

И.Ф. Головацкая, Р.А. Карначук, М.В. Ефимова, Т.Н. Копылова, В.А. Светличный

РОЛЬ КРИПТОХРОМА 1 И ФИТОХРОМОВ А–Е В РЕГУЛЯЦИИ РОСТА АРАБИДОПСИСА НА ЗЕЛЕНОМ СВЕТУ

Изучена роль фоторецепторов криптохрома 1 (cry1) и фитохромов А–Е (phyA–Е) в регуляции роста растений на зеленом свете. Этилированные проростки *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh экотипа Landsberg *erecta* (исходная линия *Ler* и мутанты *hy4* и *hy1*, дефектные соответственно по *cry1* и *phyA–Е*) подвергали воздействию расфокусированного узкополосного импульсного лазерного излучения зеленой (ЗС, 542 нм), красной (КС, 672 нм) и дальней красной (ДКС, 730 нм) области спектра. Наблюдали разные ростовые реакции *Arabidopsis* на действие ЗС и ЗС+ДКС, зависящие от состава фоторецепторов. Отмечена наибольшая ответная ростовая реакция гипокотилей у *Ler* на действие ЗС по сравнению с *hy4* и *hy1*. Последствие ДКС аннулировало эффект действия ЗС на рост гипокотилей мутанта *hy4*, но не влияло на рост гипокотилей мутанта *hy1*. Отмечена схожесть ЗС/ДКС-эффектов с КС/ДКС-эффектами на размеры гипокотилей у *Ler*. Полученные данные свидетельствуют о совместном участии *cry1* и *phyA–Е* в регуляции роста гипокотилей на ЗС.

Свет как важнейший фактор природы активирует ряд регуляторных фоторецепторов, контролирующих программы морфогенеза [1–3]. В соответствии со спектральной специализацией выделяют фоторецепторы красного света (КС) и дальнего красного света (ДКС) (фитохромы phyA–Е), синего света (СС) (фототропины phot1–2, криптохромы cry1–2) [4, 5]. Однако до сих пор не найдены регуляторные пигменты зеленого света (ЗС).

В связи с этим изучали роль криптохрома 1 и фитохромов А–Е в регуляции ростовых реакций арабидопсиса на ранних этапах онтогенеза при деэтиоляции на зеленом и красном свете.

МЕТОДИКА

Стерилизованные в 3%-ной H_2O_2 в 80%-ном этаноле семена *Arabidopsis* высевали в чашки Петри на стерильную жидкую питательную МС-среду. Для синхронизации прорастания семена выдерживали в течение 3 сут в темноте при 6°C, затем 3 ч освещали (люминесцентные лампы ЛД-40, интенсивность света – 33 Вт/м²) и помещали в темноту.

3, 5-дневные этилированные проростки *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh экотипа Landsberg *erecta* исходной линии *Ler* и мутантов *hy4* и *hy1*, дефектных соответственно по криптохрому 1 (*cry1*) и фитохромам А–Е [6, 7], подвергали воздействию узкополосного импульсного (имп.) лазерного излучения зеленой области спектра (ЗС, длина волны 542 нм; энергия имп. 5,5 мДж; длительность имп. 10 нс, частота 1 Гц) и красной области (КС и ДКС, длина волны 672 и 730 нм, энергия имп. 3,0 и 2,4 мДж соответственно; длительность имп. 10 нс; частота 1 Гц). Это излучение при помощи оптической системы, состоящей из короткофокусной линзы и по-

