

ЗЕЛЕННЫЙ СВЕТ РЕГУЛИРУЕТ ТРАНСКРИПЦИЮ ПЛАСТИДНЫХ ГЕНОВ И СТИМУЛИРУЕТ НАКОПЛЕНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ В РАСТЕНИЯХ

© 2013 г. М. В. Ефимова, Р. А. Карначук, В. В. Кузнецов,
член-корреспондент РАН Вл. В. Кузнецов

Поступило 15.05.2013 г.

DOI: 10.7868/S0869565213250269

Свет является ключевым фактором внешней среды, координирующим рост и развитие растений. Реализация регуляторной и фотосинтетической роли света зависит не только от его интенсивности, но и от спектрального состава. Высокой физиологической активностью характеризуются красная и синяя области спектра [1]. Зеленый свет многие исследователи относят к неактивным участкам солнечной радиации. Данная точка зрения была сформирована прежде всего на том основании, что цвет листьев подавляющего большинства растений зеленый, следовательно, именно зеленый свет растения отражают, а не используют в качестве источника энергии. Исследования отечественных и зарубежных ученых свидетельствуют о том, что зеленый свет выполняет особую регуляторную роль. Соотношение разных длин волн падающего светового потока, очевидно, служит сигналом, запускающим ту или иную программу развития, и определяет световую адаптацию растений. Важная роль соотношения красного и дальнего красного света для проявления эффекта тенеизбегания была отмечена Г.А. Бортвином в 1952 г. [2], тогда как тот же самый эффект, вызываемый определенным балансом зеленого и синего света, показан Sellaro et al. [3] и Zhang et al. [4] лишь два года назад.

Значительное внимание исследователей уделяется обсуждению рецепции зеленого света. Показано, что один из эффектов зеленого света — активация углеродного метаболизма — обращается дальним красным светом, что может свидетельствовать о фитохромном контроле данной ответной реакции [5, 6]. Обращение зеленым светом инициации цветения, накопления антоцианов [7] и открывания устьиц [8], индуцированных синим

светом, предполагает участие в реализации этих эффектов зеленого света рецепторов синего света — криптохромов и фототропинов. Другими доказательствами возможного вовлечения криптохромов и фитохромов в рецепцию зеленого света являются наличие у криптохромов флавиновой хромофорной группы, отвечающей за поглощение зеленого света и участие фитохромов в фосфорилировании криптохромов, что необходимо для функционирования рецептора.

Для объяснения ряда других физиологических ответов, запускаемых зеленым светом, предполагается существование гипотетического рецептора зеаксантинового типа [9]. Среди таких реакций можно выделить удлинение гипокотилей проростков на начальном этапе их растяжения [10], определение угла наклона черешка листа относительно стебля и экспрессию ряда генов [11].

В настоящее время достаточно обстоятельно изучены рецепторы, активируемые коротко- и длинноволновыми участками спектра; вторичные мессенджеры, усиливающие и передающие сигналы и конечные физиологические ответы, однако слабо изучена реакция растений на зеленый свет и совсем не исследовано влияние зеленого света на экспрессию пластидного генома.

В статье представлены новые данные о регуляторной и фотосинтетической функции зеленого света, свидетельствующие о его способности инициировать световое развитие растений, стимулировать накопление фотосинтетических пигментов и регулировать транскрипцию пластидного генома.

Сравнительное влияние темноты и зеленого света на морфогенез проростков и содержание фотосинтетических пигментов проводили на модельном растении *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh экотипа Columbia. Стерильные семена после трех дней стратификации проращивали в течение 7 суток в темноте или на зеленом свете ($\lambda_{\text{max}} = 545$ нм; плотность потока падающих кван-

