

УДК 581.1

РОЛЬ ФИТОХРОМА В В ФОРМИРОВАНИИ ХОЛОДОУСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ ОГУРЦА НА СВЕТУ И В ТЕМНОТЕ

© 2013 г. М. И. Сысоева*, Е. Ф. Марковская**, Е. Г. Шерудило*

* Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук, Петрозаводск

** Петрозаводский государственный университет, Петрозаводск

Поступила в редакцию 12.05.2012 г.

Изучали холодоустойчивость растений огурца (*Cucumis sativus* L.) дикого типа и мутанта, дефицитного по фитохрому В (*lh*-мутант), после кратковременного периодического (2 ч) и длительного (постоянного в течение суток) воздействия пониженной до 12°C температуры в условиях 16-часового фотопериода (день/ночь = 16/8 ч) и при круглосуточном освещении. На “раззакаливание” растения переносили в условия света или темноты при 23°C. Сделано заключение, что фитохром В участвует в формировании холодоустойчивости растений огурца в стрессовых условиях: при краткосрочном периодическом низкотемпературном воздействии ночью и при “раззакаливании” в условиях круглосуточной темноты.

Ключевые слова: *Cucumis sativus* – *lh*-мутант – кратковременное и постоянное низкотемпературное воздействие – непрерывный свет – холодоустойчивость – фитохром В

DOI: 10.7868/S0015330313020206

ВВЕДЕНИЕ

У растений как организмов, ведущих прикрепленный образ жизни, сформировались специализированные сигнальные системы, позволяющие им адекватно реагировать на изменяющиеся условия среды. В частности, свет и температура являются факторами, регулируемыми метаболизм и выполняющими информационно-сигнальную функцию [1].

Растения воспринимают световые сигналы, используя специальные фоторецепторы – фитохромы. Температурная чувствительность фитохромов [2] позволяет рассматривать их как возможных кандидатов на роль температурного сенсора у растений [3–5]. Даже небольшое варьирование температуры может повлиять на фитохромный сигналинг путем изменения взаимосвязей между различными фитохромами [6].

Одним из наиболее широко распространенных фитохромов у растений, выращиваемых на свету, является фитохром В [7], который принимает участие в термопериодических реакциях

растений [8], формировании морозоустойчивости [6], экспрессии защитных PR генов и развитии реакции сверхчувствительности в ответ на заражение [9], регуляции засухоустойчивости [10] и водного обмена [11]. Ранее нами было показано, что фитохром В задействован в процессе повышения холодоустойчивости растений огурца при кратковременных периодических низкотемпературных воздействиях и не участвует в ответной реакции на длительные низкотемпературные воздействия как в условиях короткого, так и длинного дня [12]. Причем кратковременное снижение температуры в ночной период индуцировало значительно более высокий прирост холодоустойчивости у огурца, чем действие постоянной низкой температуры в суточном цикле, что было показано на разных видах растений [13, 14]. Участие фитохрома В в ответной реакции растения на низкотемпературное воздействие и его последствии на свету и в темноте остается неисследованным. Решение этого вопроса позволит объяснить особенности жизнедеятельности растений в естественных условиях высокоширотных местообитаний и при выращивании в защищенном грунте.

Цель работы заключалась в изучении участия фитохрома В в закаливании и “раззакаливании” растений на свету и в темноте.

Сокращение: ПНТ – постоянная низкая температура.

Адрес для корреспонденции: Сысоева Марина Ивановна. 185910 Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11. Институт биологии КарНЦ РАН. Факс: 007 (8142) 76-98-10; электронная почта: sysoeva@krc.karelia.ru

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты проводили на растениях огурца (*Cucumis sativus* L.) дикого типа и мутанте, дефицитном по фитохрому В (*lh*-мутант). Мутант (*lh*) огурца (с длинным гипокотилем) был получен в лаборатории генетики Университета Вагенингена (Нидерланды), а в работе López-Juez с соавт. [15] он был охарактеризован как дефицитный по фитохрому В.

Семена огурца проращивали двое суток в термостате при температуре 28°C, высаживали в вазоны с песком (полив питательным раствором Кнопа с добавлением микроэлементов, рН 6.2–6.4) и помещали в камеры искусственного климата с относительной влажностью воздуха 60–70%, интенсивностью света 100 Вт/м² (освещение лампами ДРЛ-400) и 16-часовым фотопериодом (день/ночь = 16/8 ч) или с круглосуточным освещением. До начала эксперимента растения выращивали 2 суток при 30°C до “выноса” семядолей и затем 2 суток при 23°C.

