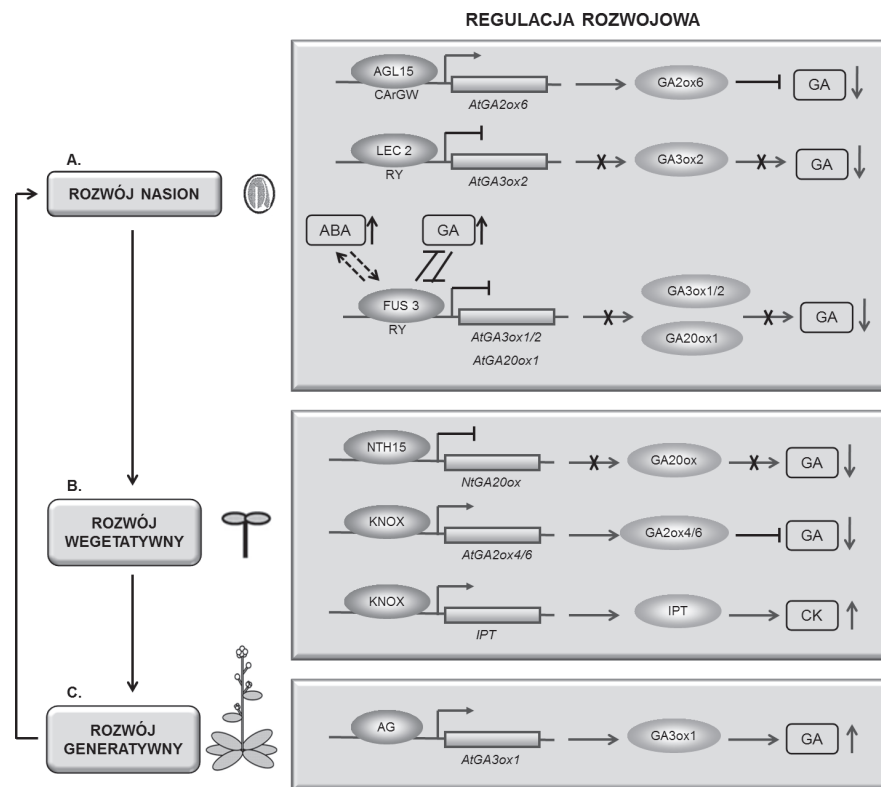
Wielofunkcyjność GA w procesach wzrostu i rozwoju roślin sugeruje, że mechanizm regulacji ich biosyntezy i dezaktywacji jest

złożony. Istotny wpływ na aktywność transkrypcyjną wszystkich genów kodujących białka odpowiedzialne za metabolizm GA mają



Ryc. 2. Główne punkty regulacji szlaku metabolizmu GA.

Ostre strzałki oznaczają stymulujący wpływ danego czynnika, natomiast tępe strzałki oznaczają negatywną regulację przez dany czynnik. Szczegóły w tekście. CPP – pirofosforan *ent*-kopalilu (ang. *ent*-copalyl pyrophosphate). Pozostałe nazwy związków oraz enzymów wyjaśniono w opisie Ryc. 1 oraz w tekście (wg YAMAGUCHI 2008, zmodyfikowane).



Ryc. 3. Rozwojowa regulacja aktywności transkrypcyjnej genów kodujących białka związane z metabolizmem GA u rzodkiewnika i tytoniu oraz z metabolizmem CK u rzodkiewnika. Szczegóły w tekście.

zarówno bodźce wewnętrzne (m. in. hormony), bodźce zewnętrzne (m. in. jakość światła, fotoperiod, temperatura, stres), jak i aktualna faza rozwoju rośliny (embriogeneza, kiełkowanie, rozwój wegetatywny i generatywny). Wymienione czynniki, które zostaną szczegółowo omówione w poszczególnych podrozdziałach, tworzą sieć powiązań warunkującą prawidłowy rozwój rośliny (Ryc. 2).

REGULACJA ROZWOJOWA – MIEJSCA BIOSYNTETY GA

Począwszy od etapu embriogenezy, poprzez kiełkowanie, rozwój wegetatywny i generatywny rośliny realizują wewnętrzny program genetyczny. Jest to ściśle związane z ekspresją poszczególnych genów, która zachodzi w komórkach różnych tkanek lub organów na różnym poziomie w zależności od fazy rozwoju rośliny (Ryc. 3).

Embriogeneza i kiełkowanie nasion

Ontogeneza rośliny rozpoczyna się od zapłodnienia komórki jajowej i ukształtowania zarodka (embriogeneza), niemniej jednak przyjmuje się, że początkiem rozwoju młodej rośliny jest kiełkowanie nasiona, w czasie którego zachodzi aktywacja zarodka, prowadząca do inicjacji wzrostu siewki. Zarówno rozwój zarodka, jak i późniejsze etapy kiełkowania, kontrolowane są głównie przez działające w antagonistyczny sposób GA oraz kwas abscysynowy (ang. abscisic acid, ABA) (WHITE i współaut. 2000). W genomie rzodkiewnika zidentyfikowano kilka czynników transkrypcyjnych typu B3 odpowiedzialnych za ścisłą regulację metabolizmu tych dwóch fitohormonów. Wśród nich wyróżniamy białka: LEC1 (ang. leafy cotyledon 1), LEC2 (ang. leafy cotyledon 2), FUS3 (ang. fusca 3) i ABI3 (ang. abscisic acid insensitive 3). W 2004 r. CURABA i współaut. zaobserwowali zwiększone stężenie białek LEC2 i FUS3 w dojrzewających nasionach rzodkiewnika. Obydwa białka poprzez bezpośrednie wiązanie do sekwencji RY, zlokalizowanej w promotorze genu *AtGA3ox2*, hamują jego aktywność transkrypcyjną, co w konsekwencji obniża zawartość GA (Ryc. 3A). Prowadzone w tym samym czasie badania GAZZARRINI i współaut. (2004) pokazały, że wzmożona ekspresja genu *FUS3*, a co za tym idzie, większa akumulacja białka FUS3, prowadzi do wzrostu zawartości ABA i hamowania ekspresji dwóch genów kodujących białka związane z biosyntezą GA: *AtGA3ox1* i *AtGA20ox1*. Białko FUS3 funkcjonuje więc jako pozytywny i negatywny regulator

zawartości odpowiednio ABA i GA. Również ilość białka FUS regulowana jest pozytywnie przez ABA i negatywnie przez GA, co sugeruje istnienie pętli sprzężenia zwrotnego, która pozwala utrzymać stan równowagi hormonalnej w rozwijających się nasionach.

We wczesnych etapach rozwoju zarodka metabolizm GA regulowany jest również przez białka AGL15 (ang. agamous-like 15), których obecność stwierdzono zarówno u roślin jedno-, jak i dwuliściennych (PERRY i współaut. 1999). Białka te należą do licznej rodziny regulatorów transkrypcji zawierających silnie konserwowaną domenę MADS (ang. mcm1, agamous, definiens and serum response factor) niezbędną do wiązania DNA i oddziaływania z innymi białkami (WANG i współaut. 2004, YAMAGUCHI 2008). Stosując specyficzne przeciwciała i techniki immunohistochemiczne wykazano, że białka AGL15 gromadzą się w cytoplazmie komórek jajowych przed zapłodnieniem i przemieszczają się do jądra we wczesnych stadiach rozwoju wieszadelfka, zarodka i bielma. Relatywnie wysoka zawartość tych białek występuje w jądrach w czasie morfogenezy zarodka, aż do rozpoczęcia wysychania nasion, m. in. u rzepaku, kukurydzy czy rzodkiewnika (PERRY i współaut. 1996). Białka AGL15 spełniają swoje funkcje regulatorowe poprzez wiązanie się z motywem CARGW (C-[A/T]rich-G), występującym w sekwencjach promotorowych różnych genów. Tego typu oddziaływania wpływają pozytywnie na aktywność transkrypcyjną, m. in. *AtGA2ox6* u rzodkiewnika, zmniejszając w rezultacie stężenie aktywnych fizjologicznie cząsteczek GA (Ryc. 3A) (WANG i współaut. 2004). Najwyższą ekspresję genów *AGL15* i *AtGA2ox6* stwierdzono we wczesnych fazach rozwoju zarodków zarówno zygotycznych, jak i somatycznych. Obniżonej akumulacji białka regulatorowego i oksydazy podczas rozwoju zarodków towarzyszy wzrost ilości GA. Jest to zrozumiałe, ponieważ GA hamują podziały komórkowe, a stymulują wzrost wydłużeniowy komórek, co w zarodkach następuje począwszy od stadium sercowatego. W kolejnej fazie torpedy ilość transkryptów obu genów znacząco maleje. Transgeniczne rośliny rzodkiewnika z dodatkową kopią ulegającego konstytutywnej ekspresji genu *AGL15*, charakteryzują się zwiększoną efektywnością formowania zarodków somatycznych z merystemów wierzchołkowych w pożywce płynnej zawierającej 2,4-D. Wyłączenie techniką knock-out genu *AtGA2ox6* oraz dodanie do pożywki GA₃ wy-

wołuje efekt odwrotny, co potwierdza, że geny *AtGA2ox6* oraz *AGL15* pełnią istotną funkcję w najwcześniejszych fazach rozwoju zarodka. Istnieją przypuszczenia, że oprócz *AtGA2ox6* występuje jeszcze kilka innych genów, których ekspresja regulowana jest przez białka *AGL15* (GRUSZCZYŃSKA i RAKO-CZY-TROJANOWSKA 2007).

W celu dokładnego określenia miejsc biosyntezy GA w pojedynczych komórkach lub tkankach rozwijających się nasion rzodkiewnika przeprowadzono wstępną analizę wzoru ekspresji kluczowych genów kodujących enzymy związane z metabolizmem GA (*CPS*, *EKO*, *GA3ox*), wykorzystując do tego rośliny transgeniczne lub metodę hybrydyzacji *in situ*. Poziom transkryptów genu *CPS* jest wysoki w wierzchołku wzrostu pędu i tkance prowaskularnej zarówno w liściach, jak i w osi zarodka, natomiast w przypadku mRNA genów *EKO*, *GA3ox1* i *GA3ox2* najwyższą aktywność transkrypcyjną zaobserwowano w korze pierwotnej oraz endodermie osi zarodka. Z przedstawionych danych wynika, że wczesne (*CPS*) i późne (*EKO*, *GA3ox*) geny kodujące enzymy związane z biosyntezą GA ulegają ekspresji w różnych typach komórek kiełkujących zarodków. Przestrzenne rozdzielanie poszczególnych etapów biosyntezy hormonu wymaga więc zapewnienia międzykomórkowego transportu, a przenoszonym związkiem jest najprawdopodobniej *ent*-kauren (YAMAGUCHI i współaut. 2001, SUN 2008).