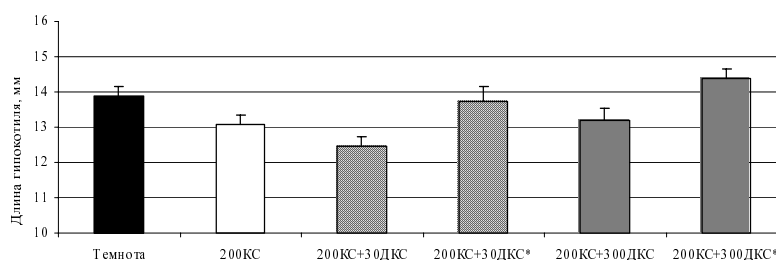
воротного зеркала, равномерно распределялось на площади 25 см² и падало на чашку Петри с растениями. Чашка Петри располагалась на вращающемся столике, что увеличивало однородность облучения. Растения освещали 300 имп. ЗС или 200 имп. КС, а затем 30 и 300 имп. ДКС. Облученность (*E*) растений с учетом отражения крышки чашки Петри (13%) была равна 1,9; 1,0 и 0,8 Вт/м² соответственно при $\lambda = 542, 672$ и 730 нм. После деэтиоляции на свету проростки выдерживали в течение 3,5 сут в темноте и затем фиксировали. Длину гипокотилей и площадь семядолей измеряли у 100 образцов каждого варианта 7-дневных проростков *A. thaliana*.

На графике приведены средние арифметические и их стандартные ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении фоторецепторов ЗС оценивали вклад известных фоторецепторов (криптохрома 1 и фитохромов А–Е) в восприятие ЗС растением. Для исследования фитохромного контроля ростовых реакций последовательно освещали растения КС и ДКС, оценивая эффект КС/ДКС-обращения. В соответствии с последними данными этот эффект проявляется при действии низкой интенсивности света и в большей степени оценивается работа phyB, тогда как phyA контролирует реакции на очень низкую и высокую интенсивность света [8, 9]. Удобной моделью для изучения фоторецепторов служили мутанты арабидопсиса с нарушенными фоторецепторами, *hy4* и *hy1*.

Деэтиоляция на КС ($\lambda = 672$ нм; 200 имп.; 1,04 Вт/м²) обуславливала уменьшение длины гипокотилей и увеличение площади семядолей 7-дневных проростков *Ler* арабидопсиса (рис. 1).



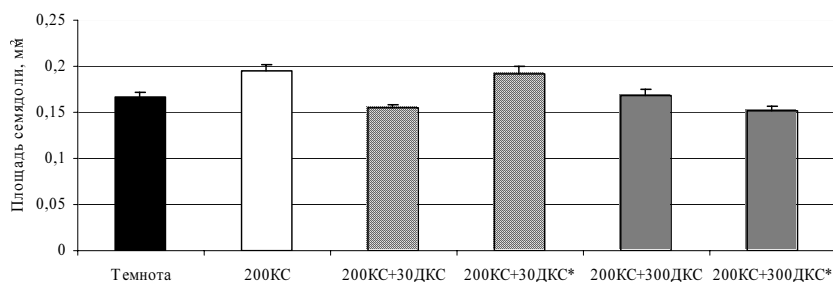


Рис. 1. Влияние КС и ДКС света на ростовые параметры 7-дневных проростков *Ler* арабидопсиса. Цифрами на оси X обозначена продолжительность освещения, имп., звездочкой – следование ДКС через 10 мин после КС

Действие ДКС зависело от продолжительности освещения и паузы перед следованием ДКС. Эффект ДКС ($\lambda = 730$ нм, 30 имп., $0,84 \text{ Вт/м}^2$) сразу после КС снимал действие последнего на рост семядолей и усиливал эффект КС на длину hypocotyl. Если же ДКС* ($\lambda = 730$ нм; 30 имп.; $0,84 \text{ Вт/м}^2$) давали через 10 мин темноты, то это «отменяло» эффект КС на рост hypocotyl, но не влияло на размеры семядолей. Увеличение продолжительности действия ДКС (300 имп.) обращало действие КС на рост семядолей, не изменяя размеры hypocotyl. Пауза между действием КС и ДКС* (300 имп.) «отменяла» все морфогенные эффекты КС.

На основе сопоставления эффектов ДКС разной продолжительности можно предположить, что отсрочка кратковременного действия ДКС* (30 имп.) на растяжение семядолей не дала эффекта обращения из-за накопления существенного пула вторичных мессенджеров КС или промежуточных форм фитохромов и низкого сигнала ДКС, так как увеличение времени действия ДКС* (300 имп.) обращало эффект КС.