По достижении фазы полностью раскрытых семядолей растения подвергали в течение 6 суток низкотемпературным обработкам: выращивали при постоянной низкой температуре (ПТН) 12°C или снижали температуру с 20 до 12°C на 2 ч ежедневно путем перестановки растений в другую камеру. В условиях 16-часового фотопериода кратковременное снижение температуры проводили в конце ночного или в начале светового периода, а при круглосуточном освещении – в конце 24-часового цикла. Растения контрольного варианта выдерживали при температуре 20°C на протяжении всего эксперимента. К концу низкотемпературных обработок (на 11-е сутки эксперимента) растения находились в ювенильном возрастном состоянии [16]: в контроле и в варианте краткосрочных снижений температуры имели развернутый, а в варианте ПНТ развертывающийся 1-й настоящий лист. По окончании низкотемпературных воздействий часть опытных растений брали на анализ, а остальные выдерживали еще трое суток (далее “последствие” или “раззакаливание”) при температуре 23°C, причем одну группу растений выдерживали на свету при 16-часовом фотопериоде, а другую группу – в темноте.

Холодоустойчивость растений изучали на семядольных листьях после низкотемпературных обработок и после окончания “раззакаливания”. Определяли температуру (ЛТ₅₀), вызывающую гибель 50% палисадных клеток на высечках из семядольного листа (площадью 0.5 см²) после их 5-минутного тестирующего промораживания в термoeлектрическом термостате ТЖР-02-20 (“Интерм”, Россия) в интервале температур от –10 до –15°C с шагом 0.4°C [17].

На рисунках приведены средние арифметические значения из трех независимых опытов и их стандартные ошибки. Повторность при оценке холодоустойчивости – 6-кратная. Данные обработаны статистически с использованием пакета программ Statgraphics for Windows 7.0. В статье обсуждаются величины, достоверно различающиеся при $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как постоянное, так и кратковременное низкотемпературное воздействие вызывали увеличение холодоустойчивости растений в условиях фотопериода и при круглосуточном освещении, причем независимо от продолжительности закалывающего воздействия (2, 16 или 24 ч) на свету не выявлено различий по приросту холодоустойчивости у растений огурца дикого типа и дефицитных по фитохрому В (рис. 1а). При длительном действии (16 и 24 ч) закалывающей температуры величина прироста устойчивости составляла у растений обоих генотипов 0.7°C при 16-часовом фотопериоде и 1.1°C при круглосуточном освещении и была значительно ниже, чем при ежесуточных кратковременных (2 ч) низкотемпературных воздействиях на свету, при которых прирост холодоустойчивости достигал 1.5–2.0°C (рис. 1а).

Однако, если кратковременное ежесуточное снижение температуры проводили в темноте (в конце ночного периода), то холодоустойчивость растений огурца дикого типа была значительно выше (2.8°C), чем у мутанта (1.3°C) (рис. 1б).

По завершении кратковременных низкотемпературных обработок (на свету при фотопериоде) растения переносили на “раззакаливание” в оптимальные температурные условия в темноту или на 16-часовой фотопериод. В условиях фотопериода на третьи сутки “последствия” прирост холодоустойчивости растений огурца дикого типа снизился с 2.5°C до 1.3°C, а у мутанта сохранился на высоком исходном уровне 2.5°C. На третьи сутки постоянной темноты прирост устойчивости у дикого типа снизился до 0°C, у мутанта – до 0.6°C (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Мутантные растения с отсутствием или избытком отдельных фитохромов или их комбинаций широко используются не только для выявления функций фитохромов, но и для изучения взаимодействия световых сигналов с другими факторами внешней среды, в частности, с действием низкой температуры [18].