Podobne doświadczenie wykonano na rozwijających się ziarniakach ryżu w celu sprawdzenia potencjalnego współwystępowania mRNA czterech genów kodujących białka biosyntezy GA: *OsGA20ox1*, *OsGA20ox2*, *OsGA3ox1* i *OsGA3ox2*, oraz mRNA dwóch genów kodujących elementy szlaku transdukcji sygnału giberelinowego: *Ga* i *SLR1*. Gen *Ga* koduje podjednostkę heterotrimerycznego białka G i jest pozytywnym regulatorem szlaku giberelinowego, natomiast gen *SLR1* koduje białko należące do rodziny DELLA i hamuje przekazywanie sygnału GA. Transkrypty genów *OsGA20ox1* i *OsGA3ox1* zlokalizowano tylko w nabłonku zarodka (ang. epithelium), co sugeruje, że ulegają komórkowo- i tkankowo-specyficznej ekspresji oraz pełnią określone funkcje w metabolizmie GA. Z kolei geny *OsGA20ox2*, *OsGA3ox2*, *Ga* i *SLR1* ulegają ekspresji w epitelium i w rozwijającym się wierzchołku zarodka, a geny *Ga* i *SLR1* wykazują dodatkową aktywność transkrypcyjną w komórkach warstwy aleu-

ronowej. Na tej podstawie można wyciągnąć wnioski, że zarodek jest miejscem zarówno biosyntezy GA, jak i odpowiedzi na ten hormon, podczas gdy komórki warstwy aleu-ronowej tylko miejscem odpowiedzi na GA (DAVIES 2004).

Liczne badania potwierdziły, że GA promują zarówno wzrost zarodka, jak i ułatwiają proces przebicia korzonka zarodkowego przez łupinę nasienną. U rzodkiewnika, nasiona pojedynczych mutantów biosyntezy GA: *ga1*, *ga2*, i *ga3*, podwójnych mutantów biosyntezy: *ga3ox1 ga3ox2* (MITCHUM i współaut. 2006), oraz potrójnych mutantów receptora GA: *gid1a gid1b gid1c* (GRIFFITHS i współaut. 2006), w ogóle nie kiełkują w ciemności, natomiast na świetle zaledwie w około pięciu procentach. Zaobserwowano jednak, że nasiona skiełkują jeżeli łupina nasienna wymienionych mutantów zostanie uszkodzona mechanicznie (GRIFFITHS i współaut. 2006).

Rozwój wegetatywny

Oprócz wpływu na rozwój i kiełkowanie nasion, bioaktywne GA stymulują również procesy zachodzące w wegetatywnej fazie wzrostu, takie jak wydłużanie hipokotyli, rozwój liści i wzrost korzeni. Potwierdza to fakt, iż pojedyncze mutanty rzodkiewnika *ga1*, *ga2* i *ga3*, z defektami odpowiednio w *CPS*, *KS*, *EKO*, oraz potrójny mutant receptora GA: *gid1a gid1b gid1c*, tworzą silnie karłowate fenotypy z mocno zredukowanymi korzeniami oraz małymi rozetami liściowymi (GRIFFITHS i współaut. 2006).

Spośród czterech genów *GA3ox* u rzodkiewnika, podczas rozwoju wegetatywnego ekspresji ulegają zaledwie dwa: *GA3ox1* i *GA3ox2*. Pojedynczy mutant *ga3ox1* jest półkarłowaty, podczas gdy mutant *ga3ox2* wykazuje pokrój bardzo zbliżony do rośliny typu dzikiego. Z danych tych wynika, że to gen *GA3ox1* oraz kodowane przez niego białko odgrywają główną rolę podczas wzrostu wegetatywnego tej rośliny. Z kolei podwójny mutant *ga3ox1 ga3ox2* jest bardziej karłowaty niż pojedynczy mutant *ga3ox1*, jednak nie wykazuje tak silnie karłowatego fenotypu jak mutant *ga1* (MITCHUM i współaut. 2006).

U rzodkiewnika badania poziomu transkryptów genów kodujących białka zaangażowane w metabolizm GA wykazały, że mRNA genów *CPS*, *KS* i *EKO* częściej występują w młodych niż w dojrzałych wegetatywnie siewkach. *CPS* ulega ekspresji w wierzchołkach wzrostu pędu oraz w tkance wasku-

larnej ogonków liściowych i liści. Co ciekawe, w 2-dniowych siewkach rzodkiewnika transkrypty *CPS* są wykrywalne zarówno w merystemie wierzchołkowym pędu, jak i w komórkach poniżej wierzchołka, natomiast trzy dni później tylko w regionie poniżej wierzchołka, co wskazuje na czasowo-specyficzny wzorec ekspresji. Do tej pory nie udało się jednak wyjaśnić znaczenia tego zjawiska. Z przedstawionym rozkładem mRNA genu *CPS* pokrywa się również występowanie transkryptów genów *GA3ox1* i *GA3ox2* (SUN 2008). Z kolei w korzeniach geny *CPS* i *GA3ox* ulegają ekspresji w różnych tkankach i strefach. Transkrypty *CPS* obecne są w wierzchołku wzrostu, endodermie i korze pierwotnej strefy elongacyjnej, natomiast nie występują w czapeczce i tkance waskularnej (SILVERSTONE i współaut. 1997). W przeciwieństwie do wyników przedstawionych powyżej, geny *GA3ox1* i *GA3ox2* ulegają ekspresji w tkance waskularnej strefy nieelongacyjnej korzenia (MITCHUM i współaut. 2006). Obserwacje te sugerują, że ze względu na różne miejsca ekspresji genów, do syntezy bioaktywnych GA w korzeniu musi być zapewniony sprawny transport produktów pośrednich.

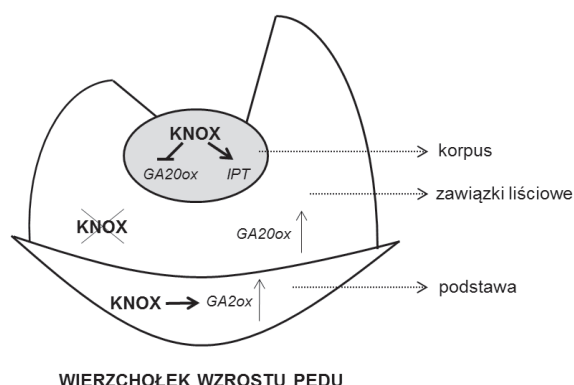
Z regulacją metabolizmu GA powiązano także funkcjonowanie białek KNOX (ang. knotted1-like homeobox) mających charakter czynników transkrypcyjnych (Ryc. 3B). Białka te zawierają charakterystyczną homeodomenę i odgrywają kluczową rolę w określaniu tożsamości merystemu wierzchołkowego pędu, jak i morfologii liści. U wielu gatunków roślin, nadekspresja genów *KNOX* powoduje silnie karłowaty fenotyp, co wynika z obniżenia zawartości GA. Szczegółowe badania genetyczne prowadzone na tytoniu ujawniły, że białkowy produkt genu *NtKNOX* (ang. *Nicotiana tabacum* homeobox 15, NTH15) hamuje biosyntezę GA w korpusie merystemu wierzchołkowego pędu poprzez obniżenie ekspresji genu *GA20ox*, natomiast brak ekspresji genów *KNOX* w rejonach otaczających korpus nie blokuje aktywności genów kodujących enzymy związane z biosyntezą cząsteczek hormonu (Ryc. 4) (TANAKA-UEGUCHI i współaut. 1998, SAKAMOTO i współaut. 2001a, HAY i współaut. 2002). U rzodkiewnika, białka *AtKNOX* (ang. shootmeristemless, STM) wpływają także na poziom transkryptów genów 2-oksydaz giberelinowych *AtGA2ox4/AtGA2ox6* i ma to miejsce przy podstawie merystemu, podobnie zresztą jak u ryżu, gdzie gen *OsGA2ox1* ulega ekspresji wokół wege-

tatywnego wierzchołka wzrostu (SAKAMOTO i współaut. 2001b). Białka KNOX wywierają również wpływ na metabolizm cytokinin (CK), inaczej jednak niż w przypadku GA, zaobserwowano stymulujący wpływ na ich biosyntezę poprzez aktywację ekspresji genów kodujących transferazy izopentenylowe (ang. isopentenyl transferases, IPT). Należy dodać, że CK odgrywają także znaczącą rolę w stymulacji ekspresji genu *GA2ox* (JASIŃSKI i współaut. 2005, YANAI i współaut. 2005, SAKAMOTO i współaut. 2006). Wszystkie przedstawione powyżej wyniki badań sugerują, że białka KNOX działają jako czynniki, które kontrolują stężenie zarówno GA, jak i CK w merystemie wierzchołkowym pędu, przez co wpływają na jego tożsamość.

Rozwój generatywny

Rozwój generatywny jest ściśle związany ze zmianami jakie zachodzą w wierzchołku wzrostu pędu. Wszystkie one prowadzą do przeorganizowania wegetatywnego wierzchołka wzrostu w kierunku tworzenia związków kwiatów lub kwiatostanów (KOPCEWICZ i LEWAK 2002). U rzodkiewnika merystem wegetatywny przekształca się najpierw w merystem kwiatostanowy, z którego poprzez różnicowanie komórek w peryferycznej strefie wykształcony zostaje merystem kwiatowy. Różnice pomiędzy tymi dwoma generatywnymi merystemami istnieją nie tylko na poziomie morfologicznym, ale również molekularnym i dotyczą zarówno przestrzennego, jak i czasowego zróżnicowania w regulacji ekspresji genów kodujących białka odpowiedzialne za tożsamość merystemu oraz genów, których białkowe produkty determinują rozwój organów kwiatowych (SABŁOWSKI 2007). Podczas gdy raz wytworzony merystem kwiatostanowy daje początek nowym, bocznym merystemom, działalność merystemu kwiatowego kończy się wraz z wykształceniem poszczególnych części kwiatu (SOUER i współaut. 2008, WILMOWICZ i współaut. 2011).

GA nie są wymagane do różnicowania poszczególnych części kwiatu, ale obecność hormonu jest podstawą ich prawidłowego rozwoju (GRIFFITHS i współaut. 2006). Na przykład do normalnego rozwoju pręcików u rzodkiewnika potrzebne jest wyższe stężenie GA, niż do rozwoju słupków, płatków korony czy działek kielicha (GOTO i PHARIS 1999). Mutanty z deficytem GA charakteryzują się zahamowanym wzrostem wydłużeniowym komórek w nitce, przez co pręciki są kró-



Ryc. 4. Rola białek KNOX w kontroli tożsamości merystemu wierzchołkowego pędu. Szczegóły w tekście (wg YAMAGUCHI 2008, zmodyfikowane).

kie, a to uniemożliwia samozapylenie (CHENG i współaut. 2004). Odpowiednia ilość GA jest niezbędna również do prawidłowego rozwoju pylników. Obecność hormonu warunkuje formowanie żywotnych ziaren pyłku i otwieranie komór pyłkowych. U mutantu rzodkiewnika *ga1-3*, charakteryzującego się znacznym niedoborem GA, ziarna pyłku nie osiągają pełnej dojrzałości (SANDERS i współaut. 1999), a mikrosporogeneza ustaje po mejozie tuż przed mitozą (CHENG i współaut. 2004). Z kolei u mutantu *ga-2* pomidora (*Solanum lycopersicum*) niedobór GA prowadzi do zahamowania mikrosporogenezy już przed mejozą (JACOBSEN i OLSZEWSKI 1991). W rozwijających się pylnikach, głównym miejscem syntezy GA jest tkanka odżywcza woreczka pyłkowego (tapetum) (KANEKO i współaut. 2003, HU i współaut. 2008), a mutanty biosyntezy GA charakteryzują się zaburzoną jej rozwojem (IZHAKI i współaut. 2002). Dochodzi u nich do przedwczesnej degradacji tapetum i zatrzymania mikrosporogenezy. Ekspresja genów *AtGA3ox3* i *AtGA3ox4* jest najwyższa przed poprzedzającą otwarcie komór pyłkowych degradacją tapetum, a następnie spada. Wyższa zawartość GA pozostaje jedynie w ziarnach pyłku, aż do ich otwarcia (HU i współaut. 2008).