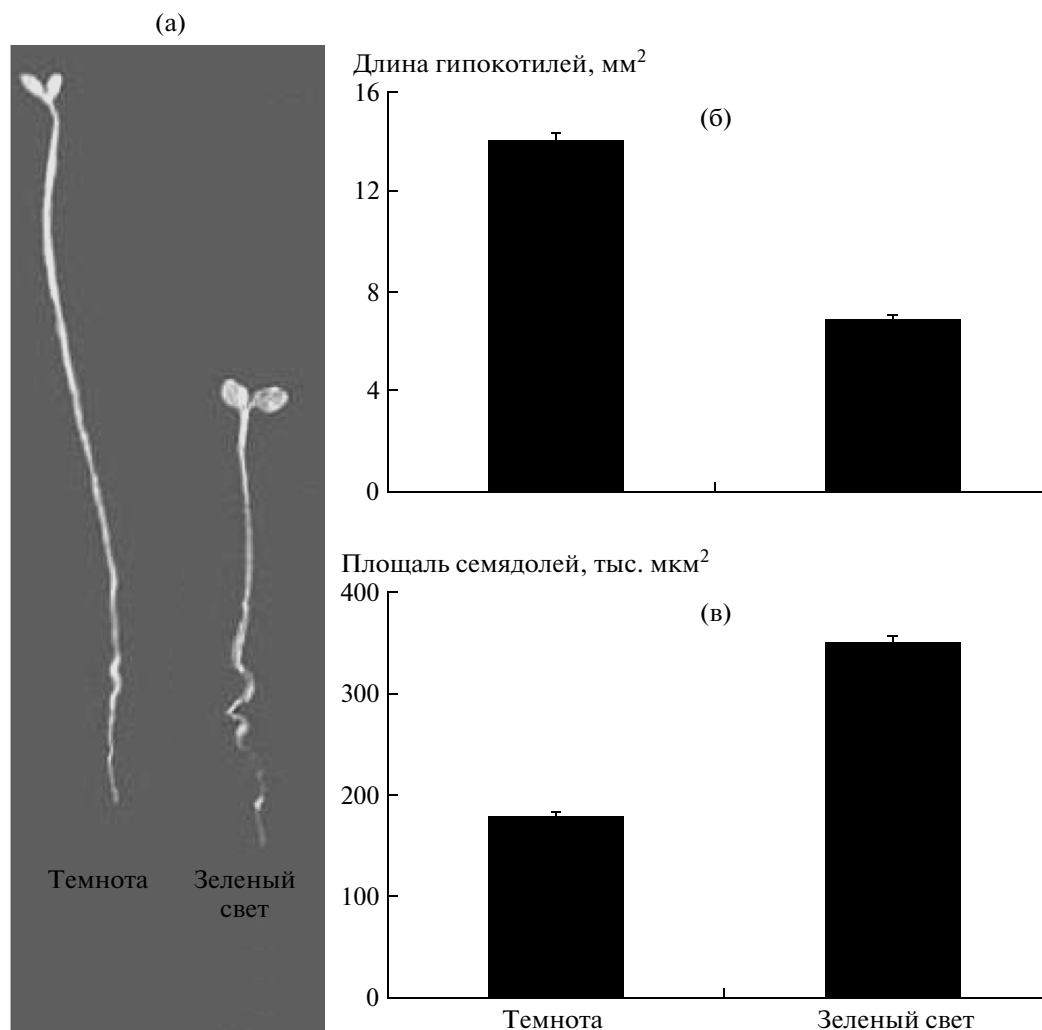


Рис. 1. Морфогенез проростков *Arabidopsis thaliana* в темноте или на зеленом свете. а — Внешний вид семисуточных проростков; б и в — ростовые показатели.

тов $90 \text{ мкмоль/м}^2 \cdot \text{с}$), фотопериод составлял 16 ч/8 ч, температура воздуха $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Контролем служили семисуточные проростки, выращенные в темноте. Длину гипокотилей проростков *A. thaliana* измеряли под лупой БМ-51-2 (Россия), площадь семядолей — под микроскопом Micros MC 100 (Австрия) с помощью цифровой камеры Moticam 2000 (Испания) и программы Motic Images Plus 2.0. Для каждого варианта измеряли по 35–50 проростков в каждой из трех биологических повторностей. Для определения содержания фотосинтетических пигментов семядоли *Arabidopsis* растирали в 96%-м этаноле и центрифугировали 15 мин при 14 000 об./мин (микроцентрифуга MiniSpin, “Eppendorf”, Германия). Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Genesys 10UV (“Thermo Fisher Scientific”, США). Концентрацию пигментов в спиртовой вытяжке рассчитывали согласно Lichtenthaler [12].

Транскрипцию пластидных генов изучали не на семядолях арабидопсиса, а на изолированных (первых) настоящих листьях ячменя, инкубированных 16 ч на дистиллированной воде в темноте (контроль) или на зеленом свете ($\lambda_{\text{max}} = 545 \text{ нм}$; плотность потока падающих квантов $120 \text{ мкмоль/м}^2 \cdot \text{с}$). Выбор листьев ячменя в качестве объекта для изучения участия зеленого света в регуляции экспрессии пластидных генов обусловлен несколькими причинами. Прежде всего, длительная экспозиция проростков *Arabidopsis* в темноте практически не позволяет выделить из них транскрипционно-активные пластиды, без чего невозможно изучать транскрипцию пластидного генома. Кроме того, в настоящее время регуляция транскрипции пластидных генов наиболее обстоятельно исследована на растениях ячменя. И, наконец, этиолированные листья ячменя характеризуются высокой чувствительностью к некоторым фитогормонам, отдельные биологиче-