Независимо от длительности фотопериода, прирост холодоустойчивости как у растений дикого типа, так и у *lh*-мутанта при кратковремен-

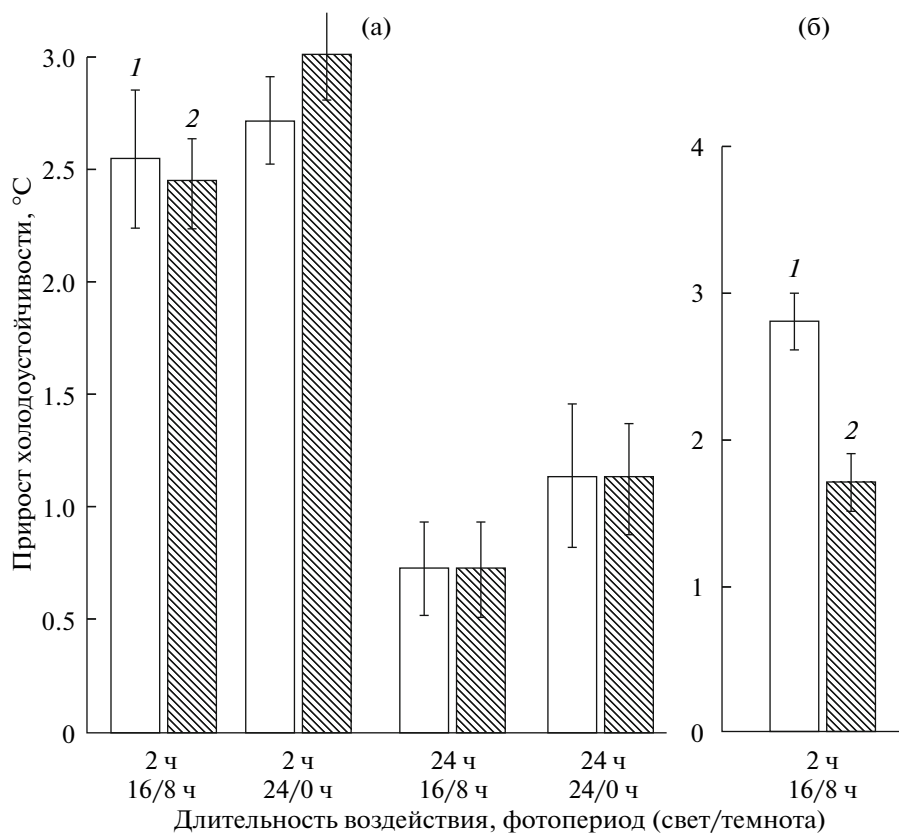


Рис. 1. Прирост холодоустойчивости растений огурца дикого типа и дефицитного по фитохрому В *lh*-мутанта при ежесуточном действии низкой закалывающей температуры (12°C) на свету (а) и в темноте (б). 1 – дикий тип, 2 – *lh*-мутант.

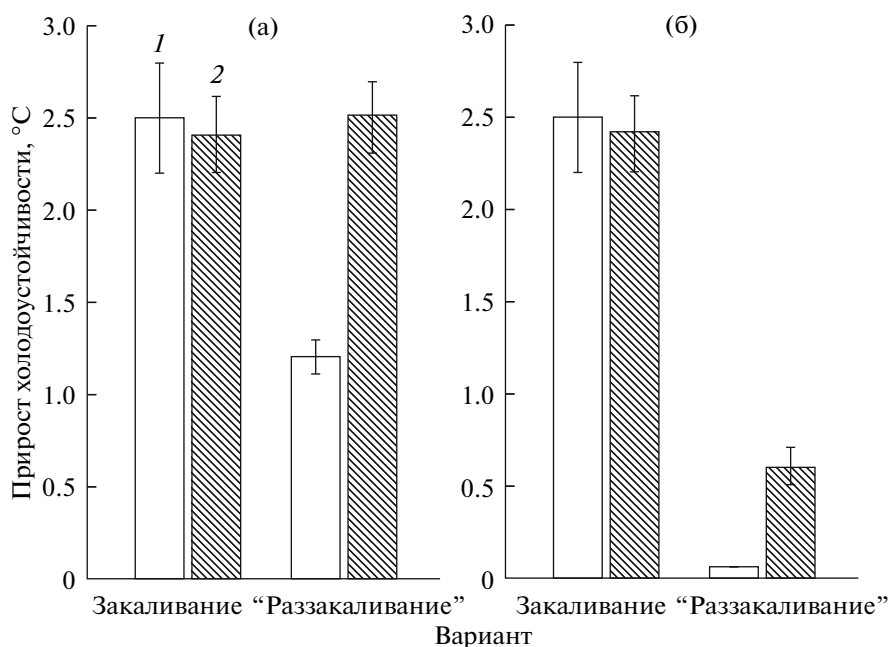


Рис. 2. Прирост холодоустойчивости растений огурца дикого типа и дефицитного по фитохрому В *lh*-мутанта при ежесуточном кратковременном (2 ч в начале дня) действии низкой закалывающей температуры (12°C) и после трехсуточного “раззакаливания” на свету (16-часовой фотопериод) (а) и в темноте (б). 1 – дикий тип, 2 – *lh*-мутант.

