

На правах рукописи

КОЧЕТОВА Галина Владимировна

**УЧАСТИЕ ФИТОХРОМОВ А И В
В РЕГУЛЯЦИИ УСТЬИЧНЫХ ДВИЖЕНИЙ
У *Pisum sativum* L.**

Специальность 03.00.12 – физиология и биохимия растений

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва, 2008

Диссертационная работа выполнена на кафедре физиологии растений биологического факультета Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова.

Научные руководители: кандидат биологических наук
Баштанова Ульяна Борисовна
(научный сотрудник Университета Сассекса, Великобритания);
доктор биологических наук, профессор
Ермаков Игорь Павлович.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Мерзляк Марк Нисонович;
доктор биологических наук, профессор
Тараканов Иван Германович.

Ведущая организация: Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН (Москва).

Защита состоится 26 декабря 2008 г. в 15:30 на заседании Диссертационного совета Д 501.001.46 в Московском Государственном Университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, Ленинские горы, д.1 к.12, Биологический факультет МГУ, аудитория М-1.

Факс: (495)939-43-09.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан ноября 2008 года.

Учёный секретарь
Диссертационного совета,
кандидат биологических наук



М.А. Гусаковская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В связи с принципиальной важностью работы устьичного аппарата для обеспечения циркуляции воды по растению, оптимизации газообмена и поддержания высокого уровня фотосинтеза, замыкающие клетки устьиц представляют собой сложно регулируемую высокодифференцированную полуавтономную структуру. Движения замыкающих клеток устьиц контролируются множеством внешних факторов, несущих информацию об окружающей растению среде: интенсивности, длительности и спектральном составе света, водном потенциале воздуха и почвы, температуре, концентрации углекислого газа. Внутренние сигналы, информирующие о состоянии и потребностях растительного организма, также воспринимаются замыкающими клетками: это гормональные и другие сигнальные соединения, изменения концентрации сахаров, углекислого газа и минеральных солей в апопласте, гидравлические сигналы, свидетельствующие об оводнённости окружающих тканей. Кроме того, работа устьичного аппарата контролируется молекулярными биологическими часами.

В контроле устьичных движений участвует большинство известных фоторецепторов. Регуляция работы устьичного аппарата светом ФАР диапазона через фотосинтез (Scarth, 1932; Vavasseur, Raghavendra, 2005), а также дополнительными рецепторами синего света (СС): фототропинами (Kinoshita et al., 2001) и криптохромами (Mao et al., 2005) была показана ранее. Также обсуждается возможная роль зеаксантина (Talbot et al., 2003) и родопсин-подобных рецепторов (Paolicchi et al., 2005). Вопрос об участии в этом процессе дополнительных рецепторов красного света (КС) – фитохромов – до сих пор оставался достаточно спорным, несмотря на полученные рядом авторов косвенные свидетельства (Habermann, 1973; Roth-Bejerano, Itai, 1981; Eckert, Kaldenhoff, 2000; Talbot et al., 2003; Varoli et al., 2008). Прямые доказательства участия фитохрома в регуляции устьичных движений были получены в нашей лаборатории при исследовании ответов на КС у бесхлорофильного мутанта гороха *XL-18* (Sokolskaya et al., 2003): показано наличие классических К/ДК-обратимых транспирационных ответов низкоэнергетического (LFR) типа, как правило, обеспечиваемого фитохромом В. В результате дальнейших исследований выяснилось, что фитохромный ответ имеет сложную природу и состоит, очевидно, более чем из одного компонента. Представленная работа посвящена исследованию участия комплексной фитохромной системы и роли её компонентов в регуляции устьичных движений.

Цель и задачи исследования. Цель работы – исследование участия компонентов фитохромной системы в регуляции устьичных движений *Pisum sativum* L.: разделение ответов, вызываемых фитохромами А и В, а также выяснение их роли в быстром ответе замыкающих клеток на свет и в формировании ритма устьичных движений.

Для её достижения были поставлены следующие задачи:

1. определить, какие типы фитохром-зависимых реакций (сверхнизкоэнергетический (VLFR), низкоэнергетический (LFR), высокоэнергетический (HIR)) имеются в замыкающих клетках устьиц;
2. разделить вклады фитохромов А и В в регуляции устьичных движений, основываясь на выявленных типах фитохром-зависимых реакций и используя мутантов по фитохромам А и В;
3. построить и проанализировать спектры действия устьичных движений на КС и ДКС с использованием бесхлорофильного мутанта гороха *XL-18*;
4. выявить роли обоих фитохромов в формировании ритма устьичных движений;
5. выявить возможные пути реализации фитохромного сигнала в замыкающих клетках устьиц.

Научная новизна. В светозависимой регуляции устьичных движений у гороха помимо LFR ответа (Константинова, 2007), показано наличие также и ответа HIR типа. С помощью мутантов по фитохромам А и В впервые доказано участие каждого из фоторецепторов в регуляции устьичных движений; также показано, что ответ LFR типа опосредован фитохромом В, а ответ HIR типа – фитохромом А. Для бесхлорофильного мутанта гороха построен спектр действия открывания устьиц в ответ на КС 600-700 нм с максимумом в районе 660-670 нм, соответствующим максимуму поглощения фитохромов. При исследовании закрывания устьиц в ответ на обращающий дальний красный свет (ДКС) впервые обнаружено, что световые кривые в этой области имеют сложный характер, что свидетельствует об участии в процессе двух компонентов фитохромной системы: как фитохрома А, так и фитохрома В. При этом ответы, вызванные ДКС, разнонаправлены: фитохром В в ответ на ДКС вызывает закрывание устьиц, а действие фитохрома А приводит к открыванию и обладает большей чувствительностью. Впервые показано, что соотношение вкладов указанных компонентов зависит от длины волны и интенсивности действующего света, а также от длительности предшествовавшего периода темновой адаптации. Впервые получен предварительный спектр действия закрывания устьиц в ответ на ДКС 690-760 нм с максимумом при 730 нм. Также впервые с помощью мутантов по фитохромам А и В выявлены их роли в формировании ритма устьичных движений на естественном фотопериоде: фитохром А отвечает за ритмичность устьичных движений в течение дня, а фитохром В – за степень открытости устьиц и детекцию спектрального состава (соотношения К:ДК) в падающем свете. Показано, что одним из возможных механизмов реализации фитохромного сигнала при открывании устьиц является гидролиз крахмала в пластидах замыкающих клеток. Показана также критическая роль фитохрома В в регуляции нормального развития эпидермы листа.

Практическая значимость работы. Представленная работа является фундаментальным исследованием сложной многоуровневой системы регуляции устьичных движений у растений. Полученные результаты могут быть использованы в курсах лекций по физиологии растений и фоторегуляции физиологических процессов у растений. Данные могут быть использованы для оптимизации условий искусственного освещения при культивировании растений в условиях закрытого грунта и повышения продуктивности и эффективности водообмена сельскохозяйственных растений.

Апробация работы. Материалы диссертации обсуждались на семинарах кафедр физиологии растений и физико-химической биологии биологического факультета МГУ, доложены на Всероссийской научно-практической конференции «Физиология растений и экология на рубеже веков» (Ярославль, 2003); на V съезде общества физиологов растений России (Пенза, 2003); на XII международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов – 2005» (Москва, 2005); на IV Международной научной конференции «Регуляция роста, развития и продуктивности растений» (Минск, 2005); на II международном симпозиуме «Сигнальные системы клеток растений: роль в адаптации и иммунитете» (Казань, 2006); на Международной конференции «Современная физиология растений: от молекул до экосистем» (Сыктывкар, 2007); на IV и V съездах Российского фотобиологического общества (Саратов, 2005; Пущино, 2008).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 работ.