Analiza wzoru ekspresji genów kodujących białka odpowiedzialne za metabolizm GA wykazała najwyższy poziom transkryptów genu *AtGA3ox1* w nitce pręcika, co wskazuje, że może być ona kluczowym miejscem syntezy hormonu (GOMEZ-MENA i współaut. 2005, MITCHUM i współaut. 2006). Jednak dalsze badania ujawniły, że we wczesnych etapach rozwoju kwiatów najwyższa aktyw-

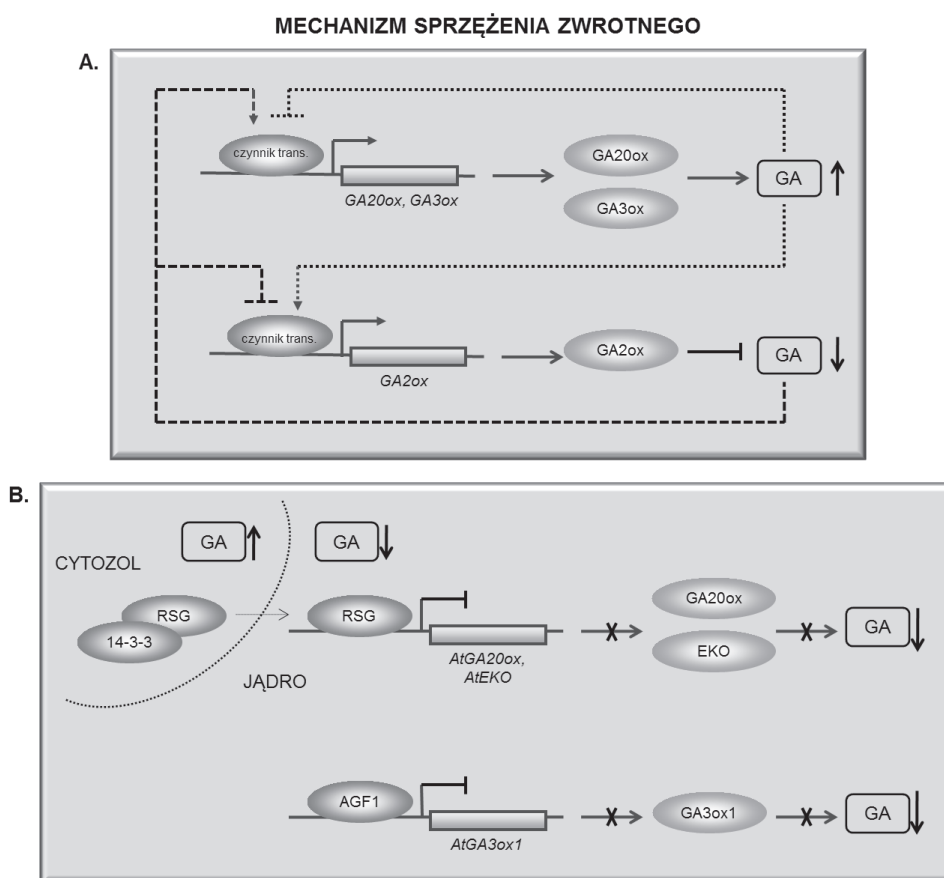
ność transkrypcyjna innych genów tj. *AtGA3ox3*, *AtGA3ox4* i *CPS* ma miejsce w pylniku (HU i współaut. 2008), a w przypadku *AtCPS* jest to jedyne miejsce ekspresji. Dane te sugerują, że wzrost nitki pręcika wymaga transportu pochodzącego z pylnika prekursora GA (SILVERSTONE i współaut. 1997).

Wśród białek wpływających na aktywność transkrypcyjną genów kodujących enzymy metabolizmu GA możemy wyróżnić białka AG (ang. agamous) (Ryc. 3C), które ulegają akumulacji w merystemie wierzchołkowym pędu, tuż po indukcji kwitnienia. Białka te, wiążąc się do sekwencji promotorowej genu *AtGA3ox1*, stymulują jego ekspresję (GOMEZ-MENA i współaut. 2005). Powoduje to wzrost zawartości GA, co w konsekwencji promuje różnicowanie się komórek i powstawanie poszczególnych części kwiatu (HEDDEN i THOMAS 2006).

REGULACJA HORMONALNA

Wśród czynników wewnętrznych regulujących ekspresję genów kodujących enzymy metabolizmu GA wyróżniamy fitohormony tj. auksyny, brasinosteroidy, etylen, kwas abscysynowy czy same gibereliny. Ich wpływ przedstawiono w poszczególnych podrozdziałach.

Homeostaza GA. Każdy organizm dąży do utrzymania stałości parametrów wewnętrznych. Jest to możliwe poprzez wykształcenie układów opartych na oddziaływaniu sygnałów stanu końcowego (wyjściowego) procesu na jego sygnały referencyjne (początkowe). Opisany proces potocznie nazywa się sprzężeniem zwrotnym i został on również opisany w przypadku działania szlaku giberelinowego. Aktywne cząsteczki hormonu wpływają pośrednio na ekspresję genów kodujących enzymy metabolizmu GA w celu utrzymania homeostazy (Ryc. 5A). U rzodkiewnika wykazano, że aktywność transkrypcyjna genów *GA20ox1* i *GA3ox1* maleje w kilka godzin po podaniu GA, natomiast ekspresja genów *AtGA2ox1* i *AtGA2ox2* znacząco wzrasta, przez co zmniejsza się zawartość bioaktywnych cząsteczek hormonu. Choć molekularny mechanizm przedstawionej powyżej regulacji nie został wyjaśniony, wiadomym jest, że u rzodkiewnika w proces ten zaangażowane są główne komponenty szlaku transdukcji sygnału giberelinowego, takie jak rozpuszczalny receptor GA – GID1 (ang. gibberellin insensitive dwarf 1), białka DELLA oraz białka z domeną F (ang. sleepy 1 u rzodkiewnika, SLY1; ang. gibberellin insensi-



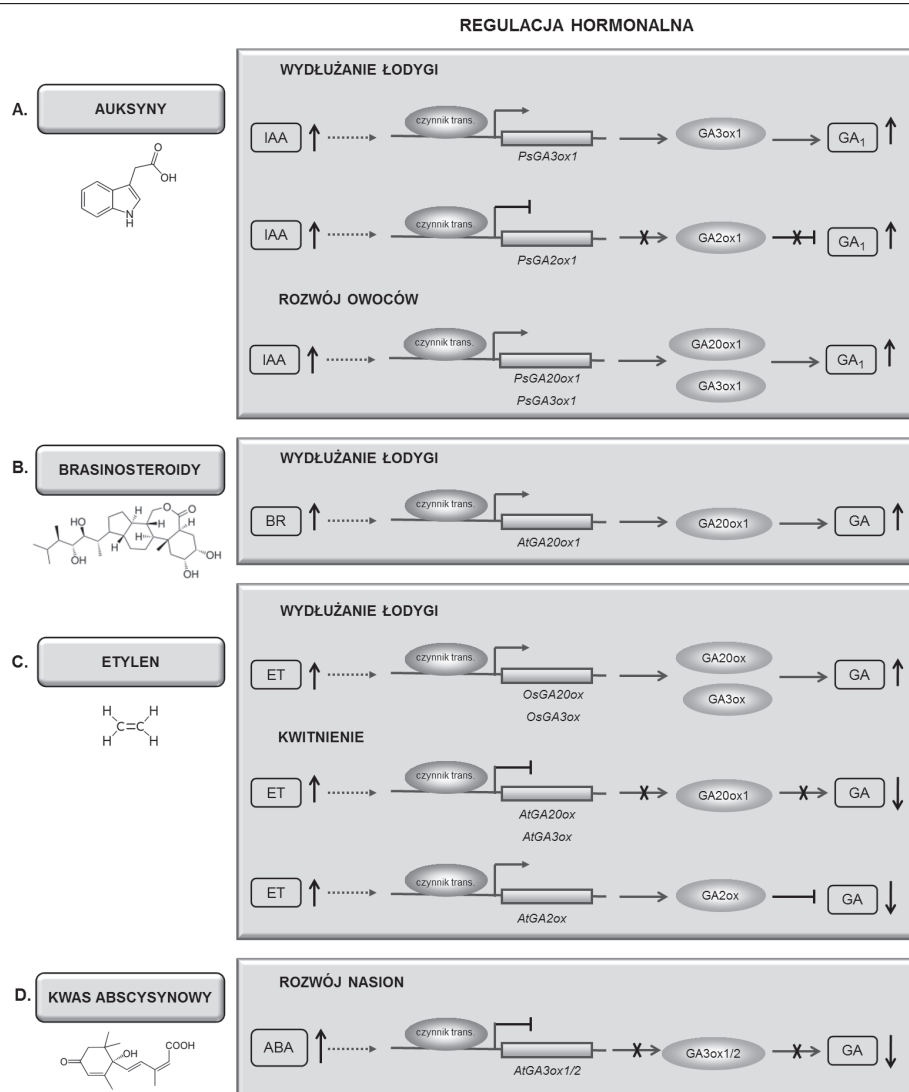
Ryc. 5. (A) Mechanizm sprzężenia zwrotnego w szlakach biosyntezy i dezaktywacji GA; (B) Udział białek RSG i AGF1 w utrzymaniu homeostazy giberelinowej.

tive dwarf 2 u ryżu, *GID2*). Mutanty *gid1* i *gid2* wykazują wysoką ekspresję genu *OsGA20ox2* (*SD1*), a co za tym idzie również wysoką zawartość GA_1 (UEGUCHI-TANAKA i współaut. 2005). Konsekwentnie u mutantów pozbawionych genów kodujących białka DELLA następuje redukcja ilości transkryptów *AtGA3ox1* i w rezultacie obniżenie stężenia GA.

W pętli sprzężenia zwrotnego dodatkowo zaangażowane są prawdopodobnie białka RSG (ang. repression of shoot growth), będące czynnikami transkrypcyjnymi zawierającymi domenę zamka leucynowego (Ryc. 5B). Sugeruje się, że są one negatywnie modulowane w wyniku agregacji z białkami 14-3-3 pod wpływem wysokiego stężenia GA. Tego typu oddziaływania hamują funkcjonowanie białek RSG i jednocześnie unieruchamiają je w cytoplazmie (IGARASHI i współaut. 2001). Zmniejszenie ilości cząsteczek hormonu powoduje rozpad kompleksu, co umożliwia przemieszczanie się białek RSG do jądra. W takiej sytuacji działanie pętli sprzężenia zwrotnego jest znacznie osłabione, bowiem białka RSG wiążąc się do sekwencji promo-

torowych genów *AtGA20ox* hamują ich aktywność transkrypcyjną. Oprócz wpływu na *AtGA20ox*, białka RSG hamują również ekspresję genów, które kodują enzymy katalizujące wczesne reakcje w szlaku biosyntezy GA (m. in. *AtEKO*), a to powoduje wytworzenie karłowatego fenotypu rośliny (FUKAZAWA i współaut. 2000, ISHIDA i współaut. 2004).