Гипокотили и семядоли по-разному реагировали на освещение. КС ингибировал рост hypocotyl, увеличивая размеры семядолей. Для «отмены» действия КС на рост семядолей требовалось меньшее время действия ДКС, чем для hypocotyl. Различия в реакциях семядолей и hypocotyl на свет, по нашему мнению, связаны или с разным уровнем и набором фоторецепторов, экспрессированных в данный момент, или разным количеством и качеством вторичных мессенджеров, или разной компетентностью к их действию. В итоге в клетке экспрессируется разный набор генов и вырабатываются новые белки, позволяющие развивать адекватную реакцию на световой стимул. Возможно, стимул воспринимается в семядолях и передается в hypocotyl, поэтому требуется больше времени для реализации светового сигнала. Подтверждением предположения служат ранее полученные нами данные, показавшие более высокую чувствительность к свету семядолей по сравнению с hypocotyl при деэтиляции проростков арабидопсиса на селективном свете. Так, 30-минутное действие СС ($2,7 \text{ мкмоль квантов/м}^2\text{с}$) или ЗС ($4,2 \text{ мкмоль квантов/м}^2\text{с}$) в течение 7 сут увеличивало семядоли проростков *Ler* арабидопсиса на 15 и 22% соответственно, не влияя на размеры hypocotyl.

Разнообразие спектров действия света и кривых доза–ответ светочувствительности семядолей и hypocotyl растений можно объяснить также существовани-

ем различных форм агрегированного фитохрома (Ф) [10]. Предположение о существовании агрегированного фитохрома основывается на двух известных фактах: обогащение цитоплазмы кальцием при освещении [11] и поддержание кальцием ассоциаций молекул фитохрома [12]. Моделирование фотопреобразования димеров (ФкФк, ФкФдк, ФдкФдк) и агрегированных димеров (тетрамеров и гексамеров) фитохромов показало, что состав различных ассоциаций их молекул на насыщенном КС и ЗС отличается от такового на СС и ДКС [10]. Начальная кинетика реакций, вызванных агрегированными формами фитохрома, медленнее по сравнению с кинетикой реакций мономерной формы, и существуют переходные пики у некоторых ассоциаций на КС и ЗС. Объединение димеров в тетрамеры и гексамеры вызывает формирование отдельного пика на СС, который отсутствует на ДКС.

Эти данные также недостаточно объясняют различные кривые доза–ответ в светозависимых реакциях растений. При построении модели авторы [10] не учли разные свойства фитохромов phyA (очень низкоэнергетические реакции – ОНЭР, высокоэнергетические реакции – ВЭР) и phyB (низкоэнергетические реакции – НЭР). Не учтены существование промежуточного конформера phyA в цикле превращения Фк через Фдк (Фк⁺ phyA) с коротким периодом полураспада [13–15] и участие в поглощении СС cry1 и cry2, а также phot1 и phot2.

PhyA и phyB контролируют прерывание покоя в семенах разными способами [9]; phyB обеспечивает классически фотообратимую реакцию, отвечая на действие большей интенсивности КС и ДКС, чем phyA. Действие phyA – фотонезобратимо; оно вызывает прорастание семян при низкой интенсивности освещения УФ-А, видимой области и ДКС [8]. Световые реакции фитохромов на повторное освещение связывают с темновой реверсией. Предполагают, что из димеров фитохрома только гетеродимеры ФкФдк переносят темновое обращение, тогда как гомодимеры ФдкФдк нестабильны [16, 17].

По нашему мнению, решающую роль в направлении световых реакций могут играть вторичные посредники трансдукции сигнала света, поглощаемого разными фоторецепторами.

На рис. 2 показано, что действие ЗС на рост арабидопсиса во многом зависело от состава функционирующих фоторецепторов. Наибольшее ингибирование роста hypocotyl в ответ на действие ЗС (542 нм;

300 имп.; 1,9 Вт/м²) отмечено у проростков *Ler*, имеющих полный набор фоторецепторов. Отсутствие одного из фоторецепторов *сгу1* или *КС* (фитохромов А–Е) снижало чувствительность к ЗС проростков *hy4* или

hy1 по сравнению с исходной линией *Ler*. При этом отсутствие фитохромов у *hy1* снижало чувствительность к ЗС более существенно, чем отсутствие *сгу1* у *hy4*.