Содержание фотосинтетических пигментов, мг/проросток

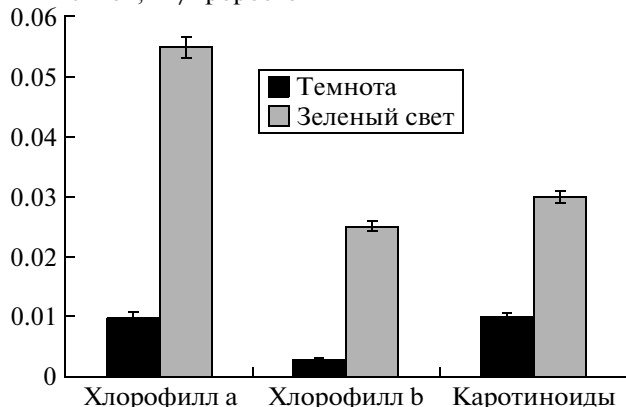


Рис. 2. Содержание фотосинтетических пигментов в проростках *Arabidopsis thaliana*, растущих в темноте и на зеленом свете.

ские эффекты которых воспроизводятся облучением растений коротко- и длинноволновыми участками спектра. Можно было на этом основа-

нии полагать, что именно растения ячменя являются наиболее удобным объектом для изучения участия зеленого света в регуляции транскрипции хлоропластных генов. Выделение пластид и run-оп транскрипцию проводили согласно методике, описанной ранее [13, 14]. Детальное описание генов и ген-специфичных фрагментов, использованных в качестве гибридизационных зондов, приведено в публикациях [15]. Достоверными изменениями интенсивности транскрипции считали двухкратные (и выше) различия опытного и контрольного вариантов. Для удобства представления результатов эти значения даны в десятичном логарифме ($\lg 2 \approx 0.3$). Все эксперименты проводили не менее трех раз. Результаты опытов представлены на рисунках как средние арифметические и их стандартные ошибки.

Освещение проростков *Arabidopsis* на протяжении 7 суток зеленым светом запускало программу фотоморфогенеза (рис. 1а). Начальные признаки светового развития проростков – формирование укороченных зародышевых стеблей (гипокотилей), крупных развернувшихся зеленых

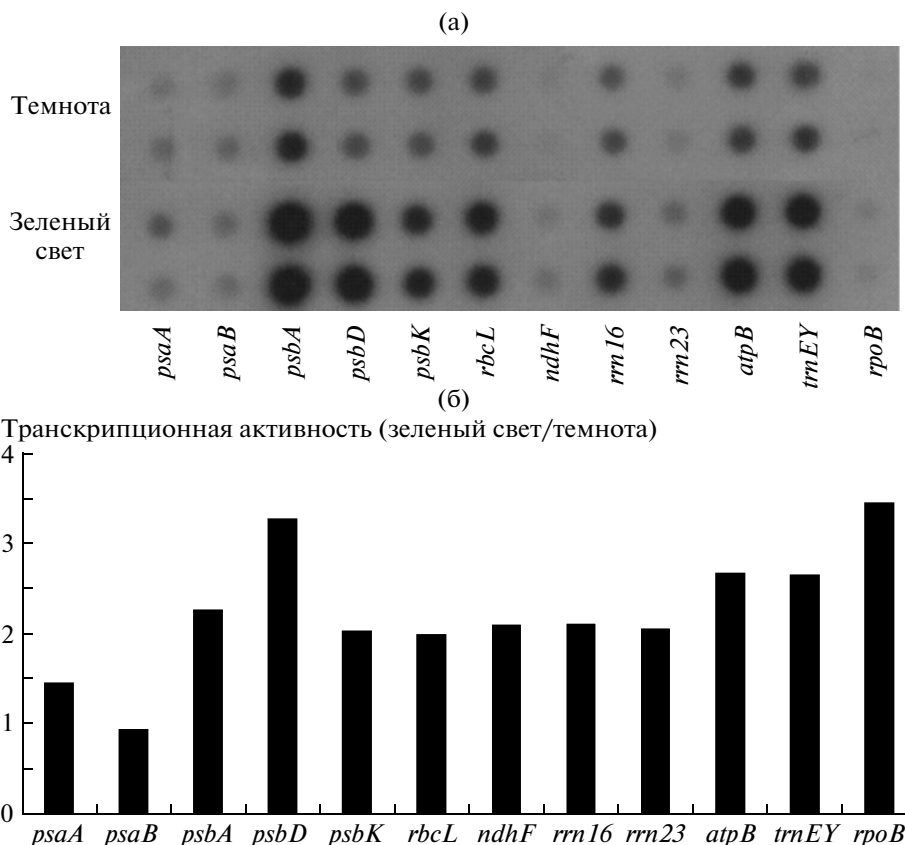


Рис. 3. а – Радиоавтограмма результатов run-оп транскрипции этиопластов первых листьев восьмидневных этиолированных проростков ячменя. Срезанные листья инкубировали 16 ч на дистиллированной воде в темноте или на зеленом свете. б – Отношение интенсивности транскрипции пластидных генов первых настоящих листьев ячменя, кратковременно освещенных зеленым светом, к интенсивности транскрипции генов ячменя в темноте. Изменение интенсивности транскрипции считалось достоверным, если сигнал отличался от контроля не менее чем в два раза.