Объём и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов, приложений и списка цитированной литературы, включающего ... работы (из них ... на иностранных языках). Работа изложена на ... страницах (включая приложения), содержит 3 таблицы и 31 рисунок.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы рассмотрены вопросы функционирования фитохромной системы у растений и регуляции работы устьичного аппарата внешними и внутренними факторами.

Анализ литературы показывает, что о регуляции устьичных движений красным светом известно относительно мало, немногочисленные исследования роли фитохромов в этом процессе свидетельствуют, как правило, о наличии классических К/ДК-обратимых ответов низкоэнергетического (LFR) типа и только в одной работе показано наличие ответа FR-NIR типа. Сведений о том, какие именно фитохромы (А, В и/или минорные) участвуют в регуляции устьичных движений, до настоящего времени не было.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Объекты исследования

В исследованиях использовались растения гороха посевного (*Pisum sativum* L.):

- бесхлорофильный мутант *XL-18* (линия *xantha*) (Ежова, Гостимский, 1979) и изогенный дикий тип сорт «Ранний зелёный»¹;
- мутант по фитохрому А *phya-1* (Weller et al., 1997), мутант по фитохрому В *phyb-5* (Weller et al., 2001) и изогенный дикий тип сорт «Torsdag»².

2. Измерение переменной флуоресценции хлорофилла

Измерение переменной флуоресценции проводилось на микроспектрофлуориметре, собранном на базе однолучевого микроскопа-фотометра MPV-2³. Для каждого измерения флуоресценции, проведённого в двух замыкающих клетках на эпидермальном срыве, вычислялся параметр $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$, где F_0 - постоянная флуоресценция, F_m - максимальная флуоресценция, F_v - переменная флуоресценция.

3. Световая и флуоресцентная микроскопия

Ширину устьичной апертуры измеряли на эпидермальных срывах с абаксиальной стороны листа при помощи светового микроскопа МБИ-11. Все измерения проводили в физиологически нейтральном зелёном свете (ЗС-1: $\lambda_{max} = 531$ нм; $\Delta\lambda_{1/2} = 69$ нм), для избежания изменений устьичных апертур в ответ на интенсивный белый свет осветителя микроскопа.

Фотографирование эпидермальных срывов осуществлялось с помощью моторизованного микроскопа AxioPlan 2 imaging MOT с программным обеспечением AxioVision 4.5, оснащенного цифровой камерой AxioCam HRc⁴. Обработку изображений проводили с помощью программы AxioVision LE Rel. 4.4.

Для окрашивания небольших количеств крахмала в эпидермальных срывах использовался раствор йода в молочной кислоте (Барыкина и др., 2000).

4. Исследование изменения апертуры устьиц в ответ на освещение

Установка⁵ для исследования устьичных ответов на освещение и получения спектра действия устьичных движений включала в себя держатель для мягкой фиксации интактного (не отделённого от растения) листа в плоскости, перпендикулярной световому потоку. Держатель вместе с растением был помещён в светонепроницаемый ящик с отверстиями для рук, закрытыми фотографическими рукавами, что обеспечивало

¹ Автор выражает благодарность проф. кафедры генетики С.А. Гостимскому за предоставленные семена.

² Автор выражает благодарность John Innes Centre Pisum Collection (Великобритания) и Dr J.L. Weller (Университет Тасмании) за предоставленные семена.

³ Автор выражает благодарность проф. кафедры биофизики С.И. Погосяну за предоставленную возможность использования установки.

⁴ Автор выражает признательность Е.А. Лазаревой за помощь в работе с оборудованием.

⁵ Автор выражает благодарность вед.инж. кафедры физиологии растений [Б.А. Соловьёву] за создание установки.

исключение попадания внешнего света из комнаты на объект и позволяло работать с растениями на ощупь.

В качестве осветителя использовались либо диапроектор с галогеновой лампой и наборами узкополосных светофильтров, либо светодиодная лампа ($\lambda = 660$ нм). Для предотвращения нагревания объекта во время освещения использовался водный фильтр; для уменьшения интенсивности монохроматического освещения – набор нейтральных светофильтров.

Построение спектра действия – зависимости амплитуды устьичных движений от длины волны действующего света – проводили по стандартной схеме (Eisinger et al., 2000).

5. Измерение низкотемпературной флуоресценции фитохромов

Запись спектров флуоресценции этиолированных эпикотилей различных линий гороха проводилась на высокочувствительном спектрофлуориметре, собранном на базе анализирующего монохроматора ДФС-24⁶. Исходный спектр, измеренный при 85 К при возбуждении $\lambda_a = 633$ нм, $I_a = 4,8$ мкмоль м⁻² с⁻¹, после вычитания фона соответствовал спектру флуоресценции фитохрома в P_r форме. При последующем освещении образца фотохимически активным светом ($\lambda_a = 633$ нм, $I_a = 2660$ мкмоль м⁻² с⁻¹, 10 мин) происходило фотопревращение исходной P_r формы в первичный стабильный при низких температурах фотопродукт: P_r → lumi-R. Записанный после этого спектр соответствовал суммарному спектру флуоресценции указанных двух форм при фотостационарном равновесии. По полученным спектрам рассчитывались параметры, характеризующие спектральные и фотохимические свойства фитохрома:

λ_{max} – положение максимума в спектре излучения красной формы фитохрома (P_r);

$[P_{tot}] = F_0 / F_b$ – относительная концентрация фитохрома в ткани, где F_0 – интенсивность флуоресценции в максимуме, F_b – интенсивность флуоресценции фона;

$\chi_1 = (F_0 - F_1) / F_0$ – глубина фотопревращения P_r → lumi-R при температуре 85 К, где F_1 – интенсивность флуоресценции в максимуме после установления фотостационарного равновесия между P_r и lumi-R формами.

6. Представление результатов и обработка данных

От 6 до 14 независимых экспериментов проводилось на разных листьях растений при исследовании быстрых ответов устьиц на свет. От 10 до 25 – при исследовании ритмов устьичных движений. От 5 до 10 – при измерении спектров флуоресценции фитохромов в этиолированных эпикотилиях. Результаты всех измерений представлены как среднее значение (или средняя линия) ± стандартная ошибка. Проверка гипотез о достоверности отличий средних двух выборок, а также достоверность отличия среднего от нуля проводилась с использованием *t*-критерия с уровнем значимости $P = 0,05$. Обработка данных производилась с помощью программ Microsoft Office Excel и Origin 7.5.

⁶ Автор выражает признательность в.н.с. каф. физико-химической биологии В.А.Синещёкову за предоставленную возможность использования установки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Характеристика мутантов

1.1. Зависимость морфогенеза фитохромных мутантов от условий выращивания

При выращивании растений под люминесцентными лампами ($80 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$) в водной культуре у мутанта *phyb-5* наблюдались сильно удлинённые, утолщенные и искривлённые бледные междоузлия и черешки, листья небольшого размера. При дополнительном освещении солнечным светом фенотип существенно изменялся: междоузлия укорачивались, увеличивалась площадь и развёрнутость листовых пластинок. У мутанта *phya-1* отличия от дикого типа менее существенные: междоузлия несколько удлинённые при люминесцентном освещении и укороченные при добавлении солнечного. При выращивании растений в почвенной культуре под солнечным освещением отличия от дикого типа ещё менее выражены, но тенденции сохранялись. Подобный фенотип в общих чертах соответствовал описанному в литературе (Weller et al., 1995; 1997b; 2001; Foo et al., 2006). Однако отличия от дикого типа выражены гораздо сильнее, чем в указанных описаниях, особенно для мутанта *phyb-5*, нижние листовые пластинки которого не превышали нескольких миллиметров и оставались плотно скрученными.