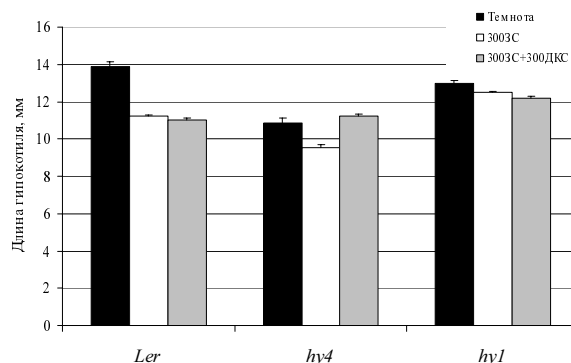


Рис. 2. Влияние ЗС и ДКС на длину hypocотилей 7-дневных проростков разных линий арабидопсиса. Цифрами обозначена продолжительность освещения, имп.

ДКС (300 имп.) (рис. 2), следующий после ЗС (300 имп.), не оказывал существенного действия на ростовые реакции hypocотилей *Ler*, что аналогично реакциям на 200КС+300ДКС (рис. 1). Подобный ответ можно связать с реакциями, опосредованными поглощением ЗС фоторецепторами *сгу1* и *phyA* и не предусматривающими обращение. На способность *сгу1* и *phyA* регулировать высокоэнергетические реакции указывают и другие авторы [18].

Участие нескольких фоторецепторов в поглощении одного участка ФАР позволяет предполагать пересечение путей трансдукции света. Исходя из этого, следует, что при проявлении эффекта 300ЗС+300ДКС у проростков *Ler* наиболее выражены результаты взаимодействия путей передачи сигналов ЗС и ДКС. Известно, что фоторецепторы *phyA* и *сгу1* регулируют рост hypocотилей на ЗС, при этом *phyA* частично подавляет действие *сгу1* на рост hypocотилей и семядолей [13]. Аналогичное взаимодействие, возможно, проявляется при действии ЗС и ДКС, при этом ЗС активирует и криптохром 1 и фитохромы, а ДКС инактивирует *phyB* и активирует *phyA*. Взаимодействие путей сигнальной трансдукции изменяет физиологический ответ на действие несколько стимулов одновременно. Согласованность действия фоторецепторов лежит в конечном чис-

ле мессенджеров и, следовательно, направлении физиологического ответа.

У проростков *hy1* не наблюдали эффекта ЗС/ДКС-обращения, так как нет фитохромов, участвующих в световых превращениях. При повреждении *сгу1* ростовые реакции *hy4* в ответ на действие ЗС были обратимы ДКС. Этот факт позволяет предполагать отсутствие контроля со стороны криптохрома 1 трансдукции светового сигнала, запускаемой фитохромами. Взаимодействие фитохромов и криптохромов при трансдукции света показано в других работах [13].