Przedstawione powyżej wyniki badań nie odnoszą się jednak do innych kluczowych genów kodujących enzymy związane z metabolizmem GA, a mianowicie *AtGA3ox*. W tym przypadku komponentami, które mogą działać w ustalaniu stanu homeostazy są białka AGF1 (ang. AT-hook protein of GA feedback regulation), mające zdolność wiązania się do 43-nukleotydowego elementu *cis* znajdującego się w promotorach genów *AtGA3ox1* (Ryc. 5B). Dokładny mechanizm funkcjonowania białek AGF1 w szlaku giberelinowym nie został jednak do tej pory wyjaśniony. Interesujący jest fakt, że wspomniany wcześniej element *cis* występujący w promotorach genów *AtGA3ox1*, nie występuje w promotorach *AtGA20ox1*, co sugeruje, że sygnał



Ryc. 6. Hormonalna regulacja aktywności transkrypcyjnej genów kodujących białka związane z metabolizmem GA u grochu, rzodkiewnika i ryżu w różnych procesach fizjologicznych. Szczegóły w tekście.

giberelinowy może regulować transkrypcję genów *AtGA3ox1* i *AtGA20ox1* w zupełnie inny sposób (MATSUSCHITA i współaut. 2007).

Regulacja przez inne hormony. Fito-hormony koordynują procesy fizjologiczne zachodzące w organizmie roślinnym. Przykładem jest stymulujący wpływ GA i auksyn na wydłużanie łodygi u wielu roślin okrytonasiennych. U grochu (*Pisum sativum*) główna, naturalna auksyna IAA (ang. indole-3-acetic acid), niezbędna jest do utrzymania odpowiedniego stężenia GA₁ w wydłużających się międzywęźlach (Ross i współaut. 2000). Usunięcie wierzchołka wzrostu, głównego miejsca biosyntezy IAA, dramatycznie redukuje ilość GA, natomiast aplikacja IAA na zdekapitowany wierzchołek całkowicie odwraca ten

proces. Na poziomie molekularnym przedstawiony eksperyment można tłumaczyć stymulującym wpływem auksyn na aktywność transkrypcyjną genu *PsGA3ox1* i hamującym wpływem na *PsGA2ox1* (Ryc. 6A) (O'NEILL i ROSS 2002). Podobne interakcje GA-IAA mają miejsce podczas wzrostu łodygi tytoniu (*Nicotiana tabacum*) i jęczmienia (*Hordeum vulgare*), co sugeruje, że auksyny wpływają na ekspresję genów kodujących enzymy biosyntezy/dezaktywacji GA w procesie wzrostu łodygi w sposób uniwersalny (YAMAGUCHI 2008).

U grochu auksyny regulują także biosyntezę GA podczas rozwoju owoców, który uzależniony jest od obecności nasion (NGO i współaut. 2002). Przy braku nasion owo-

ce nie rozwijają się, lecz proces ten można uruchomić poprzez podanie GA lub 4-chloro-IAA (OZGA i współaut. 2002). Opisany proces można wyjaśnić poprzez stymulujący wpływ produkowanej przez nasiona grochu auksyny na ekspresję genów *PsGA3ox1* i *PsGA20ox1*, których białkowe produkty są bezpośrednio zaangażowane w przekształcanie prekursorów GA w cząsteczki aktywne (Ryc. 6A). Z kolei doświadczenia na mutantach rzodkiewnika pokazały, że zmiany poziomu transkryptów genów *GA20ox* i *GA2ox* są wywoływane przez białka Aux/IAA i ARF (ang. auxin response factor). Efekt ten nie jest jednak zależny od pętli sprzężenia zwrotnego, w której pośredniczą białka DELLA (FRIGERIO i współaut. 2006). Podsumowując, przedstawione powyżej wyniki badań sugerują, że auksyny, wpływając na metabolizm GA, kontrolują wspólnie z nimi wzrost tkanek i całych organów u różnych gatunków roślin.

Innymi hormonami, które regulują metabolizm GA są brasinosteroidy (ang. brassinosteroids, BR), lecz sposób ich działania jest znacznie słabiej poznany niż w przypadku auksyn. U rzodkiewnika podanie aktywnych cząsteczek BR (24-epibrasinolid) zwiększa akumulację transkryptów genu *AtGA20ox1* (Ryc. 6B) (BOUGUIN i współaut. 2001), natomiast wzrost siewek grochu po podaniu BR nie jest konsekwencją zmian w ilości cząsteczek GA (JAGER i współaut. 2005).

Wiele informacji zebrano na temat wpływu etylenu na metabolizm GA. W badaniach nad przejściem nasion buku (*Fagus sylvatica*) ze stanu spoczynku do kiełkowania wykazano, że etylen i GA regulują ekspresję kluczowych genów kodujących białka biorące udział w biosyntezie tych hormonów – *FsACO1* (ang. aminocyclopropanecarboxylate oxidase) i *FsGA20ox1* (CALVO i współaut. 2004a, b). Traktowanie nasion buku inhibitorem biosyntezy GA – paklobutrazolem (ang. paclobutrazol, PCB) i inhibitorem biosyntezy etylenu – kwasem aminooksyocetowym (ang. aminooxyacetic acid, AOA) prowadziło do wzrostu poziomu ekspresji *FsGA20ox1* (CALVO i współaut. 2004a). Jednocześnie zaobserwowano, że GA_3 odwraca efekt AOA, a podanie etefonu (źródła etylenu) – efekt PCB. Wynika stąd, że zarówno GA, jak i etylen, hamują ekspresję genu *FsGA20ox1*, przez co przyczyniają się do obniżenia zawartości GA i pozostania nasion w stanie spoczynku. Odwrotny efekt obserwowano w przypadku wpływu obu hormonów na

ekspresję *FsACO1*, którego produkt katalizuje ostatni etap biosyntezy etylenu (CALVO i współaut. 2004b). Zarówno GA, jak i etylen, znacząco zwiększają aktywność transkrypcyjną *FsACO1*, co koreluje ze wzrostem produkcji etylenu. Inne doświadczenia wykazały, że etylen może zwiększać zawartość GA u ryżu podczas wydłużania się międzywęźli w warunkach podtopienia (Ryc. 6C) (YAMAGUCHI 2008). Najlepiej jednak znany jest hamujący wpływ etylenu na proces kwitnienia u rzodkiewnika, w wyniku zmniejszenia ilości aktywnych cząsteczek GA. Rośliny rosnące w atmosferze bogatej w etylen, lub w obecności jego prekursora, kwasu 1-amino-cyklopropano-1-karboksylowego, charakteryzują się opóźnionym zakwitaniem, tak jak mutant *ctr1-1* wykazujący konstytutywną odpowiedź etylenową. Udowodniono jednak, że proces ten można odwrócić poprzez podanie GA. Znaczne obniżenie zawartości GA_1 i GA_4 u mutantu *ctr1-1* sugeruje, że szlak etylenowy wpływa na geny kodujące enzymy metabolizmu GA, a pośrednio także na białka DELLA poprzez zmianę stężenia GA. Badania molekularne wykazały jednak, że mimo obniżonej ilości GA poziom transkryptów genów *AtGA3ox1* i *AtGA20ox1* jest wysoki. Jest to prawdopodobnie związane z pętlą sprzężenia zwrotnego, która zostaje uruchomiona na skutek obniżenia stężenia aktywnych cząsteczek hormonu. Szczegółowe wyjaśnienie tego zagadnienia wymaga dodatkowych badań (ACHARD i współaut. 2007).

Dobrze udokumentowany jest przeciwny wpływ GA i ABA na kiełkowanie nasion (Ryc. 6D). U mutantu rzodkiewnika *aba2-2* charakteryzującego się brakiem ABA stwierdzono, że zawartość GA_4 w pęczniących w ciemności nasionach jest wysoka po dezaktywacji fitochromu będącej następstwem stosowania pulsacyjnego światła dalekiej czerwieni. Wysokie stężenie GA u tego mutantu jest dodatkowo skorelowane ze zwiększoną ilością transkryptów *AtGA3ox1* i *AtGA3ox2*, w porównaniu do sytuacji obserwowanej w nasionach roślin typu dzikiego. Badania wskazują, że ABA odgrywa istotną rolę w hamowaniu biosyntezy GA u rzodkiewnika, zarówno w początkowej fazie pęcznienia, jak i w późniejszych fazach kiełkowania nasion (SEO i współaut. 2006).

REGULACJA ŚRODOWISKOWA

Wśród czynników zewnętrznych regulujących ekspresję genów kodujących enzymy metabolizmu GA wyróżniamy m. in. światło,

temperaturę i stres. Ich wpływ przedstawiono w poszczególnych podrozdziałach.

Regulacja świetlna

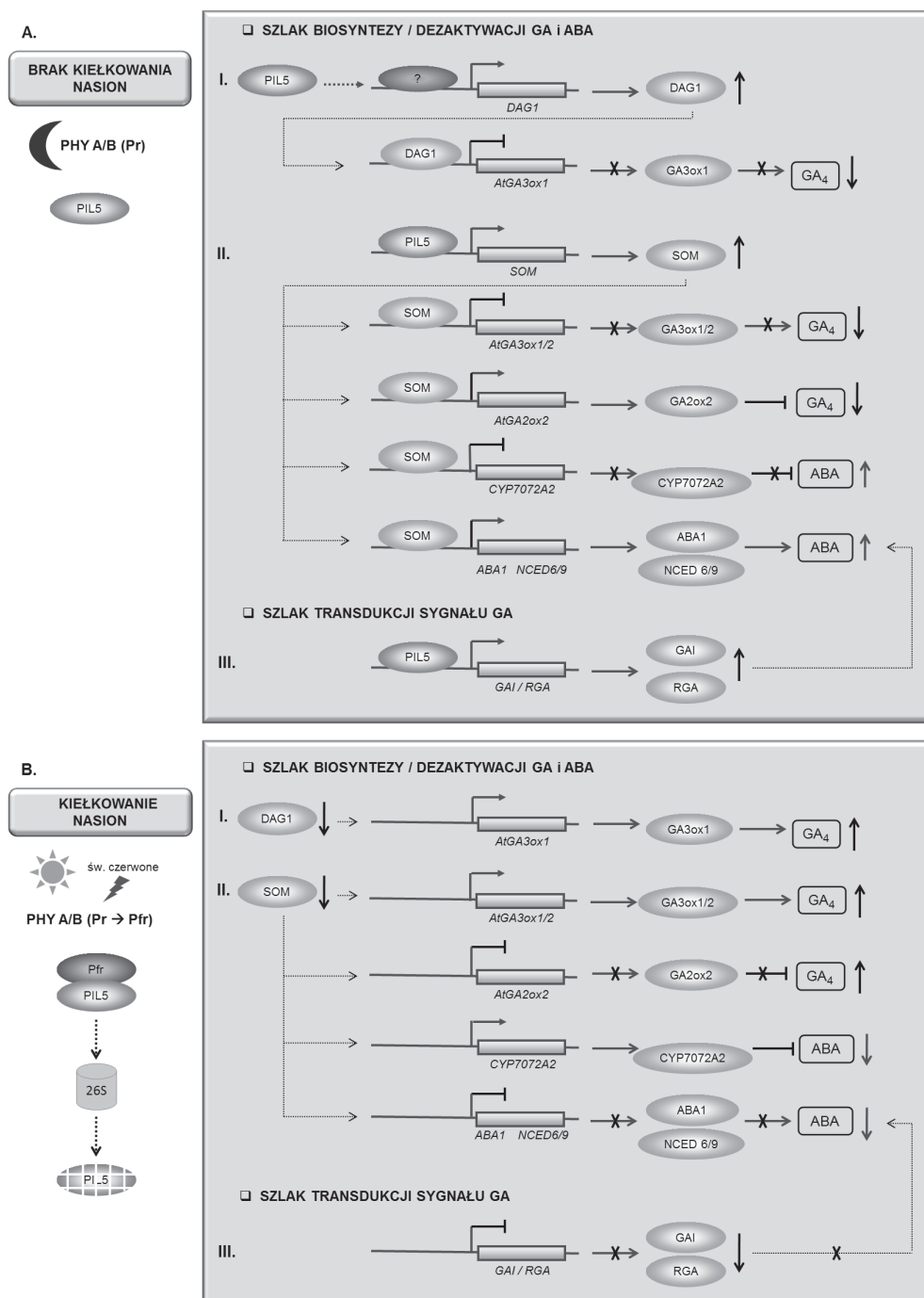
Światło jest ważnym czynnikiem wpływającym na wzrost i rozwój wszystkich organizmów. Wśród procesów zależnych od światła, w których jednocześnie zachodzą zmiany w koncentracji GA, wyróżniamy m. in. kiełkowanie nasion, deetiolację siewek oraz indukcję kwitnienia.