Известно, что фенотип исследованных мутантных растений обусловлен дефицитом фитохромов А и В и связанным с этим изменением гормонального баланса (повышенным содержанием этилена и пониженным содержанием активных форм гиббереллинов) (Foo et al., 2006). Можно предположить, что увеличение интенсивности света и обогащение его синими квантами (при солнечном освещении) задействует рецепторы синего света и неповреждённый фитохром (Platten et al., 2005), которые могут частично компенсировать отсутствие другого фитохрома. Это наиболее выражено для мутанта по фитохрому В, который при относительно слабом люминесцентном свете не доживал до генеративной стадии. Подобный эффект ранее отмечался только для двойного мутанта *phya-1 phyb-5* (Weller et al., 2001).

1.2. Аномалии строения эпидермы листа у мутанта по фитохрому В

При наблюдении эпидермальных срывов под микроскопом были выявлены некоторые особенности строения эпидермы листа у мутанта по фитохрому В *phyb-5*. Обнаружены значительные аномалии в развитии как основных эпидермальных, так и устьичных клеток (фотографии представлены в диссертации): многие основные клетки сильно раздуты и наплывали на соседние клетки; замыкающие клетки часто имели неправильную форму, размеры их сильно варьировали, встречались пары устьичных клеток, не разделённые основными эпидермальными клетками. Всё это свидетельствует о важной роли фитохрома В, отсутствующего у данного мутанта, в нормальном развитии эпидермы. Необходимо отметить, что исследования строения эпидермы листа одиночных

фитохромных мутантов прежде не проводились. Подобные аномалии развития ранее были обнаружены только при исследовании тканей междоузлий двойного мутанта гороха *phya-1 phyb-5*: крупные раздутые клетки в эпидерме, коре и стели, нескоординированный рост клеток разных тканей стебля приводили к утолщенным, искривлённым и хрупким междоузлиям (Weller et al., 2001; Foo et al., 2006). Авторы также связывают эти аномалии с повышенной продукцией этилена.

У мутанта по фитохрому А *phya-1* аномалий в строении эпидермы не обнаружено.

1.3. Доказательство отсутствия функционального фотосинтетического аппарата в замыкающих клетках устьиц бесхлорофильного мутанта XL-18

Для количественной характеристики фотосинтетического аппарата в замыкающих клетках устьиц был использован метод индукции переменной флуоресценции хлорофилла в индивидуальных клетках. В замыкающих клетках дикого типа параметр F_v/F_m , характеризующий квантовый выход разделения зарядов в фотосистеме II (Гавриленко, Жигалова, 2003), составляет $0,475 \pm 0,007$, что соответствует литературным данным для клеток этого типа (Lawson et al., 2002).

В замыкающих клетках устьиц бесхлорофильного мутанта XL-18 переменная флуоресценция хлорофилла в пределах чувствительности установки отсутствует, что доказывает отсутствие в них функционального фотосинтетического аппарата. Таким образом, все обнаруженные у мутанта *XL-18* ответы на красный свет обеспечиваются исключительно фитохромами.

1.4. Содержание и фотохимические характеристики фитохромов в этиолированных эпикотильях

Содержание ($[P_{tot}]$) и фотохимические свойства (γ_I – степень фотопревращения при 85 К) фитохромов у бесхлорофильного мутанта *XL-18* соответствуют таковым у дикого типа гороха (**рис. 1 Б, табл. 1**). Этот факт свидетельствует о том, что точковая мутация, обуславливающая бесхлорофильный фенотип этого мутанта (Ежова, Гостимский, 1979), повреждает биосинтез хлорофилла после протопорфирина IX, не затрагивая, таким образом, ветвь, ведущую к синтезу фитохромобилина (РФВ) – хромофора всех фитохромов (Wang, Deng, 2002). Таким образом, бесхлорофильный мутант гороха *XL-18* является удобным объектом, позволяющим разделять вклады фитохромов и фотосинтеза в регуляции различных физиологических реакций.

Результаты спектральных исследований фитохромной системы в проростках мутантов *phya-1* и *phyb-5* согласуются с литературными данными о содержании и фотохимических характеристиках фитохромов В и А гороха соответственно (Огородникова, 1999; Sineshchekov et al., 1999; **рис. 1 А, табл. 1**).

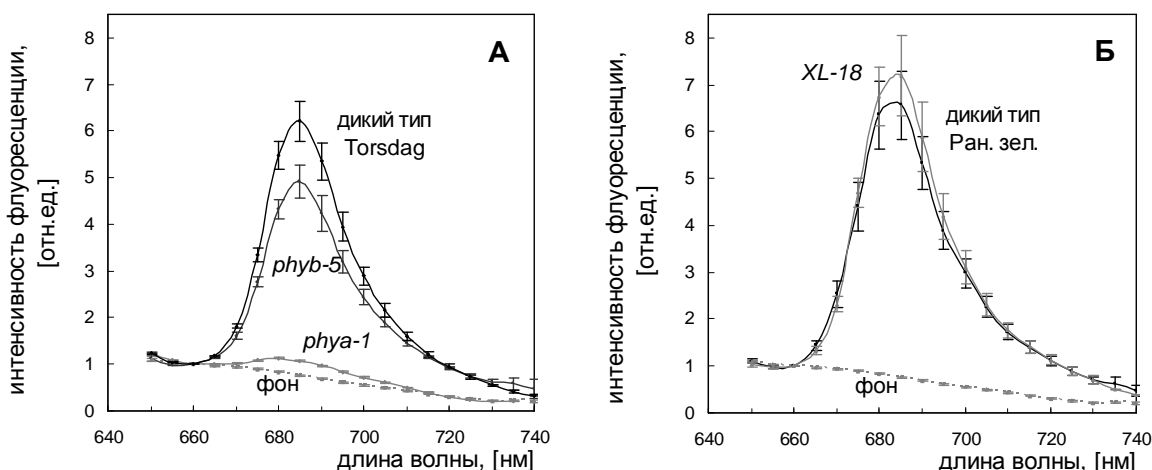


Рис. 1 Спектры флуоресценции этиолированных эпикотилей, измеренные при 85К и $\lambda_{возб} = 633$ нм, нормированные при 660 нм:
А – дикий тип «Torsdag», мутант по фитохрому А *phya-1* и мутант по фитохрому В *phyb-5*;
Б – дикий тип «Ранний зелёный» и бесхлорофильный мутант *XL-18*.

Таблица 1. Содержание, спектральные и фотохимические характеристики фитохромов в этиолированных эпикотилиях гороха дикого типа, бесхлорофильного мутанта *XL-18*, мутантов по фитохрому А *phya-1* и по фитохрому В *phyb-5*.