Таким образом, мы наблюдали разные ростовые реакции проростков арабидопсиса на действие ЗС и ЗС+ДКС, зависящие от состава фоторецепторов. Отмечена наибольшая ответная ростовая реакция hypocотилей у проростков *Ler* на действие ЗС по сравнению с проростками мутантов *hy4* и *hy1*, у которых нарушен синтез *сгу1* и фитохромов соответственно. Последствие дальнего красного света (730 нм) аннулировало эффект действия ЗС (542 нм) на рост hypocотилей мутанта *hy4*, но не влияло на рост hypocотилей мутанта *hy1*. Отмечена схожесть ЗС/ДКС-эффектов с КС/ДКС-эффектами на размеры hypocотилей у *Ler*. Полученные данные позволяют предполагать совместное действие фитохромов и *сгу1* в регуляции роста hypocотилей на ЗС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Карначук Р.А., Постовалова В.М., Бельская Е.В., Жуланова С.Г. Фитохромный контроль метаболизма ¹⁴С-углеводов в растениях // Физиология растений. 1978. Т. 25, № 2. С. 268–271.
2. Карначук Р.А., Головацкая И.Ф., Ефимова М.В., Хрипач В.А. Действие эпибрассинолида на морфогенез и гормональный баланс проростков арабидопсиса на зеленом свете // Физиология растений. 2002. Т. 49, № 4. С. 591–595.
3. Головацкая И.Ф. Роль криптохрома 1 и фитохромов в регуляции фотоморфогенетических реакций растений на зеленом свете // Физиология растений. 2005. Т. 52, № 6. С. 822–829.
4. Briggs W.R., Olney M.A. Photoreceptors in plant photomorphogenesis to date. Five phytochromes, two cryptochromes, one phototropin, and one superchrome // Plant Physiol. 2001. Vol. 125. P. 85–88.
5. Liscum E., Hodgson D.W., Campbell T.J. Blue Light Signaling through the Cryptochromes and Phototropins. So That's What the Blues Is All About // Plant Physiol. 2003. Vol. 133. P. 1429–1436.
6. Koornneef M., Rolff E., Spruit C.J.P. Genetic Control of Light-Inhibited Hypocotyl Elongation in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh // Z. Pflanzenphysiol. 1980. Vol. 100. P. 147–160.
7. Davis S.J., Kurepa J., Vierstra R.D. The *Arabidopsis thaliana* HY1 locus, required for phytochrome-chromophore biosynthesis, encodes a protein related to heme oxygenases // Plant Biol. 1999. Vol. 96. P. 6541–6546.
8. Botto J.F., Sa' nchez R.A., Whitelam G.C., Casal J.J. Phytochrome A Mediates the Promotion of Seed Germination by Very Low Fluences of Light and Canopy Shade Light in *Arabidopsis* // Plant Physiol. 1996. Vol. 110. P. 439–444.

9. Shinomura T., Nagatani A., Hanzawa H., Kubota M. et al. Action spectra for phytochrome A- and phytochrome B-specific photoinduction of seed germination in *Arabidopsis thaliana* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. Vol. 93. P. 8129–8133.
10. Ninkovic V., Obrenovic S. A Computer Simulation of Aggregated Phytochrome Photoconversion // Physiol. plantarum. 2000. Vol. 108. P. 330–336.
11. Roux S.J., Wayne R.O., Datta N. Role of Calcium in Phytochrome Responses: An update // Physiol. Plant. 1986. Vol. 66. P. 344–348.
12. Yamamoto K.T., Smith W.O., Furuya M. Photoreversible Ca^{2+} -dependent Aggregation of Purified Phytochrome from Etiolated Pea and Rye Seedlings // Photochem. Photobiol. 1980. Vol. 32. P. 233–240.
13. Hennig L., Poppe C., Unger S., Schäfer E. Control of Hypocotyl Elongation in *Arabidopsis thaliana* by Photoreceptor Interaction // Planta. 1999. Vol. 208. P. 257–263.
14. Hennig L., Biiiche C., Schafer E. Degradation of Phytochrome A and the High Irradiance Response in *Arabidopsis*: a Kinetic Analysis // Plant Cell Environ. 2000. Vol. 23. P. 727–734.
15. Shinomura T., Uchida K., Furuya M. Elementary Responses of Photoperception by Phytochrome A for High Irradiance Response of Hypocotyl Elongation in *Arabidopsis* // Plant Physiol. 2000. Vol. 122. P. 147–156.
16. Schmidt W., Schafer E. Dependence of Phytochrome Dark Reactions on the Initial Photostationary State // Planta. 1974. Vol. 116. P. 267–272.
17. Hennig L., Schafer E. Both Subunits of the Dimeric Plant Photoreceptor Phytochrome Require Chromophore for Stability of the Far-Red Light-Absorbing Form // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276. P. 7913–7918.
18. Furuya M., Schafer E. Photoperception and Signalling of Induction Reactions by Different Phytochromes // Trends Plant Sci. 1996. Vol. 1. P. 301–305.

Статья поступила в научную редакцию «Биологические науки» 13 декабря 2006 г., принята к печати 20 декабря 2006 г.