Kiełkowanie nasion. U większości roślin kiełkowanie nasion zależy od warunków świetlnych. Nasiona takie nazywamy fotoblastycznymi, przy czym rozróżnia się fotoblastię dodatnią, gdy światło stymuluje kiełkowanie, i ujemną, w której światło hamuje ten proces. Nasiona niewrażliwe na światło (niefotoblastyczne) wytwarza zaledwie 4,5% gatunków, niemniej jednak należy tutaj większość roślin uprawnych (m. in. zboża, rośliny motylkowate, len). Wrażliwość kiełkowania nasion na światło na ogół nie jest cechą warunkującą ten proces. Większość nasion pozytywnie fotoblastycznych kiełkuje również w ciemności, a warunki świetlne zwiększają jedynie szybkość kiełkowania i liczbę ostatecznie skielkowanych nasion. Znane są jednak nasiona, które w ogóle nie kiełkują w ciemności, a naświetlenie jest warunkiem koniecznym. Do nich zaliczamy m. in. nasiona jemioli czy sałaty odm. Grand Rapids (KOPCEWICZ i LEWAK 2002). U roślin dwuliściennych posiadających małe nasiona, tj. sałaty (*Lactuca sativa*), pomidora czy rzodkiewnika, proces kiełkowania jest pod kontrolą fitochromów. Fitochrom B (ang. phytochrome B, PHY B) zaangażowany jest w pojawiające się krótko po rozpoczęciu pęcznienia nasion reakcje wywołane niskim natężeniem światła (ang. low fluence response, LFR) oraz stymuluje kiełkowanie w odpowiedzi na światło czerwone (R) (SHINOMURA i współaut. 1996). Z kolei fitochrom A (ang. phytochrome A, PHY A) ulega akumulacji podczas pęcznienia nasion w ciemności i promuje kiełkowanie przy bardzo niskim natężeniu światła (ang. very low fluence response, VLFR).

Kluczowymi represorami w zależnym od PHY A/B procesie kiełkowania nasion są białka PIF1/PIL5 (ang. phytochrome interacting factor 1/PIF3-like 5). Jako czynniki transkrypcyjne zawierające domenę helisa-pętla-helisa (ang. basic helix loop helix, bHLH) mogą w pośredni sposób regulować aktywność transkrypcyjną kluczowych genów kodujących enzymy metabolizmu GA, jak i ABA

(OH i współaut. 2006). Przy braku światła, co ściśle wiąże się z brakiem aktywnej biologicznie formy fitochromów A/B- P_{fr} , białka PIL5 aktywują ekspresję genów *SOM* (ang. somnus) (KIM i współaut. 2008) i *DAG1* (ang. dof affecting germination 1) (GABRIELE i współaut. 2010) (Ryc. 7A I, II). W przypadku genu *SOM* odbywa się to w wyniku bezpośredniego wiązania do sekwencji promotora, natomiast w przypadku genu *DAG1* regulacja bezpośrednia nie została potwierdzona, dlatego przyjmuje się, że wzrost ekspresji tego genu zachodzi z udziałem innych czynników transkrypcyjnych. Wysokie stężenie białek SOM hamuje aktywność transkrypcyjną genów kodujących enzymy biosyntezy GA, *GA3ox1* i *GA3ox2*, oraz genu kodującego enzym katabolizmu ABA, *CYP707A2*, natomiast aktywuje ekspresję genów kodujących zarówno enzymy katabolizmu GA, *GA2ox2*, jak i biosyntezy ABA, *ABA1*, *NCED6*, *NCED9*. Prowadzi to do obniżenia stężenia GA oraz podwyższenia zawartości ABA, co w rezultacie hamuje kiełkowanie nasion. Białka DAG1 wywołują taki sam efekt, jednak w odróżnieniu od białek SOM, zmniejszają one jedynie ilość cząsteczek mRNA genu *GA3ox1* (LAU i DENG 2010). U rzodkiewnika białka PIL5 mogą także w bezpośredni sposób wpływać na ekspresję dwóch genów *DELLA*, *GAI* (ang. gibberellic acid insensitive) i *RGA* (ang. repressor of GA 1-3) (Ryc. 7A III). Prowadzi to do represji sygnału giberelinowego, a w dalszej konsekwencji do zahamowania kiełkowania nasion. Obniżenie pozytywnego wpływu szlaku giberelinowego na proces kiełkowania nasion wiąże się także ze zdolnością białek DELLA do indukcji genów kodujących białka odpowiedzialne za biosyntezę ABA (OH i współaut. 2007, PISKUREWICZ i współaut. 2009).

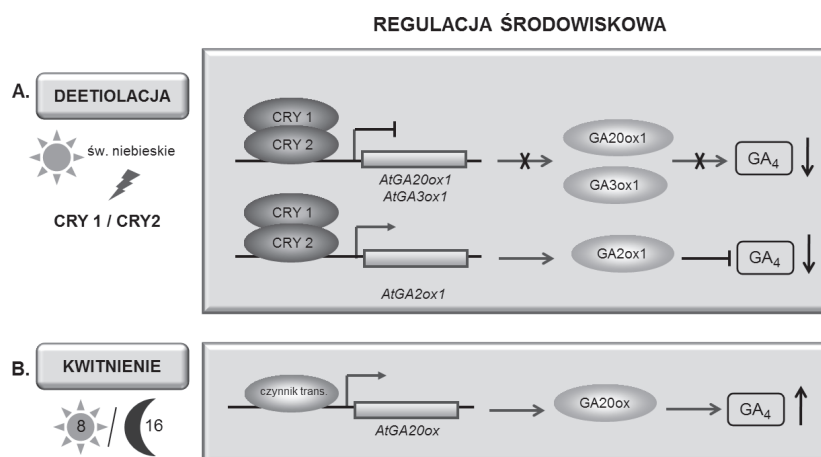
Z kolei w obecności światła fitochromy A/B w formie P_r pochłaniają fale o długości 660 nm i ulegają fotokonwersji do formy P_{fr} , w wyniku czego mogą fizycznie oddziaływać z białkami PIL5. W takiej sytuacji przy udziale ligaz ubikwitynowo-białkowych, białka PIL5 ulegają degradacji w proteasomach 26S zmieniając ekspresję kluczowych genów kodujących białka związane z metabolizmem i szlakiem transdukcji zarówno GA, jak i ABA (Ryc. 7B I, II, III). W konsekwencji dochodzi do zwiększenia akumulacji aktywnych GA i zmniejszenia ilości ABA, a następstwem tych zdarzeń jest kiełkowanie nasion rzodkiewnika (OH i współaut. 2006, 2007; LAU i DENG 2010).



Ryc. 7. Świetlna regulacja aktywności transkrypcyjnej genów kodujących białka związane ze szlakiem biosyntezy/dezaktywacji oraz transdukcji sygnału GA, jak i ABA w procesie kiełkowania nasion rzodkiewnika. Szczegóły w tekście.

W celu kompleksowego zrozumienia mechanizmów funkcjonowania białek PIL5 należałoby poznać wszystkie geny, które mogą być regulowane z ich udziałem, co stało się celem zespołu badawczego Oh w 2009 r. Oprócz wymienionych genów kodujących białka związane ze szlakami metabolizmu lub transdukcji sygnału GA i ABA, zidentyfikowano dodatkowo 166 innych genów wśród których znajdują się

geny kodujące białka związane ze szlakami auxyn i jasmonianów, np. *ARF18* (ang. auxin response factor 18), *BIM1* (ang. best1-interacting myc-like protein 1), *JAZ1* (ang. jasmonate zim domain protein 1), geny ekspansyn (*EXP8* i *EXP10*) czy gen homologa endotransglukosylazy ksyloglukanu (*XTH28*), którego białkowy produkt uczestniczy w rozluźnianiu ściany komórkowej (OH i współaut. 2009).



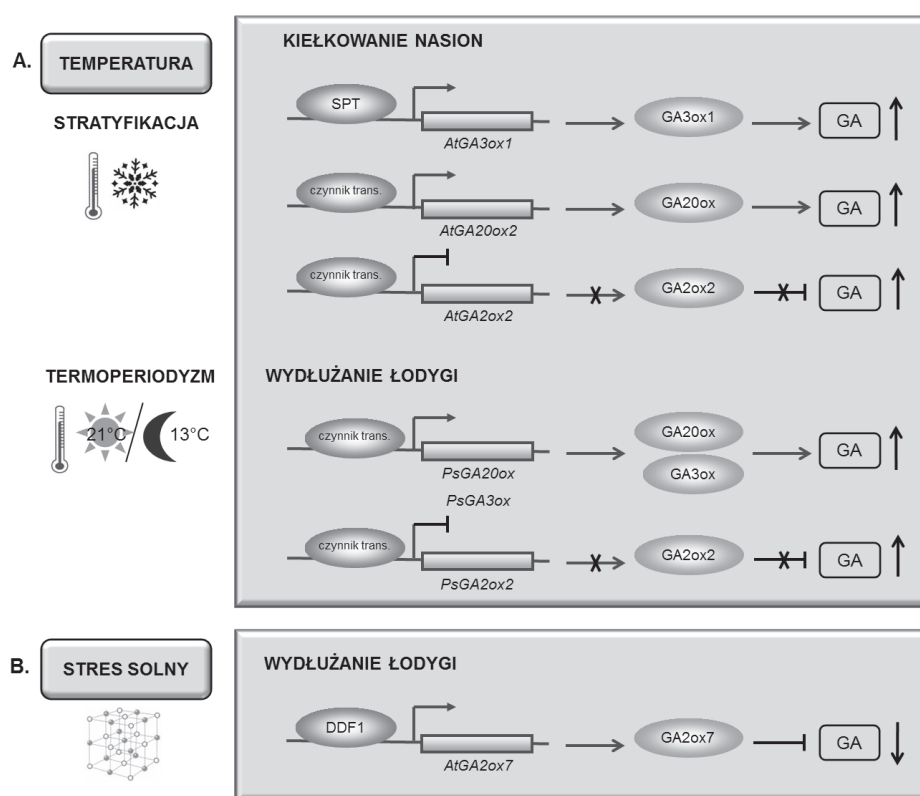
Ryc. 8. Środowiskowa regulacja aktywności transkrypcyjnej genów kodujących białka związane z metabolizmem GA u rzodkiewnika w procesie deetiolacji i kwitnienia. Szczegóły w tekście.