растение	[Ptot], [отн.ед.]	λ_{max} , [нм]	γ_1
дикий тип «Torsdag»	5,43 ± 0,42 (5,94 ± 0,40)*	684,3 ± 0,4 (687)*	0,35 ± 0,02 (0,41 ± 0,02)*
<i>phya-1</i>	0,32 ± 0,02 (0,43 ± 0,03)*	683,0 ± 0,6 (683)*	0,03 ± 0,04 (0,05 ± 0,02)*
<i>phyb-5</i>	4,16 ± 0,35 (5,23 ± 0,50)*	684,0 ± 0,5 (686)*	0,34 ± 0,04 (0,43 ± 0,02)*
дикий тип «Ранний зелёный»	5,91 ± 0,74 (6,7)**	682,9 ± 0,3 (685)**	0,37 ± 0,06 (0,25-0,35)**
<i>XL-18</i>	5,77 ± 0,45 (6,0)**	683,3 ± 0,6 (685)**	0,36 ± 0,03 —

* - литературные данные (Огородникова, 1999; Sineshchekov et al., 1999);

** - литературные данные (сорт дикого типа и название мутанта не указаны) (Синещёков, 1990).

2. Исследование изменения апертуры устьиц в ответ на освещение КС и ДКС

2.1. Участие фитохромов А и В в регуляции устьичных движений в ответ на КС и следующий за ним ДКС

Использование мутантов по отдельным пигментам позволяет разделить их вклады в суммарном ответе на КС. Горох представляет собой удобный природный объект для таких исследований, так как не содержит минорных фитохромов (Platten et al., 2005). Однако растений, дефицитных одновременно по хлорофиллу и одному из фитохромов, на данный момент не существует. Поэтому даже в случае мутантов исследовалась система, состоящая из двух рецепторов красного света: либо оба фитохрома, либо хлорофилл и один из фитохромов.

Использование бесхлорофильного мутанта гороха *XL-18* позволило нам исследовать устьичный ответ в отсутствие фотосинтеза и показать обратимость устьичных движений при последовательном действии красного и дальнего красного света: КС вызывал открывание устьиц, а ДКС – закрывание (**рис. 2**). Это свидетельствует о прямой регуляции

устычных движений фитохромом по LFR типу ответов и полностью согласуется с полученными ранее данными (Константинова, 2007). Помещение в темноту после КС также приводило к закрыванию устьиц, что объясняется, вероятно, темновой реверсией фитохрома в неактивную форму (Hennig, 2006).

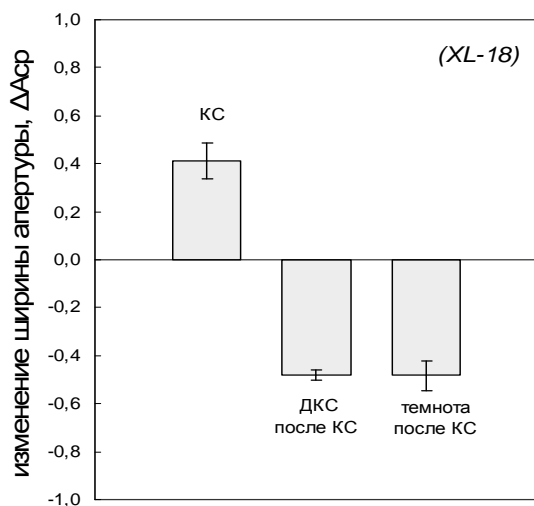


Рис. 2 Изменение ширины апертуры устьиц в ответ на освещение КС (660 нм, 20 мин) и следующим за ним ДКС (729 нм, 20 мин) или темноту (20 мин) у бесхлорофильного мутанта гороха *XL-18*.

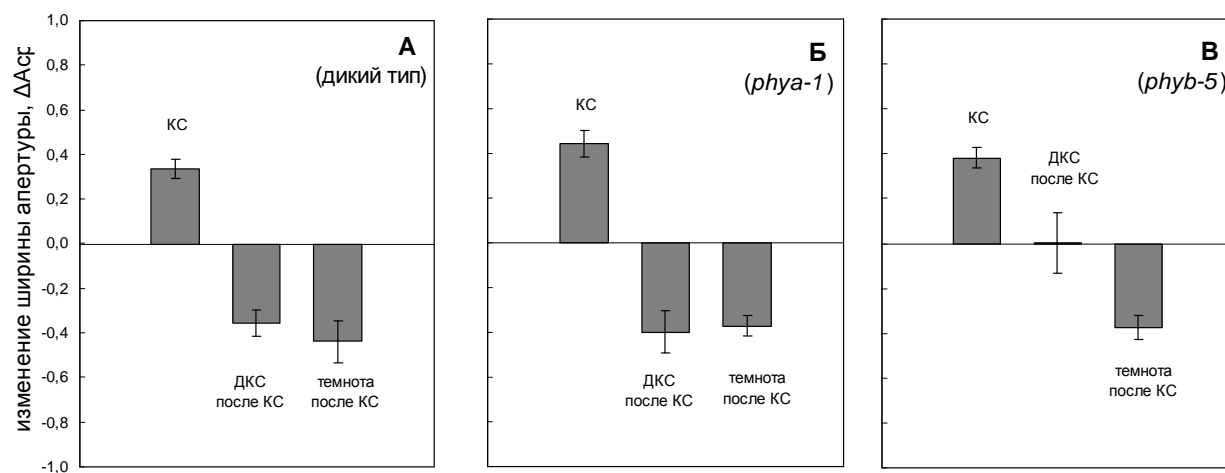


Рис. 3 Изменение ширины апертуры устьиц в ответ на освещение КС (660 нм, 20 мин) и следующим за ним ДКС (729 нм, 20 мин) или темноту (20 мин) ($I_{дей} = 11 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$):

- А** – у дикого типа гороха;
- Б** – у мутанта гороха по фитохромому А (*phyA-1*);
- В** – у мутанта гороха по фитохромому В (*phyB-5*).

Аналогичные эксперименты с последовательным действием КС и ДКС были проведены и на зелёных растениях: диком типе «Torsdag» и фитохромных мутантах *phyA-1* и *phyB-5* (рис. 3). Хлорофилл-зависимый ответ удалось исключить при использовании подпороговых для фотосинтеза интенсивностей света ($I_{дей} = 11 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$) (Sharkey, Ogawa, 1987) и прямом освещении нижней поверхности листа, где в основном и расположены устьица у гороха. Проведенные исследования

показали, что как у дикого типа, так и у мутанта по фитохрому А (*phyA-1*) наблюдался такой же К/ДК обратимый устьичный ответ (**рис. 3 А, Б**) как у бесхлорофильного мутанта (*XL-18*) (**рис. 2**). У мутанта гороха по фитохрому В (*phyb-5*) наблюдался только ответ на КС (открывание устьиц), а при действии последующего ДКС устьичная апертура не изменялась (**рис. 3 В**). Темнота после КС во всех случаях вызывала закрывание устьиц, что, по-видимому, связано с быстрой темновой реверсией обоих фитохромов в неактивную форму (Eichenberg et al., 1999; 2000a; 2000b; Hennig, 2006).

Так как открывание устьиц наблюдается у обоих фитохромных мутантов, следовательно, в ответе устьиц на КС принимают участия оба фитохрома: и А, и В. Фитохром В вызывает ответ классического LFR типа (Shinomura, 1997; Casal et al., 1998): в ответ на КС устьица открываются, а последующее действие ДКС обращает действие КС – устьица закрываются. Фитохром А вызывает ответ HIR типа, при котором в ответ на КС устьица открываются, и это открывание не обращается, но поддерживается ДКС (McCormac et al., 1993; Franklin et al., 2007).