семядолей и распрямившейся апикальной петьли. Зеленый свет вызывал двукратное уменьшение длины гипокотилия и увеличение площади семядолей проростков по сравнению с этиолированным контролем (рис. 1б, 1в).

Высокая физиологическая активность зеленого света отмечена в его влиянии на уровень фотосинтетических пигментов. Содержание хлорофилла а, хлорофилла b и каротиноидов в проростках *Arabidopsis* увеличилось в 5.5, 8 и 3 раза соответственно (рис. 2).

Анализ транскрипции пластидных генов первых настоящих листьев ячменя показал, что в темноте активно транскрибируются гены второй фотосистемы (*psbA*, *psbD* и *psbK*), большой субъединицы РБФК (*rbcL*), АТФ-синтазного комплекса (*atpB*) и гены “домашнего хозяйства” (*rrn16* и *trnEY*) (рис. 3а). Зеленый свет достоверно (в 2–3.5 раза) увеличивал транскрипцию десяти из двенадцати изученных генов (рис. 3б). Исключение составили гены первой фотосистемы (*psaA* и *psaB*). Активация транскрипции отмечена для трех генов второй фотосистемы, гена большой субъединицы РБФК, АТФ-синтазного комплекса, субъединицы F НАДФН-пластохиноноксидоредуктазы (*ndhF*) и генов “домашнего хозяйства”, среди которых были гены 16S- и 23S-рибосомной РНК (*rrn16* и *rrn23*), гены, кодирующие β-субъединицу пластидной РНК-полимеразы бактериального типа (*rpoB*) и транспортную РНК (тРНК-Глу и тРНК-Тир – *trnEY*).

Таким образом, в данной работе приводятся новые экспериментальные результаты о биологической активности зеленого света, которая проявляется в активации фотоморфогенеза, о чем свидетельствует подавление роста гипокотилия, усиление растяжения семядолей и разворачивание апикальной петьли, а также в накоплении фотосинтетических пигментов. Кроме того, впервые показано, что зеленый свет активирует транскрипцию пластидных генов. Совокупность полученных данных будет способствовать более

глубокому пониманию механизмов световой регуляции жизнедеятельности растений.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (12–04–90019–Бел_а, 12–04–31500–мол_а, 13–04–90763мол_рф_нр) и Программы фундаментальных исследований Президиума Российской Академии наук “Молекулярная и клеточная биология”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воскресенская Н.П. XXXVIII Тимирязевское чтение. М.: Наука, 1979. 47 с.
2. Borthwick H., Hendricks S., Parker M., et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1952. V. 38. P. 662–666.
3. Sellaro R., Crepy M., Trupkin S.A., et al. // Plant Physiol. 2010. V. 154. P. 401–409.
4. Zhang T., Maruhnich S.A., Folta K.M. // Plant Physiol. 2011. V. 157. P. 1528–1536.
5. Карначук Р.А., Постовалова В.М., Бельнская Е.В. и др. // Физиология растений. 1978. Т. 25. С. 268–273.
6. Карначук Р.А. // Физиология растений. 1987. Т. 34. С. 765–773.
7. Banerjee R., Schleicher E., Meier S., et al. // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. P. 14916–14922.
8. Frechilla S., Talbott L.D., Bogomolni R.A., Zeiger E. // Plant Cell Physiol. 2000. V. 41. P. 171–176.
9. Frechilla S., Zhu J., Talbott L.D., et al. // Plant Cell Physiol. 1999. V. 40. P. 949–954.
10. Folta K.M. // Plant Physiology. 2004. V. 135. P. 1407–1416.
11. Mullen J.L., Weinig C., Hangarter R.P. // Plant Cell Environ. 2006. V. 29. P. 1099–1106.
12. Lichtenthaler H.K. // Methods Enzymol. 1987. V. 148. P. 350–382.
13. Зубо Я.О., Кузнецов В.В. // Физиология растений. 2008. Т. 55. С. 114–122.
14. Ефимова М.В., Кузнецов В.В., Кравцов А.К. и др. // ДАН. 2012. Т. 445. № 6. С. 669–703.
15. Ефимова М.В., Кузнецов В.В., Кравцов А.К. и др. // Физиология растений. 2012. Т. 59. С. 32–39.