ном снижении температуры был в 2–3 раза выше по сравнению с ее постоянным действием. Факт более высокой устойчивости при краткосрочных периодических низкотемпературных воздействиях по сравнению с действием ПНТ ранее отмечали у различных видов и сортов растений, и было высказано предположение о существовании разных механизмов ответной реакции [13, 14, 19]. Как показали наши предыдущие исследования, реакция растительного организма на ежесуточное кратковременное снижение температуры может трактоваться как стрессовая реакция [13]. Кроме того, мы установили, что при коротком и длинном фотопериоде фитохром В необходим для повышения холодоустойчивости растений при краткосрочных низкотемпературных обработках [12]. Включение в настоящее исследование наряду с фотопериодом условий круглосуточного освещения позволило изучить роль фитохрома В при действии низкой температуры на свету и в темноте.

Оказалось, что при постоянном действии низкой температуры величина прироста холодоустойчивости была сходной у растений дикого типа и *lh*-мутанта. Аналогичная закономерность была выявлена и при кратковременном низкотемпературном воздействии в начале светового дня, а также при круглосуточном освещении. Однако при краткосрочном низкотемпературном воздействии в конце ночи величина прироста устойчивости у мутанта была значительно ниже, чем у растений дикого типа. Причем, как показали наши предыдущие исследования [12], этот эффект наблюдался и при более длительных ночных снижениях температуры. Полученные данные могут свидетельствовать о включении фитохрома В в формирование устойчивости растений огурца, что обнаружилось при краткосрочных снижениях температуры ночью.

Принципиальное отличие краткосрочных низкотемпературных воздействий от продолжительных связано с наличием периодичности действия низкой температуры, что связывает механизмы формирования холодоустойчивости с работой биологических часов. Так, известно, что индукция СВФ генов низкотемпературными воздействиями может генерироваться циркадными часами [20], которые, в свою очередь, модулируют отклики растений на холод в большей степени днем, чем ночью [21]. Известно, что фитохром реагирует на соотношение красного/дальнего красного света, а низкая температура в ночное время воспринимается им как действие дальнего красного света [6]. Сочетание низкотемпературного и светового сигналов удваивало индукцию холодового гена *Cor14* у растений ячменя [3]. У арабидопсиса при действии низкой температуры на свету выявлена экспрессия 471 гена, а в темноте —

лишь 117 генов [22]. Это дает основание предположить, что независимо от длительности фотопериода при действии постоянной низкой температуры растение реагирует только на температурный сигнал, а при кратковременных воздействиях наблюдается взаимодействие температурной и световой сигнальных систем. Хорошо известно, что в природе периодические действия низкой температуры на свету (в осенний период) служат для растения сигналом о приближении неблагоприятных условий, связанных с сезонными изменениями, и растение, перестраиваясь, реагирует на такую информацию повышением устойчивости [23, 24]. В работе Robertson с соавт. [24] показано, что действие низкой температуры в ночной период не несет растению системной информации, что, на наш взгляд, позволяет в этом случае рассматривать ответную реакцию организма как стрессовую. Причем этот эффект, как было установлено в наших предыдущих исследованиях [12], не зависит от длительности фотопериода. Данные, полученные в настоящей работе, показали, что участие фитохрома В в повышении холодоустойчивости растений огурца отмечается только в варианте с действием краткосрочных снижений температуры именно в ночной период. Таким образом, можно предположить, что при закаливании растений фитохром В включается в формирование холодоустойчивости только в условиях стресса. В качестве возможного молекулярного механизма регуляции формирования холодоустойчивости с участием фитохрома В, на наш взгляд, может выступать ремоделирование хроматина [4].