2.2. Участие фитохрома А в открывании устьиц в ответ на ДКС после темновой адаптации

Самым убедительным доказательством участия фитохрома А в регуляции физиологического процесса является наличие ответов FR-HIR типа, свойственных только фитохрому А (Casal et al., 1998). Так как свет $\lambda > 680$ нм фотохимически неактивен при переводе фитохрома В в физиологически активную форму (Sineshchekov et al., 1999), устьичные ответы на такой длинноволновый свет могут быть обусловлены только работой фитохрома А (а также участием хлорофилла у зелёных растений). Поэтому были исследованы устьичные ответы на ДКС, данный сразу после темновой адаптации, а также прослежена зависимость этого ответа от длительности темновой адаптации и выявлена корреляция данного физиологического ответа с литературными сведениями о концентрации фитохрома А, накапливающегося в темноте вследствие синтеза белка *de novo* (Clarkson, Hillman, 1967; Colbert et al., 1985; Weller et al., 1995).

Так как максимум в спектре действия ответов FR-HIR типа расположен в районе $\lambda_{max} = 710 - 715$ нм (Shinomura et al., 2000), измерение устьичного ответа у бесхлорофильного мутанта *XL-18* проводилось с использованием ДКС $\lambda = 711$ нм (**рис. 4 А**). После темновой адаптации длительностью 6,5 ч наблюдалось небольшое открывание устьиц, однако величина открывания ($\Delta A_{sp} = 0,102 \pm 0,097$ отн.ед.) недостоверно отличалось от нуля. При увеличении длительности темновой адаптации до 14 ч и 24 ч ДКС-зависимое открывание устьиц линейно возрастало, что соответствует данным о ресинтезе фотолабильного фитохрома А в темноте (Colbert et al., 1985; Weller et al., 1995). Однако при увеличении темновой адаптации до 48 ч величина ДКС-зависимого устьичного ответа более не увеличивалась, хотя известно, что содержание спектрально

регистрируемого фитохрома А у гороха вследствие его синтеза *de novo* продолжало расти (Weller et al., 1995). Это несоответствие может быть обусловлено нелинейной зависимостью интенсивности физиологического ответа от концентрации фоторецептора и/или изменением параметров циркадных ритмов при столь длительном нахождении растения в темноте (Бюннинг, 1964; Уинфри, 1990) и связанными с этим смещением скотофильной (нечувствительной к свету) фазы и изменением состояния компонентов пути передачи сигнала от фоторецептора (Indorf et al., 2007; Song et al., 2007).

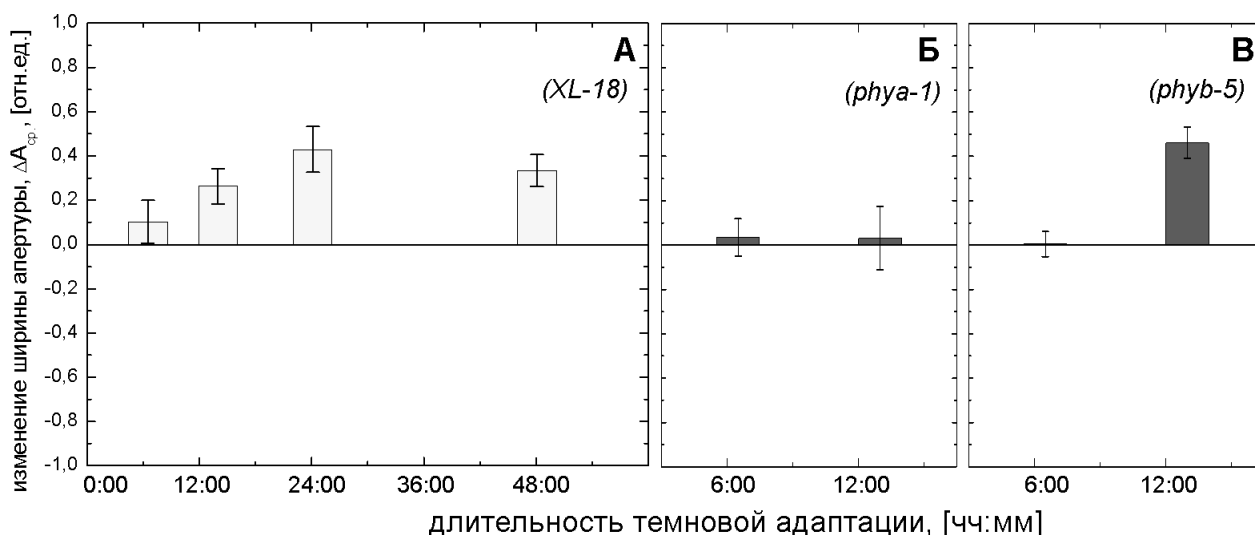


Рис. 4 Изменение ширины апертуры устьиц в ответ на ДКС после темновой адаптации разной длительности:

А – бесхлорофильный мутант *XL-18*, (711 нм, 20 мин, $I_{дей} = 33$ мкмоль м⁻² с⁻¹);

Б – мутант по фитохрому А *phya-1*, (743 нм, 20 мин, $I_{дей} = 40$ мкмоль м⁻² с⁻¹)

В – мутант по фитохрому В *phyb-5*, (743 нм, 20 мин, $I_{дей} = 40$ мкмоль м⁻² с⁻¹).

Для выявления фитохромных ответов FR-NIR типа у фитохромных мутантов (содержащих хлорофилл) и чёткого отделения их от вклада фотосинтетической составляющей, для освещения был выбран более длинноволновый ДКС $\lambda = 743$ нм, не активный для фотосинтеза (Мокроносов и др., 2006), но фотохимически активный для фитохрома А (Sasaki et al., 1988; Shinomura et al., 1996; 2000). Лист освещался с абаксиальной стороны, чтобы свет в первую очередь попадал на нижний эпидермис и устьичные клетки, а, учитывая оптические свойства листа (Sokolskaya et al., 2003), мезофилла достигали бы незначительные интенсивности света.

При таком освещении листьев мутанта по фитохрому В после темновой адаптации 6,5 ч ответа не наблюдалось (**рис. 4 В**). Однако при увеличении длительности темновой адаптации до 13 ч появлялось чёткое открывание устьиц ($\Delta A_{сп} = 0,460 \pm 0,071$ отн.ед.), соответствующее значительному накоплению фитохрома А в течение долгой темновой адаптации (Weller et al., 1995). При аналогичном освещении листьев мутанта по фитохрому А средняя ширина устьичных апертур не изменялась ни при короткой, ни при

более длинной темновой адаптации (**рис. 4 Б**). То есть, как и предполагалось, свет 743 нм фотохимически неактивен при переводе в физиологически активную форму единственного имеющегося у мутанта *phyA-1* фитохрома – фитохрома В.

Отсутствие устьичного ответа у мутанта по фитохрому В при короткой темновой адаптации и у мутанта по фитохрому А как при короткой, так и при длинной темновой адаптации также подтверждает расчётное предположение о том, что данное освещение не задействует фотосинтетическую составляющую. Следовательно, при такой схеме проведения эксперимента фотосинтетический компонент устьичного ответа полностью исключён, и наблюдаемый ответ обусловлен только фитохромной системой, а именно – фитохромом А. Необходимо подчеркнуть, что в отличие от фитохрома В, который вызывает открывание на КС и закрывание на ДКС (см. **2.1.**), фитохром А вызывает открывание как на КС, так и на ДКС (см. **2.1.**). Таким образом, фоторецепторы обеспечивают сонаправленные реакции на КС и разнонаправленные на ДКС.