Deetiolacja. Rośliny wzrastające w warunkach braku światła mają długi, cienki hipokotyl z charakterystycznym hakiem wierzchołkowym, małe liścienie pozbawione chlorofilu oraz słabo rozwinięty system korzeniowy. W momencie przeniesienia na światło wzrost łodygi ulega zahamowaniu, liścienie i pierwsze liście szybko się zazielniają, a korzenie rozwijają (KOPCEWICZ i LEWAK 2002). Proces ten nosi nazwę deetiolacji, a w celu poznania jego molekularnych mechanizmów przeprowadzono liczne badania, które dały przeciwstawne rezultaty do tych opisanych powyżej dla procesu kiełkowania. Okazało się, że w siewkach grochu rosnących w ciemności, a następnie wystawionych na światło białe, po około pół godziny zawartość GA₁ znacząco maleje (O'NEIL i współaut. 2000). W procesie tym nie stwierdzono udziału PHY B, za to potwierdzono współdziałanie PHY A z kryptochromem 1 (ang. cryptochrome 1, CRY 1), które razem negatywnie regulują ekspresję genu *PsGA3ox1*, natomiast pozytywnie wpływają na ekspresję *PsGA2ox2* (FOO i współaut. 2006). Podobną sytuację zaobserwowano u rzodkiewnika – światło niebieskie pochłaniane przez CRY 1 i CRY 2 zwiększa aktywność transkrypcyjną genu *AtGA2ox1*, a zmniejsza ekspresję genów *AtGA20ox1* i *AtGA3ox1*, co prowadzi do obniżenia zawartości GA (Ryc. 8A). Po około czterech godzinach zaobserwowano jednak silny wzrost ekspresji genów kodujących białka związane z syntezą GA, *GA3ox* i *GA20ox*. Jest to prawdopodobnie skutkiem istnienia pętli sprzężenia zwrotnego, która utrzymuje stężenie GA w roślinie na odpowiednim poziomie. W

ciągu dłuższego okresu czasu, wzrost łodygi na świetle jest spowolniony w porównaniu ze wzrostem w ciemności, a jest to związane z ciągłym hamowaniem szlaku transdukcji sygnału GA (ZHAO i współaut. 2007). Przedstawione powyżej wyniki badań dotyczące siewek grochu i rzodkiewnika podkreślają istotną rolę światła, w tym światła niebieskiego, w regulacji metabolizmu GA podczas deetiolacji.

Indukcja kwitnienia. Większość badań mających na celu wyjaśnienie mechanizmów indukcji kwitnienia dotyczy rzodkiewnika, fakultatywniej rośliny dnia długiego (ang. long day plant, LDP). Zastosowanie technik biologii molekularnej pozwoliło na identyfikację u tej rośliny czterech głównych szlaków indukcji kwitnienia: autonomicznego, wernalizacyjnego, fotoperiodycznego oraz giberelinowego (QUESADA i współaut. 2005). Wszystkie te szlaki wpływają na ekspresję tzw. genów integratorów *SOC1* (ang. suppressor of overexpression of constans 1) i *LFY* (ang. leafy), których białkowe produkty regulując aktywność genów tożsamości merystemu prowadzą do zmiany wzorca rozwojowego wierzchołka wzrostu pędu, a następnie rozwoju kwiatu (AUKERMAN i SAKAI 2003). Gen *LFY* integruje sygnały pochodzące ze szlaku giberelinowego i fotoperiodycznego, podczas gdy *SOC1* integruje szlak giberelinowy, autonomiczny i wernalizacyjny (FLEET i SUN 2005).

Wiele faktów przemawia za tym, że GA biorą udział w kontroli kwitnienia roślin wrażliwych na długość dnia. U wielu LDP, jak np. jarnik solankowy (*Samolus parviflorus*) i rudbekia dwubarwna (*Rudbeckia*



Ryc. 9. Regulacja aktywności transkrypcyjnej genów kodujących białka związane z metabolizmem GA u rzodkiewnika i grochu w różnych procesach fizjologicznych podczas różnych warunków temperaturowych i stresowych. Szczegóły w tekście.

bicolor), GA całkowicie zastępuje indukcyjny fotoperiod (KING i BEN-TAL 2001). Z kolei w liściach życicy rocznej (*Lolium temulentum*) indukcyjny fotoperiod wzmacnia ekspresję *GA20ox* prowadząc do akumulacji GA₅ oraz powoduje jej transport do wierzchołka wzrostu pędu. Zastosowanie inhibitora biosyntezy GA przed indukującą kwitnienie nocą prowadzi do obniżenia stężenia tych hormonów, czemu towarzyszy zmniejszenie liczby pąków kwiatowych wytwarzanych przez rośliny (KING i współaut. 2006). U rzodkiewnika uprawianego w nieindukcyjnych warunkach dnia krótkiego (ang. short day, SD) zmiana wzorca różnicowania z wegetatywnego na generatywny poprzedzona jest akumulacją GA₄ w wierzchołku wzrostu pędu (Ryc. 8B). Podobnie jak u życicy, proces ten nie jest skorelowany ze zmianą ekspresji genów kodujących białka biosyntezy GA bezpośrednio w wierzchołku wzrostu pędu (ERIKSSON i współaut. 2006). Rola GA w regulacji kwitnienia roślin została szczegółowo omówiona w pracy przeglądowej WILMOWICZ i współaut. 2011.

Regulacja temperaturowa

U wielu gatunków roślin, ekspozycja nasion w stanie spoczynku na obniżoną temperaturę (stratyfikacja zimnem) promuje proces kiełkowania. W przypadku nasion rzodkiewnika niska temperatura stymuluje ekspresję genów *AtGA3ox1* i *AtGA20ox2*, podczas gdy aktywność transkrypcyjna *AtGA2ox2* jest obniżona, a konsekwencją tych zdarzeń jest zwiększenie stężenia GA (Ryc. 9A) (YAMAGUCHI i współaut. 2004). W regulację poziomu transkryptów genów *AtGA3ox* zaangażowane są najprawdopodobniej białka SPT (ang. spatula) będące czynnikami transkrypcyjnymi zawierającymi domenę bHLH. Białka te są ściśle spokrewnione z białkami PIL5 uczestniczącymi w regulacji świetlnej, w związku z tym, w nieco mniejszym stopniu, ale odgrywają również ważną rolę w zależności od fitochromu odpowiedzi nasion na światło (PENFIELD i współaut. 2005).

Każda roślina rejestruje stosunek temperatur w ciągu dnia i nocy (termoperiodyzm) i stosownie do tego reguluje wszelkie procesy wzrostowo-rozwojowe. U grochu kombinacja

temperatur 13°C/21°C, odpowiednio w dzień i w nocy, powoduje zmniejszenie zawartości głównie GA_1 w porównaniu z temperaturami 21°C/13°C lub 17°C/17°C (dzień/noc), co w konsekwencji prowadzi do redukcji wzrostu łodygi (Ryc. 9A) (STAVANG i współaut. 2005). Jest to spowodowane obniżeniem poziomu transkryptów genów *PsGA20ox* i *PsGA3ox*. Dokładnie odwrotną sytuację zaobserwowano w przypadku genu *PsGA20ox2*. Należy dodać, że u mutantów wykazujących ciągłą odpowiedź giberelinową praktycznie nie występuje zjawisko reakcji na chłód, co sugeruje, że GA_1 działa jako pośrednik w odpowiedziach termoperiodycznych.

Odpowiedź na stres

U jęczmienia występuje wyraźna zależność pomiędzy zahamowaniem wzrostu pędu a ekspozycją rośliny na warunki stresowe. Zauważono również, że przetrzymywanie roślin rzodkiewnika w warunkach wysokiego zasolenia powoduje redukcję ilości aktyw-

nych GA (ACHARD i współaut. 2006), co potwierdza założenie, że powolny wzrost roślin występujących na słonych podłożach jest ściśle związany z modulacją szlaku metabolizmu GA. W proces ten zaangażowane są przede wszystkim ulegające akumulacji w warunkach zasolenia białka DDF1 (ang. dwarf and delayed flowering) będące czynnikami transkrypcyjnymi blisko spokrewnionymi z białkami DREB (ang. dehydration response element-binding). Białko DDF1 oddziałując z sekwencją promotorową genu *AtGA2ox7* wpływa pozytywnie na jego ekspresję, a co za tym idzie obniża zawartość GA (Ryc. 9B). Badania na roślinach transgenicznym rzodkiewnika potwierdziły rolę genu *DDF1*, ponieważ rośliny z jego nadekspresją charakteryzowały się zredukowaną zawartością GA_4 , a ich fenotypy były wyraźnie karłowate. Wszystkie przedstawione dane jednoznacznie sugerują, że zasolenie zmniejsza ilość aktywnych GA (YAMAGUCHI 2008).

PODSUMOWANIE

Spośród 7 klas hormonów roślinnych GA stanowią niewątpliwie jedną z najciekawszych grup związków, zarówno ze względu na specyfikę i szeroki zakres działania, jak też na powiązanie z bardzo istotnymi procesami w życiu roślin. Dzięki badaniom prowadzonym w znacznej mierze na mutantach rzodkiewnika zidentyfikowano większość genów, które kodują enzymy odpowiedzialne za metabolizm GA. Poznanie wzorców ekspresji tych genów umożliwiło z kolei oznaczenie miejsc syntezy i degradacji GA oraz opisanie mechanizmów odpowiedzialnych za regulację zawartości cząsteczek hormonu w tkankach roślinnych.

Szczegółowa wiedza dotycząca sposobów regulacji biosyntezy i katabolizmu GA jest bardzo przydatna chociażby ze względu na aspekt ich praktycznego zastosowania. Gibereliny, jako produkty naturalne i całkowicie metabolizowane przez rośliny, od dawna należą do związków dopuszczonych do powszechnego użytku. Obecnie wykorzystuje się je np. w sadach owocowych jako oprysk do regulacji dojrzewania owoców, a u niektórych roślin jako czynnik indukujący partenokarpie. Efekt wytwarzania owoców bez nasion można stosunkowo łatwo osiągnąć u takich roślin jak grusze, śliwy i niektóre odmiany jabłoni. Duże możliwości praktyczne-

go wykorzystania GA istnieją w leśnictwie. Przyspieszają one bowiem wchodzenie w okres reprodukcji drzew iglastych, między innymi sosny. Rośliny transgeniczne, w których nadekspresji ulega jeden z genów kodujących białko zaangażowane w biosyntezę GA (*GA20ox*), rosną szybciej, mają liczniejsze i dłuższe włókna ksylemowe oraz charakteryzują się zwiększoną biomasą – ma to więc istotne znaczenie dla przemysłu drzewnego, a także papierniczego. Perspektywy stosowania GA do modyfikowania wzrostu i rozwoju roślin poszerzają się z uwagi na zdolność tego hormonu do zapobiegania rozwojowi niektórych chorób grzybowych, szczególnie u czereśni, wiśni i winorośli. GA są także rutynowo stosowane w przemyśle browarnianym, ponieważ stymulują kiełkowanie nasion jęczmienia, używanego do produkcji słodu. Genetyczne modyfikacje metabolizmu GA doprowadziły również do uzyskania gatunków półkarłowatych zbóż. Krótsza łodyga pozwala utrzymać większą ilość ziarna i powoduje, że zboża nie wylegają oraz są bardziej odporne na wiatr i deszcz.

Możliwości praktycznego zastosowania GA są na pewno jeszcze większe, a służą temu nieustanne badania mechanizmów ich biosyntezy i funkcjonowania. Zainteresowanym Czytelnikom polecamy artykuł dotyczą-

cy percepcji i transdukcji sygnału GA u roślin (MARCINIAK i współaut. 2010).