После переноса опытных растений в условия оптимальной температуры (“раззакаливание”) спустя трое суток у растений дикого типа в условиях фотопериода холодоустойчивость снизилась почти в 2 раза, а в темноте — соответствовала уровню контроля. Известно, что свет играет большую роль при “раззакалке” растений [25, с. 255–256]. Так, морозоустойчивость растений капусты снижалась в темноте быстрее, чем на свету [26], а на одном из сортов огурца показано, что в последствии кратковременных ежесуточных снижений температуры после 2 суток “раззакалки” в темноте холодоустойчивость резко снизилась, а на 6-е сутки последствия растения погибли [27]. Снижение устойчивости и даже гибель растений при “раззакаливании” в темноте связывают с быстрой тратой сахаров [13, 26, 27]. У мутанта, дефицитного по фитохрому В, при трехсуточном периоде “раззакалки” в условиях фотопериода холодоустойчивость оставалась на уровне закаленного растения и только при экспозиции в темноте отмечали ее снижение почти на 80%. Эти опыты также показали участие фито-

хрома В в ответной реакции растений огурца при “раззакаливании” в темноте. Из литературы известно, что мутанты, дефицитные по фитохрому В, обладают наименьшей степенью компактности хроматина [28], от которой зависит транскрипционная активность [29, с. 43] и, как следствие, регуляция стрессовых генов [30], в том числе и COR генов. Вероятно, именно это позволяет мутантным растениям поддерживать высокий уровень холодоустойчивости в разных условиях “раззакали”.

Таким образом, проведенное исследование показало, что фитохром В включается в формирование холодоустойчивости в стрессовых условиях как в период действия краткосрочного снижения температуры в темноте при закалке растений огурца, так и в “последействии”. Следовательно, можно предположить, что фитохром В необходим растениям для координации физиологических процессов с циркадной ритмикой в условиях кратковременных низкотемпературных воздействий, которые соответствуют стрессовым для растительного организма.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 10-04-00097_а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Креславский В.Д., Алахвердиев С.И. Механизмы трансдукции фоторецепторного сигнала в растительной клетке // Биологические мембраны. Журнал мембранной и клеточной биологии. 2006. Т. 23. С. 275–295.
2. Borthwick A.H., Hendriks S.B., Parker M.V., Toole L.H., Toole V.K. A Reversible Photoreaction Controlling Seed Germination // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1952. V. 38. P. 662–666.
3. Crosatti C., Polverino de Laureto P., Bassi R., Cattivelli L. The Interaction between Cold and Light Controls the Expression of the Cold-Regulated Barley Gene *cor14b* and the Accumulation of the Corresponding Protein // Plant Physiol. 1999. V. 119. P. 671–680.
4. Kim H.-J., Kim Y.-K., Park J.-Y., Kim J. Light Signaling Mediated by Phytochrome Plays an Important Role in Cold-Induced Gene Expression through the C-Repeat/Dehydration Responsive Element (C/DRE) in *Arabidopsis thaliana* // Plant J. 2002. V. 229. P. 693–704.
5. Franklin K.A. Light and Temperature Signal Crosstalk in Plant Development // Curr. Opin. Plant Biol. 2009. V. 12. P. 63–68.
6. Franklin K.A., Whitelam G.C. Light-Quality Regulation of Freezing Tolerance in *Arabidopsis thaliana* // Nat. Genet. 2007. V. 19. P. 1410–1413.
7. Sharrock R.A., Clack T. Patterns of Expression and Normalized Levels of the Five Arabidopsis Phytochromes // Plant Physiol. 2002. V. 130. P. 442–456.
8. Thingnaes E., Torre S., Moe R. The Role of Phytochrome B, D and E in Thermoperiodic Responses of *Arabidopsis thaliana* // Plant Growth Regul. 2008. V. 56. P. 53–59.
9. Genoud T., Buchala A.J., Chua N.-H., Mátreaux J.-P. Phytochrome Signalling Modulates the SA-Perceptive Pathway in *Arabidopsis* // Plant J. 2002. V. 31. P. 87–95.
10. Liu J., Zhang F., Zhou J., Chen F., Wang B., Xie X. Phytochrome B Control of Total Leaf Area and Stomatal Density Affects Drought Tolerance in Rice // Plant Mol. Biol. 2012. V. 78. P. 289–300.
11. Bocealandro H.E., Rugnone M.L., Moreno J.E., Ploschuk E.L., Serna L., Yanovsky M.J., Casal J.J. Phytochrome B Enhances Photosynthesis at the Expense of Water-Use Efficiency in Arabidopsis // Plant Physiol. 2009. V. 150. P. 1083–1092.
12. Sysoeva M.I., Patil Grindal G., Sherudilo E.G., Torre S., Markovskaya E.F., Moe R. Effect of Temperature Drop and Photoperiod on Cold Resistance in Young Cucumber Plants – Involvement of Phytochrome B // Plant Stress. 2008. V. 2. P. 84–88.
13. Марковская Е.Ф., Сысоева М.И., Харькина Т.Г., Шерудило Е.Г. Влияние кратковременного снижения ночной температуры на рост и холодостойкость растений огурца // Физиология растений. 2000. Т. 47. С. 511–515.
14. Sysoeva M.I., Sherudilo E.G., Markovskaya E.F., Obshatko L.A., Matveyeva E.M. Temperature Drop as a Tool for Cold Tolerance Increment in Plants // Plant Growth Regul. 2005. V. 46. P. 189–191.
15. López-Juez E., Nagatani A., Tomizawa K.-I., Deak M., Kern R., Kendrick R.E., Furuya M. The Cucumber Long Hypocotyl Mutant Lack a Light-Stable PHYB-Like Phytochrome // Plant Cell. 1992. V. 4. P. 241–251.
16. Лантратова А.С., Василевская Н.В., Марковская Е.Ф. Онтогенез и возрастные особенности *Cucumis sativus* L. // Термоадаптация и продуктивность растений. Петрозаводск: КФ АН СССР, 1986. С. 110–122.
17. Дроздов С.Н., Курец В.К., Будыкина Н.П., Балагурова Н.И. Определение устойчивости растений к заморозкам // Методы оценки устойчивости растений к неблагоприятным условиям среды. Л.: Колос, 1976. С. 222–228.
18. Franklin K.A., Whitelam G.C. Light Signals, Phytochromes and Cross-Talk with Other Environmental Cues // J. Exp. Bot. 2004. V. 56. P. 271–276.
19. Марковская Е.Ф., Сысоева М.И., Шерудило Е.Г. Феномен ежесуточного кратковременного влияния низких закалывающих температур на жизнедеятельность растения // Онтогенез. 2008. Т. 39. С. 323–332.
20. Fowler S.G., Cook D., Thomashow M.F. Low Temperature Induction of Arabidopsis CBF 1, 2, and 3 Is Gated by Circadian Clock // Plant Physiol. 2005. V. 137. P. 961–968.
21. Eriksson M.E., Webb A.A.R. Plant Cell Responses to Cold Are All about Timing // Curr. Opin. Plant Biol. 2011. V. 14. P. 731–737.
22. Soitamo A.J., Piippo M., Allahverdiyeva Y., Battchikova N., Aro E.-M. Light Has a Specific Role in Modulating