3. Спектр действия устьичных движений

3.1. Подбор условий измерения спектра действия устьичных движений

Наиболее корректным доказательством участия фоторецептора в регуляции физиологического процесса является совпадение спектра действия этого процесса со спектром поглощения фоторецептора. Полученный ранее на бесхлорофильном мутанте гороха *XL-18* предварительный спектр действия устьичных движений (Константинова, 2007) требовал детальной проработки и не позволял разделить вклады отдельных фитохромов. В связи с этим, необходимо было продолжить работу и получить спектры действия устьичных движений в красной и дальней красной областях спектра в условиях, исключающих, по возможности, один из фитохромов.

Известные спектры действия процессов, регулируемых фитохромом В, совпадают со спектрами поглощения P_r и P_{fr} форм фитохрома В соответственно (Shinomura et al., 1996), тогда как для фитохрома А соответствие и интерпретация спектров гораздо более сложные (Shinomura et al., 1996; 2000). Поэтому более доказательно было получить спектр действия устьичных движений, регулируемых фитохромом В. В связи с отсутствием растений, дефицитных одновременно и по хлорофиллу, и фитохрому А, для разделения ролей обоих фитохромов в бесхлорофильном мутанте *XL-18* был использован подход, основанный на отличии в фотостабильности этих фоторецепторов. Так как фитохром А деструктурирует на свету и ресинтезируется в течение темного периода, а фитохром В фотостабилен, соотношение их содержания, а следовательно, и вкладов в суммарном ответе изменяется в процессе освещения и нахождения в темноте. Таким образом, необходимо было подобрать условия, при которых вклад фитохрома В в суммарном ответе максимален, учитывая разнонаправленное действие фитохромов при освещении

ДКС (см. 2.1., 2.2.). И при этих условиях преобладания роли фитохрома В построить спектры действия открывания устьиц бесхлорофильного мутанта *XL-18* на КС и закрывания на обращающий ДКС.

По данным, представленным на **рис. 5**, видно, что при короткой темновой адаптации (2 ч) закрывание устьиц в ответ на обращающий ДКС (729 нм), данный после предосвещения КС (660 нм), выражено слабо, так как в это время ещё не угасли запущенные на постоянном свете процессы. При длительной темновой адаптации (11 и 13 ч), увеличивается вклад фитохрома А, накапливающегося в темноте, что сдвигает суммарный устьичный ответ в сторону открывания. Наиболее чёткое закрывание устьиц наблюдается при темновой адаптации длительностью 6,5 ч – она и была использована в дальнейшем для измерения спектров действия устьичных движений.

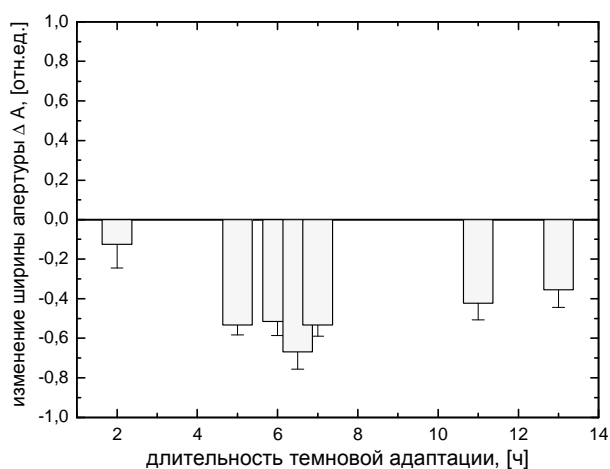


Рис. 5 Изменение ширины апертуры устьиц в ответ на обращающий ДКС (729 нм, 20 мин, $3 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$) после предосвещения КС (660 нм, 20 мин, $5 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$) у бесхлорофильного мутанта гороха *XL-18* при различной длительности темновой адаптации.

3.2. Спектр действия устьичных движений в ответ на КС

С помощью бесхлорофильного мутанта *XL-18* исследованы зависимости устьичного ответа на КС от длины волны и интенсивности действующего монохроматического света при $\lambda = 602, 624, 643, 660, 672, 689$ и 696 нм и построены соответствующие световые кривые (**рис. 6**). На всех кривых наблюдается линейный участок, когда изменение устьичной апертуры прямо пропорционально логарифму интенсивности действующего света. Это свидетельствует об участии в процессе либо только одного фоторецептора, либо о сонаправленном действии нескольких (Presti, Galland, 1987). По линейным участками полученных световых кривых при выбранной величине стандартного ответа $\Delta A_{ст} = 0,3$ отн.ед. построен спектр действия открывания устьиц на КС (600-700 нм) (**рис. 7**) с максимумом в районе 660-670 нм, полушириной около 60 нм и плечом при 630 нм. Положение максимума и полуширина полученного спектра соответствуют спектрам поглощения красных форм фитохромов А и В (Tu, Lagarias, 2005), а также

сходны с другими спектрами действия фитохром-зависимых процессов LFR типа (Sasaki et al., 1988; Shinomura et al., 1996). Для более точного определения положения плеча необходимо более тонкое разрешение спектра по длинам волн.