Podziękowania: Praca powstała dzięki wsparciu finansowemu grantu MNiSW nr N N303 811240

REGULACJA METABOLIZMU GIBERELIN U ROŚLIN

Streszczenie

Gibereliny (GA), jako jedne z siedmiu klasycznych hormonów roślinnych, zajmują kluczową pozycję w regulacji wzrostu i rozwoju roślin. Wpływają one na większość procesów fizjologicznych tj. kiełkowanie nasion, wydłużanie łodyg czy indukcję kwitnienia. Z ponad stu trzydziestu różnych GA zidentyfikowanych u roślin, grzybów i bakterii, tylko nieliczne – GA₁, GA₃, GA₄, GA₅, GA₆, GA₇ – wykazują aktywność biologiczną, natomiast pozostałe są ich prekursorami lub produktami katabolizmu.

Dzięki użyciu biochemicznych i genetycznych technik badawczych, w ciągu ostatnich kilkunastu lat poznano większość genów kodujących białka związane z biosyntezą i dezaktywacją GA, co pozwoliło na lepsze zrozumienie funkcjonowania tych fitohormonów u roślin. Większość enzymów zaangażowanych w metabolizm GA wykazuje wielofunkcyjność, dla-

tego mniejsza ich liczba, niż zakładano na początku, potrzebna jest do tworzenia takich struktur GA, które biorą czynny udział w kontroli wielu procesów fizjologicznych. Wiadomo również, że metabolizm GA jest ściśle regulowany zarówno przez bodźce wewnętrzne (m. in. hormony), bodźce zewnętrzne (m. in. jakość światła, fotoperiod, temperatura, stres), jak i aktualną fazę rozwoju rośliny (embriogeneza, kiełkowanie, rozwój wegetatywny i generatywny).

Głównym celem niniejszej pracy jest podsumowanie obecnego stanu wiedzy na temat metabolizmu GA, a przede wszystkim próba znalezienia odpowiedzi na pytanie: jak zawartość cząsteczek hormonu w poszczególnych komórkach i tkankach jest regulowana podczas wzrostu i rozwoju roślin w różnych warunkach?

REGULATION OF GIBBERELLINS METABOLISM IN PLANTS

Summary

Bioactive gibberellins (GA) are diterpene phytohormones that are biosynthesized through complex pathways and control different aspect of plants growth and development, such as seeds germination, stems elongation and floral induction. Among more than one hundred thirty GA identified from plants, fungi and bacteria, only small number of them – GA₁, GA₃, GA₄, GA₅, GA₆, GA₇ – are biologically active. Many non-bioactive GA exist in plants as precursor or deactivated metabolites. The GA metabolism pathway in plants has been studied for a long time, and large number of genes encoding the metabolism enzymes

has been identified. Many of these enzymes are multifunctional and therefore fewer enzymes than might be expected are required to synthesize the various gibberellins structures. Increasing lines of evidence indicate that GA metabolism pathway is strictly regulated during plant development and in response to hormonal and environmental signals. In this review, we summarize our current understanding of the GA metabolism pathways, genes and enzymes in plant, and first of all we discuss how GA concentration is regulated during plant development under varying condition.

LITERATURA

- ACHARD P., BAGHOUR M., CHAPPELLE A., HEDDEN P., VAN DER STRAETEN D., GENSCHIK P., MORITZ T., HARBERD N. P., 2007. *The plant stress hormone ethylene controls floral transition via DELLA-dependent regulation of floral meristem-identity genes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104, 6484–6489.
- ACHARD P., CHENG H., DE GRAUWE L., DECAT J., SCHOTTETEN H., MORITZ T., VAN DER STRAETEN D., PENG J. R., HARBERD N. P., 2006. *Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals*. Science 311, 91–94.
- AUKERMAN M. J., SAKAI H., 2003. *Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes*. Plant Cell 15, 2730–2741.
- BOUQUIN T., MEIER C., FOSTER R., NIELSEN M. E., MUNDY J., 2001. *Control of specific gene expression by gibberellin and brassinosteroid*. Plant Physiol. 127, 450–458.
- CALVO A. P., NICOLAS C., NICOLAS G., RODRIGUEZ D., 2004a. *Evidence of a cross-talk regulation of a GA 20-oxidase (FsGA20ox1) by gibberellins and ethylene during the breaking of dormancy in Fagus sylvatica seeds*. Physiol. Plant 120, 623–630.
- CALVO A. P., NICOLAS C., LORENZO O., NICOLAS G., RODRIGUEZ D., 2004b. *Evidence for positive regulation by gibberellins and ethylene of ACC oxidase expression and activity during transition from dormancy to germination in Fagus sylvatica L. seeds*. J. Plant Growth Regul. 23, 44–53.
- CHENG H., QIN L. Q., LEE S. C., FU X. D., RICHARDS D. E., CAO D. N., LUO D., HARBERD N. P., PENG J. R., 2004. *Gibberellin regulates Arabidopsis floral*

- development via suppression of DELLA protein function. *Development* 131, 1055–1064.
- CURABA J., MORITZ T., BLERVAQUE R., PARCY F., RAZ V., HERZOG M., VACHON G., 2004. *AtGA3ox2*, a key gene responsible for bioactive gibberellin biosynthesis, is regulated during embryogenesis by *LEAFY COTYLEDON 2* and *FUSCA 3* in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 136, 3660–3669.
- DAVIES P. J., 2004. *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!* Dordrecht Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- ERIKSSON S., BOHLENIUS H., MORITZ T., NILSSON O., 2006. *GA₁* is the active gibberellin in the regulation of *LEAFY* transcription and *Arabidopsis* floral initiation. *Plant Cell* 18, 2172–2181.
- FLEET C. M., SUN T. P., 2005. *A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 77–85.
- FOO E. J., PLATTEN D., WELLER J. L., REID J. B., 2006. *PhyA* and *Cry1* act redundantly to regulate gibberellin levels during de-etiolation in blue light. *Physiol. Plant* 127, 149–156.
- FRIGERIO M., ALABADI D., PEREZ-GOMEZ J., GARCIA-CARCEL L., PHILLIPS A. L., HEDDEN P., BLAZQUEZ M. A., 2006. Transcriptional regulation of gibberellin metabolism genes by auxin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 142, 553–563.
- FUKAZAWA J., SAKAI T., ISHIDA S., YAMAGUCHI I., KAMIYA Y., TAKAHASHI Y., 2000. Repression of shoot growth, a bZIP transcriptional activator, regulates cell elongation by controlling the level of gibberellins. *Plant Cell* 12, 901–915.
- GABRIELE S., RIZZA A., MARTONE J., CIRCELLI P., COSTANTINO P., VITTORIOSO P., 2010. The Dof protein *DAG1* mediates *PIL5* activity on seed germination by negatively regulating GA biosynthetic gene *AtGA3ox1*. *Plant J.* 61, 312–323.
- GAZZARRINI S., TSUCHIYA Y., LUMBA S., OKAMOTO M., MCCOURT P., 2004. The transcription factor *FUSCA 3* controls developmental timing in *Arabidopsis* through the hormones gibberellins and abscisic acid. *Dev. Cell* 7, 373–385.
- GOMEZ-MENA C., DE FOLTER S., COSTA M. M. R., ANGENENT G. C., SABLÓWSKI R., 2005. Transcriptional program controlled by the floral homeotic gene *AGAMOUS* during early organogenesis. *Development* 132, 429–438.
- GOTO N., PHARIS R. P., 1999. Role of gibberellin in the development of floral organs of the gibberellin-deficient mutant, *ga1-1*, of *Arabidopsis thaliana*. *Can. J. Bot.* 77, 944–954.
- GRIFFITHS J., MURASE K., RIEU I., ZENTELLA R., ZHANG Z. L., POWERS S. J., GONG F., PHILLIPS A. L., HEDDEN P., SUN T. P., THOMAS S. G., 2006. Genetic characterization and functional analysis of the *GID1* gibberellin receptors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18, 3399–3414.
- GRUSZCZYŃSKA A., RAKOCZY-TROJANOWSKA M., 2007. Charakterystyka genów ulegających ekspresji podczas somatycznej embriogenezy u roślin. *Biotechnologia* 76, 96–106.
- HAY A., KAUR H., PHILLIPS A., HEDDEN P., HAKE S., TSIAKIS M., 2002. The gibberellin pathway mediates *KNOTTED1*-type homeobox function in plants with different body plans. *Curr. Biol.* 12, 1557–1565.
- HEDDEN P., THOMAS S. G., 2006. *Plant hormone signaling*. Blackwell Publishing, Oxford.
- HU J., MITCHUM M. G., BARNABY N., AYELE B. T., OGAWA M., NAM E., LAI W. C., HANADA A., ALONSO J. M., ECKER J. R., SWAIN S. M., YAMAGUCHI S., KAMIYA Y., SUN T. P., 2008. Potential sites of bioactive gibberellin production during reproductive growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20, 320–336.
- IGARASHI D., ISHIDA S., FUKAZAWA J., TAKAHASHI Y., 2001. 14–3–3 proteins regulate intracellular localization of the bZIP transcriptional activator RSG. *Plant Cell* 13, 2483–2497.
- ISHIDA S., FUKAZAWA J., YUASA T., TAKAHASHI Y., 2004. Involvement of 14–3–3 signaling protein binding in the functional regulation of the transcriptional activator *REPRESSION OF SHOOT GROWTH* by gibberellins. *Plant Cell* 16, 2641–2651.
- IZHAKI A., BOROCHOV A., ZAMSKI E., WEISS D., 2002. Gibberellin regulates post-microsporogenesis processes in *petunia* anthers. *Physiol. Plant* 115, 442–447.
- JACOBSEN S. E., OLSZEWSKI N. E., 1991. Characterization of the arrest in anther development associated with gibberellin deficiency of the *gib-1* mutant of tomato. *Plant Physiol.* 97, 409–414.
- JAGER C. E., SYMONS G. M., ROSS J. J., SMITH J. J., REID J. B., 2005. The brassinosteroid growth response in pea is not mediated by changes in gibberellin content. *Planta* 221, 141–148.
- JASIŃSKI S., PIAZZA P., CRAFT J., HAY A., WOOLLEY L., RIEU I., PHILLIPS A., HEDDEN P., TSIAKIS M., 2005. *KNOX* action in *Arabidopsis* is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities. *Curr. Biol.* 15, 1560–1565.
- KANEKO M., ITOH H., INUKAI Y., SAKAMOTO T., UEGUCHI-TANAKA M., ASHIKARI M., MATSUOKA M., 2003. Where do gibberellin biosynthesis and gibberellin signaling occur in rice plants? *Plant J.* 35, 104–115.
- KIM D. H., YAMAGUCHI S., LIM S., OH E., PARK J., HANADA A., KAMIYA Y., CHOI G., 2008. *SOMNUS*, a CCCH-type zinc finger protein in *Arabidopsis*, negatively regulates light-dependent seed germination downstream of *PIL5*. *Plant Cell* 20, 1260–1277.
- KING R. W., BEN-TAL Y., 2001. A florigenic effect of sucrose in *Fuchsia hybrida* is blocked by gibberellin-induced assimilate competition. *Plant Physiol.* 125, 488–496.
- KING R., MORITZ T., EVANS L. T., MARTIN J., ANDERSEN C. H., BLUNDELL C., KARDAILSKY I., CHANDLER P. M., 2006. Regulation of flowering in the long-day grass *Lolium temulentum* by gibberellins and the *FLOWERING LOCUS T* gene. *Plant Physiol.* 141, 498–507.
- KOPCEWICZ J., LEWAK S., 2002. *Fizjologia roślin*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- LAU O. S., DENG X. W., 2010. Plant hormone signaling lightens up: integrators of light and hormones. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 571–577.
- MACMILLAN J., 2002. Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi and bacteria. *J. Plant Growth Regul.* 20, 387–442.
- MARCINIAK K., TUROWSKI T., WILMOWICZ E., FRANKOWSKI K., KĘSY J., KOPCEWICZ J., 2010. Ligazy ubikwitynowo-białkowe w szlakach sygnałowych auksyn, jasmonianów i giberelin. *Post. Biol. Kom.* 2, 409–432.
- MATSUSHITA A., FURUMOTO T., ISHIDA S., TAKAHASHI Y., 2007. *AGF1*, an *AT-hook* protein, is necessary for the negative feedback of *AtGA3ox1* encoding GA 3-oxidase. *Plant Physiol.* 143, 1152–1162.
- MITCHUM M. G., YAMAGUCHI S., HANADA A., KUWAHARA A., YOSHIOKA Y., KATO T., TABATA S., KAMIYA Y., SUN T. P., 2006. Distinct and overlapping roles of two gibberellin 3-oxidases in *Arabidopsis* development. *Plant J.* 45, 804–818.
- NGO P., OZGA J. A., REINECKE D. M., 2002. Specificity of auxin regulation of gibberellin 20-oxidase gene expression in pea pericarp. *Plant Mol. Biol.* 49, 439–448.
- OH E., YAMAGUCHI S., KAMIYA Y., BAE G., CHUNG W. I., CHOI G., 2006. Light activates the degradation of *PIL5* protein to promote seed germination