- Arabidopsis Gene Expression at Low Temperature // BMC Plant Biol. 2008. V. 8. P. 1–20.
23. *Junttila O.* Plant Adaptation to Temperature and Photoperiod // *Agricult. Food Sci. Finland.* 1996. V. 5. P. 251–260.
24. *Robertson F.C., Skeffington A.W., Gardner M.J., Webb A.A.R.* Interaction between Circadian and Hormonal Signaling in Plants // *Plant Mol. Biol.* 2009. V. 69. P. 419–427.
25. *Александров В.Я.* Реактивность клеток и белки. Л.: Наука, 1985. 318 с.
26. *Sasaki H., Ichimura K., Imada Sh., Oda M.* Loss of Freezing Tolerance Associated with Decrease in Sugar Concentrations by Short-Term Deacclimation in Cabbage Seedlings // *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 2001. V. 70. P. 294–298.
27. *Шерудило Е.Г., Марковская Е.Ф., Сысоева М.И.* Роль светового фактора в последствии длитель- ного и кратковременного низкотемпературного воздействия на раззакаливание растений огурца // *Матер. Всерос. конф. “Устойчивость растений к неблагоприятным факторам внешней среды”.* Иркутск, 2007. С. 327–329.
28. *Tessadori F., Zanten M., Pavlova P., Clifton R., Pontvianne F., Snoek L.B., Millenaar F.F., Schulkes R.K., Driel R., Voeselek L., Spillane Ch., Pikaard C.S., Fransz P., Peeters A.J.M.* PHYTOCHROME B and HISTONE DEACETYLASE 6 Control Light-Induced Chromatin Compaction in *Arabidopsis thaliana* // *PLoS Genet.* 2009. V. 5. P. 1–13.
29. *Разин С.В., Быстрицкий А.А.* Хроматин: упакованный геном. Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. 176 с.
30. *Chinnusamy V., Zhu J.K.* Epigenetic Regulation of Stress Responses in Plants // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2009. V. 12. P. 133–139.