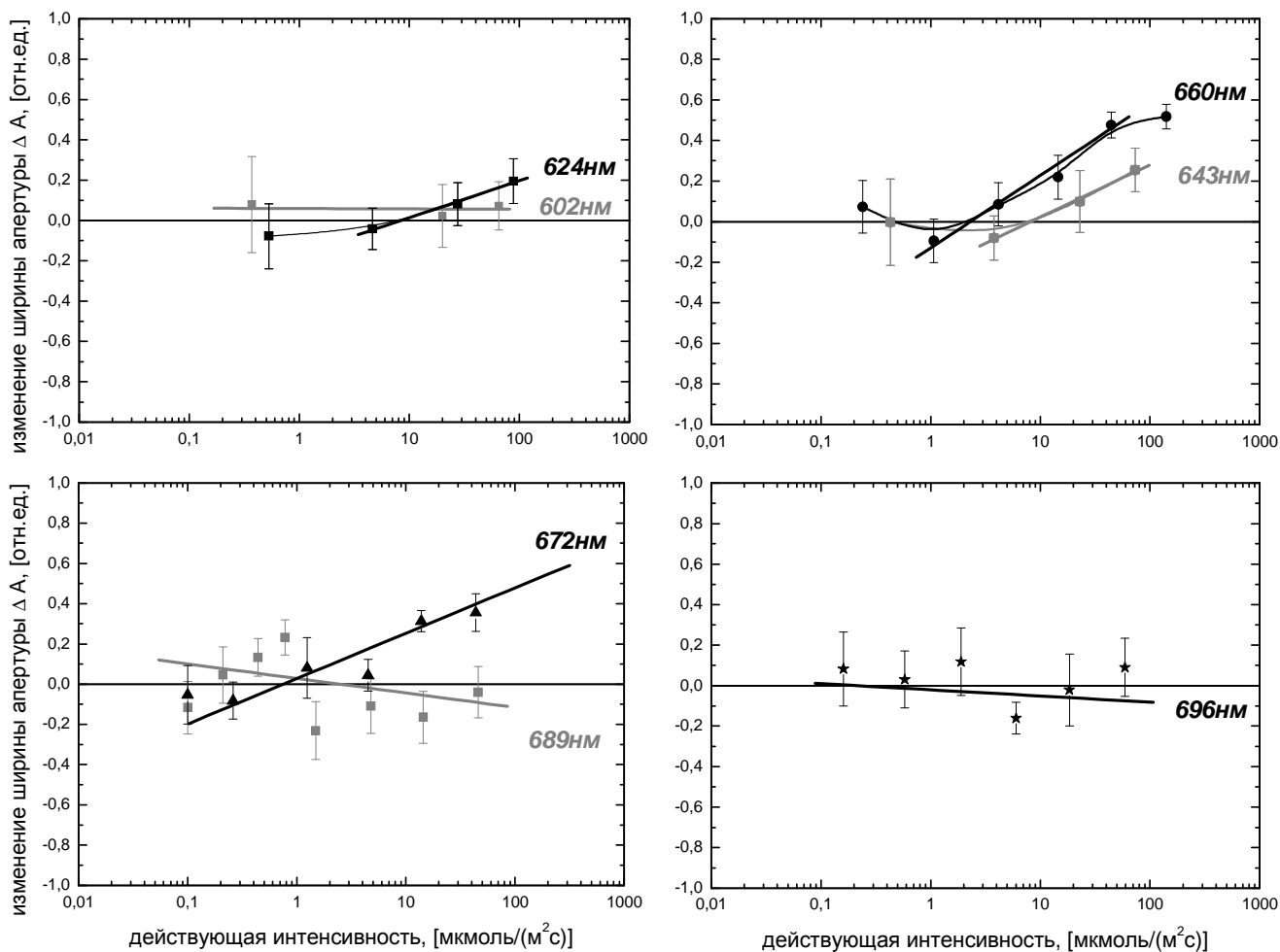


Рис. 6 Световые кривые – зависимость изменения ширины апертуры устьиц бесхлорофильного мутанта *XL-18* от интенсивности действующего монохроматического КС (темновая адаптация 6,5 ч).

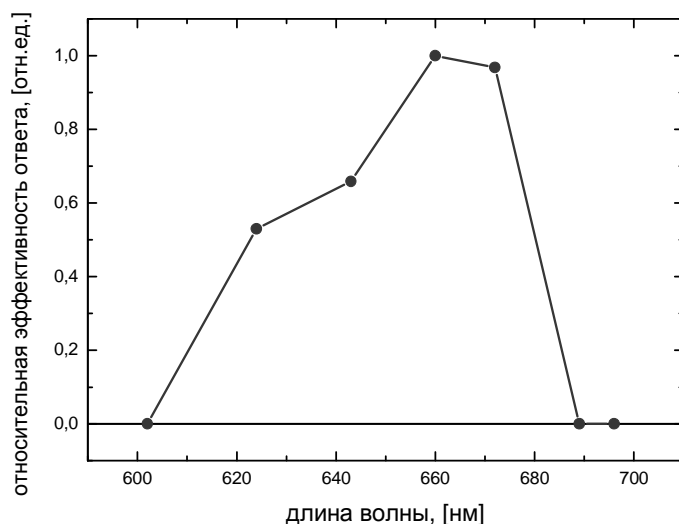


Рис. 7 Спектр действия открывания устьиц бесхлорофильного мутанта *XL-18* в ответ на КС (темновая адаптация 6,5 ч).

3.3. Спектр действия устьичных движений в ответ на обращающий ДКС

При освещении листа мутанта *XL-18* светом $\lambda = 672$ нм после предосвещения более коротковолновым КС 660 нм (**рис. 8 А**) устьица продолжали открываться – световая кривая линейна в полулогарифмических координатах с насыщением при больших интенсивностях. Действительно – свет 672 нм ещё не является дальним красным – он поглощается P_r формами как фитохрома А, так и фитохрома В, превращая их в физиологически активные P_{fr} формы (Sineshchekov et al., 1999).

При исследовании устьичного ответа на обращающий ДКС ($\lambda = 696, 711, 729, 743, 763$ нм), данный после КС 660 нм, обнаруживается нелинейная зависимость величины ответа от логарифма интенсивности света (**рис. 8**): как и ожидалось, при высоких интенсивностях ДКС устьица закрывались, но при низких интенсивностях происходило открывание (относительно темнового контроля). Это свидетельствует об участии в процессе, как минимум, двух компонентов фитохромной системы, действующих разнонаправленно: первый вызывает закрывание на ДКС, второй – открывание и обладает большей чувствительностью. Как показано выше, закрывание устьиц у гороха в ответ на ДКС после КС обеспечивается фитохромом В (см. 2.1.), а открывание на КС без обращения на ДКС – фитохромом А (см. 2.1.). Следовательно, в ответе устьиц на ДКС после КС участвуют и фитохром А, и фитохром В, и действуют они разнонаправленно.

Для дополнительной проверки этого вывода одна из световых кривых (729 нм) была получена не только для короткой темновой адаптации (6,5 ч, как и все остальные), но и для более длительной (12-16 ч), которая обеспечивает видимое накопление фитохрома А (см. 2.2.). Из **рис. 8 Г** видно, что при таком увеличении длительности темновой адаптации порог чувствительности ответа снижается, и вся световая кривая сдвигается в сторону открывания, то есть увеличивается вклад компонента, вызывающего открывание устьиц на ДКС – фитохрома А.

Таким образом, нам не удалось полностью исключить вклад фитохрома А и построить спектр действия закрывания устьиц, обеспечиваемый только фитохромом В. Однако полученные данные ещё раз подтверждают участие обоих фитохромов гороха в регуляции устьичных движений: фитохром В вызывает открывание на КС и закрывание на ДКС по типу LFR, а фитохром А – открывание на КС и ДКС по типу NIR.

По участкам полученных световых кривых, характеризующим закрывание, при величине стандартного ответа $\Delta A_{cm} = -0,3$ отн. ед. построен предварительный спектр действия закрывания устьиц бесхлорофильного мутанта гороха в ответ на обращающий ДКС, следующий после КС (**рис. 9**). Положение максимума (730 нм) полученного спектра соответствует спектру поглощения фитохрома в P_{fr} форме (Tu, Lagarias, 2005) и известным спектрам действия контролируемых фитохромом В процессов, протекающих по LFR типу (Shinomura et al., 1996). Меньшая, по сравнению с приведёнными литературными

данными, полуширина полученного спектра (50 нм вместо 100 нм), очевидно, обусловлена вкладом фитохрома А.