- through gibberellins in *Arabidopsis*. Plant J. 47, 124–139.
- OH E., YAMAGUCHI S., HU J., YUSUKE J., JUNG B., PAIK I., LEE H. S., SUN T. P., KAMIYA Y., CHOI G., 2007. *PIL5, a phytochrome-interacting bHLH protein, regulates gibberellins responsiveness by binding directly to the GAI and RGA promoters in Arabidopsis seeds*. Plant Cell 19, 1192–1208.
- OH E., KANG H., YAMAGUCHI S., PARK J., LEE D., KAMIYA Y., CHOI G., 2009. *Genome-wide analysis of genes targeted by PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE5 during seed germination in Arabidopsis*. Plant Cell 21, 403–419.
- OLSZEWSKI N., SUN T. P., GUBLER F., 2002. *Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways*. Plant Cell 14, 61–80.
- O'NEILL D. P., ROSS J. J., 2002. *Auxin regulation of the gibberellin pathway in pea*. Plant Physiol. 130, 1974–1982.
- O'NEILL D. P., ROSS J. J., REID J. B., 2000. *Changes in gibberellin A₁ levels and response during deetiolation of pea seedlings*. Plant Physiol. 124, 805–812.
- OZGA J. A., VAN HUIZEN R., REINECKE D. M., 2002. *Hormone and seed-specific regulation of pea fruit growth*. Plant Physiol. 128, 1379–1389.
- PENFIELD S., JOSSE E. M., KANNANGARA R., GILDAY A. D., HALLIDAY K. J., GRAHAM I. A., 2005. *Cold and light control seed germination through the bHLH transcription factor SPATULA*. Curr. Biol. 15, 1998–2006.
- PERRY S. E., LEHTI M. D., FERNANDEZ D. E., 1999. *The MADS-domain protein Agamous-Like 15 accumulates in embryonic tissues with diverse origins*. Plant Physiol. 120, 121–129.
- PERRY S. E., NICHOLS K. W., FERNANDEZ D. E., 1996. *The MADS domain protein AGL15 localizes to the nucleus during early stages of seed development*. Plant Cell 8, 1977–1989.
- PISKUREWICZ U., TURECKOVA V., LACOMBE E., LOPEZ-MOLINA L., 2009. *Far-red light inhibits germination through DELLA-dependent stimulation of ABA synthesis and ABI3 activity*. EMBO J. 28, 2259–2271.
- QUESADA V., DEAN C., SIMPSON G. G., 2005. *Regulated RNA processing in the control of Arabidopsis flowering*. Int. J. Dev. Biol. 49, 773–780.
- ROSS J. J., O'NEILL D. P., SMITH J. J., KERCKHOFFS L. H., ELLIOTT R. C., 2000. *Evidence that auxin promotes gibberellin A₁ biosynthesis in pea*. Plant J. 21, 547–552.
- SABLOWSKI R., 2007. *Flowering and determinacy in Arabidopsis*. J. Exp. Bot. 58, 899–907.
- SAKAMOTO T., KAMIYA N., UEGUCHI-TANAKA M., IWAHORI S., MATSUOKA M., 2001a. *KNOX homeodomain protein directly suppresses the expression of a gibberellin biosynthetic gene in the tobacco shoot apical meristem*. Genes Dev. 15, 581–590.
- SAKAMOTO T., KOBAYASHI M., ITOH H., TAGIRI A., KAYANO T., TANAKA H., IWAHORI S., MATSUOKA M., 2001b. *Expression of a gibberellin 2-oxidase gene around the shoot apex is related to phase transition in rice*. Plant Physiol. 125, 1508–1516.
- SAKAMOTO T., MIURA K., ITOH H., TATSUMI T., UEGUCHI-TANAKA M., ISHIYAMA K., KOBAYASHI M., AGRAWAL G. K., TAKETA S., ABE K., MIYAO A., HIROCHIKA H., KITANO H., ASHIKARI M., MATSUOKA M., 2004. *An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice*. Plant Physiol. 134, 1642–1653.
- SAKAMOTO T., SAKAKIBARA H., KOJIMA M., YAMAMOTO Y., NAGASAKI H., INUKAI Y., SATO Y., MATSUOKA M., 2006. *Ectopic expression of KNOTTED1-like homeobox protein induces expression of cytokinin biosynthesis genes in rice*. Plant Physiol. 142, 54–62.
- SANDERS P. M., BUI A. Q., WETERINGS K., MCINTIRE K. N., HSU Y. C., LEE P. Y., TRUONG M. T., BEALS T. P., GOLDBERG R. B., 1999. *Anter developmental defects in Arabidopsis thaliana male-sterile mutants*. Sex Plant Reprod. 11, 297–322.
- SCHOMBURG F. M., BIZZELL C. M., LEE D. J., ZEEVAART J. A. D., AMASINO R. M., 2003. *Overexpression of a novel class of gibberellin 2-oxidases decreases gibberellin levels and creates dwarf plants*. Plant Cell 15, 151–163.
- SEO M., HANADA A., KUWAHARA A., ENDO A., OKAMOTO M., YAMAUCHI Y., NORTH H., MARION-POLL A., SUN T. P., KOSHIBA T., KAMIYA Y., YAMAGUCHI S., NAMBARA E., 2006. *Regulation of hormone metabolism in Arabidopsis seeds: phytochrome regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellin metabolism*. Plant J. 48, 354–366.
- SHINOMURA T., NAGATANI A., HANZAWA H., KUBOTA M., WATANABE M., FURUYA M., 1996. *Action spectra for phytochrome A- and B-specific photoinduction of seed germination in Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 8129–8133.
- SILVERSTONE A. L., CHANG C., KROL E., SUN T. P., 1997. *Developmental regulation of the gibberellins biosynthetic gene GA1 in Arabidopsis thaliana*. Plant J. 12, 9–19.
- SOUER E., REBOCHO A. B., BLIEK M., KUSTERS E., DE BRUIN R. A., KOES R., 2008. *Patterning of inflorescences and flowers by the F-Box protein DOUBLE TOP and the LEAFY homolog ABER-RANT LEAF AND FLOWER of petunia*. Plant Cell 20, 2033–2048.
- STAVANG J. A., LINDGARD B., ERNTSEN A., LID S. E., MOE R., OLSEN J. E., 2005. *Thermoperiodic stem elongation involves transcriptional regulation of gibberellin deactivation in pea*. Plant Physiol. 138, 2344–2353.
- SUN T. P., 2008. *Gibberellin metabolism, perception and signaling pathways in Arabidopsis*. The Arabidopsis Book. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, doi/10.1199/tab.0103, <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis>.
- TANAKA-UEGUCHI M., ITOH H., OYAMA N., KOSHIOKA M., MATSUOKA M., 1998. *Overexpression of a tobacco homeobox gene, NTH15, decreases the expression of a gibberellin biosynthetic gene encoding GA 20-oxidase*. Plant J. 15, 391–400.
- UEGUCHI-TANAKA M., ASHIKARI M., NAKAJIMA M., ITOH H., KATOH E., KOBAYASHI M., CHOW T. Y., HSING Y. I., KITANO H., YAMAGUCHI I., MATSUOKA M., 2005. *Gibberellin Insensitive Dwarf 1 encodes a soluble receptor for gibberellin*. Nature 437, 693–698.
- VARBANOVA M., YAMAGUCHI S., YANG Y., MCKELVEY K., HANADA A., BOROCHOV R., YU F., JIKUMARU Y., ROSS J., CORTES D., MA C. J., NOEL J. P., MANDER L., SHULAEV V., KAMIYA Y., RODERMEL S., WEISS D., PICHERSKYA E., 2007. *Methylation of gibberellins by Arabidopsis GAMT1 and GAMT2*. Plant Cell 19, 32–45.
- WANG H., CARUSO L. V., DOWNIE A. B., PERRY S. E., 2004. *The embryo MADS domain protein AGAMOUS-like 15 directly regulates expression of a gene encoding an enzyme involved in gibberellin metabolism*. Plant Cell 16, 1206–1219.
- WHITE C. N., PROEBSTING W. M., HEDDEN P., RIVIN C. J., 2000. *Gibberellins and seed development in maize. I. Evidence that gibberellin/abscisic acid balance governs germination vs maturation pathways*. Plant Physiol. 122, 1081–1088.
- WILMOWICZ E., FRANKOWSKI K., GLAZIŃSKA P., SIŁOWSKA M., MARCINIĄK K., KOPCEWICZ J., 2011. *Rola giberelin w regulacji kwitnienia roślin*. Kosmos 60, 129–140.

- YAMAGUCHI S., 2006. *Gibberellin biosynthesis in Arabidopsis*. *Phytochem. Rev.* 5, 39–47.
- YAMAGUCHI S., 2008. *Gibberellin metabolism and its regulation*. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 225–251.
- YAMAGUCHI S., KAMIYA Y., SUN T. P., 2001. *Distinct cell-specific expression patterns of early and late gibberellin biosynthetic genes during Arabidopsis seed germination*. *Plant J.* 28, 443–453.
- YAMAUCHI Y., OGAWA M., KUWAHARA A., HANADA A., KAMIYA Y., YAMAGUCHI S., 2004. *Activation of gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibition of Arabidopsis thaliana seeds*. *Plant Cell* 16, 367–378.
- YANAI O., SHANI E., DOLEZAL K., TARKOWSKI P., SABLÓWSKI R., SANDBERG G., SAMACH A., ORI N., 2005. *Arabidopsis KNOXI proteins activate cytokinin biosynthesis*. *Curr. Biol.* 15, 1566–1571.
- ZHAO X., YU X., FOO E., SYMONS G. M., LOPEZ J., BENDEHAKKALU K. T., XIANG J., WELLER J. L., LIU X., REID J. B., LIN C., 2007. *A study of gibberellin homeostasis and cryptochrome-mediated blue light inhibition of hypocotyl elongation*. *Plant Physiol.* 145, 106–118.
- ZHU Y., NOMURA T., XU Y., ZHANG Y., PENG Y., MAO B., HANADA A., ZHOU H., WANG R., LI P., ZHU X., MANDER L. N., KAMIYA Y., YAMAGUCHI S., HE Z., 2006. *Elongated Uppermost Internode encodes a cytochrome P450 monooxygenase that epoxidizes gibberellins in a novel deactivation reaction in rice*. *Plant Cell* 18, 442–456.