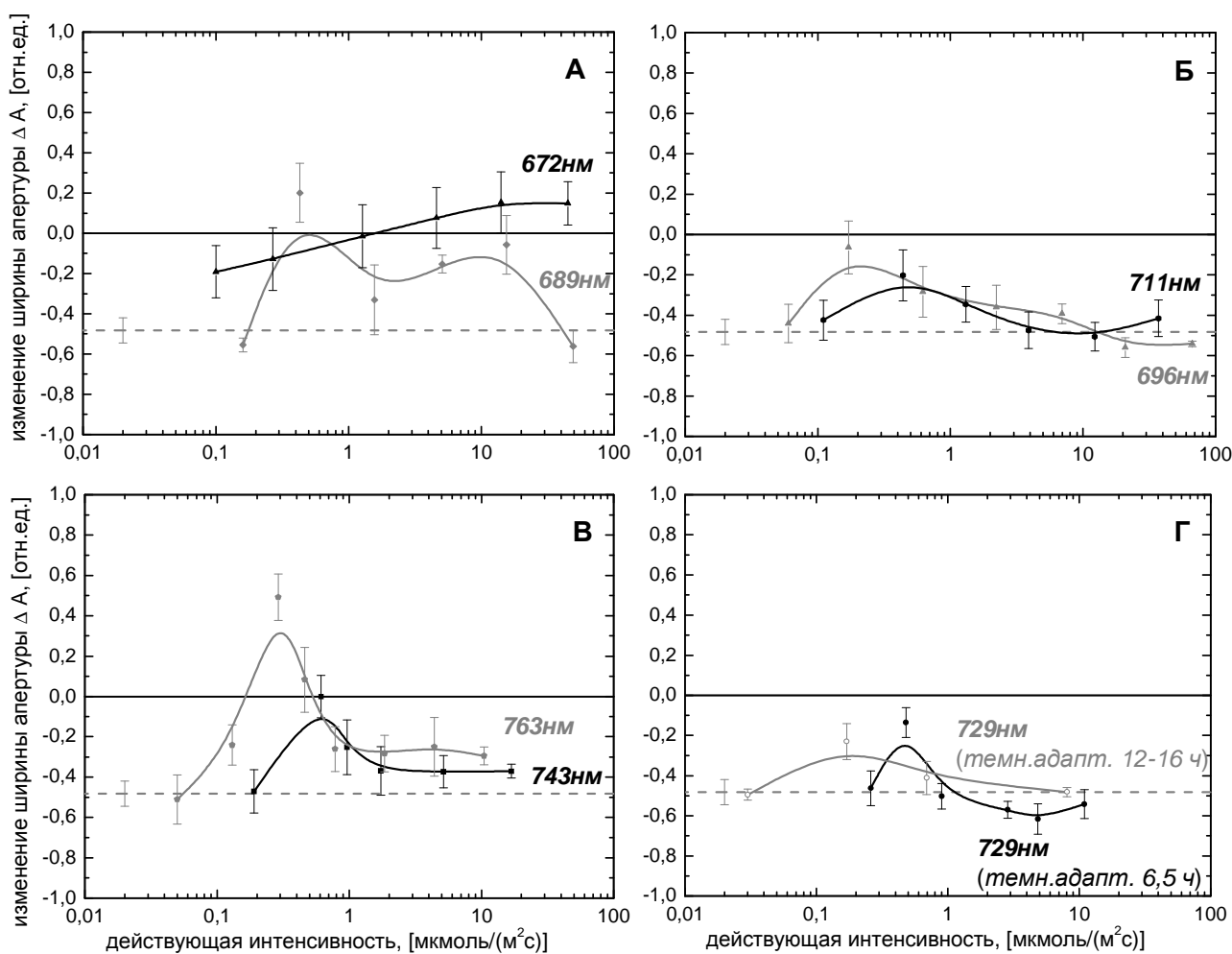


Рис. 8 Световые кривые – зависимость изменения ширины апертуры устьиц бесхлорофильного мутанта *XL-18* от интенсивности действующего монохроматического ДКС после предосвещения КС (660 нм, 20 мин, 5 $\mu\text{моль м}^{-2} \text{с}^{-1}$) (пунктир – темновой контроль):
А, Б, В – темновая адаптация 6,5 ч;
Г – световая кривая для ДКС 729 нм при темновой адаптации 6,5 и 12-16 ч.

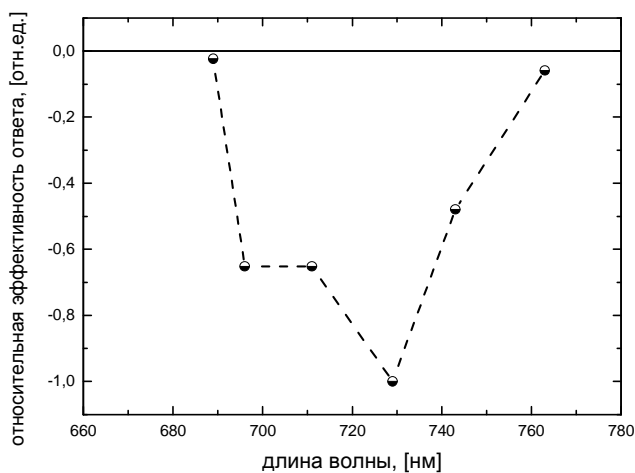


Рис. 9 Предварительный спектр действия закрывания устьиц бесхлорофильного мутанта *XL-18* в ответ на обращающий ДКС, следующий после КС (темновая адаптация 6,5 ч).

4. Ритмы устьичных движений на естественном фотопериоде

Известно, что в естественных условиях фитохромы участвуют в подстраивании фазы и периода циркадных ритмов растений к астрономическим суткам (McClung, 2001, Salome et al., 2002). Ранее в нашей группе было показано, что полное отсутствие фитохромов в растении существенно нарушает ритм устьичных движений на естественном фотопериоде: у бесфитохромного мутанта томата *aurea* после позднего утреннего открывания устьица фактически не закрывались в течение всего светового периода, в то время как у дикого типа томата наблюдались характерные для таких ритмов утреннее и вечернее открывания с частичным закрыванием днём (Константинова, 2007).

Для разделения ролей фитохромов в регуляции циркадных ритмов устьичных движений, были исследованы ритмы устьичных движений на естественном фотопериоде (свет с 6:00 до 22:00) у гороха дикого типа «Torsdag» и мутантов по отдельным фитохромам: *phya-1* и *phyb-5* (рис. 10).

У дикого типа (рис. 10 А-В) наблюдался характерный для устьичных движений C_3 растений ритм: вслед за утренним открыванием (максимум около 10:00) происходило частичное закрывание устьиц в середине дня (около 14:00), затем вечерний пик открывания (17:00), амплитуда которого несколько меньше утреннего, и закрывание при приближении ночи.

Ритм устьичных движений у мутанта по фитохрому А (рис. 10 А) существенно отличался от ритма дикого типа: устьица были сильно открыты с самого утра, постепенно (без дневного минимума и вечернего максимума) закрывались в течение дня (оставаясь более открытыми, чем у дикого типа), с резким закрыванием вечером. Сильное и быстрое закрывание в ответ на закатное освещение у данного мутанта полностью согласуется с литературными данными о роли фитохрома В в восприятии уменьшения соотношения К:ДК в закатном свете (Møller, 2002; Wang, Deng, 2002; Nagatani et al., 1991; López-Juez et al., 1992). Существенное отличие ритма устьичных движений у данного мутанта (рис. 10 А) от ритма дикого типа свидетельствует о важной роли фитохрома А в регуляции суточного ритма устьичных движений. Вероятно, в ритмических устьичных движениях участвует либо фитохром А, накопившийся за ночь в результате ресинтеза и медленно разрушающийся в течение светового периода, либо разрушает только определённая его часть (фотолабильный пул), а относительно фотостабильный пул принимает участие в регуляции устьичных движений в течение всего дня (Sineshchekov et al., 1999). Из представленных данных очевидна необходимость фитохрома А для регуляции ритма устьичных движений на естественном фотопериоде, но нельзя сделать вывод о том, какой из его пулов участвует в процессе.

У мутанта по фитохрому В (рис. 10 Б) сохранялся ритм, похожий на ритм у дикого типа (утреннее открывание, дневное прикрывание, вечернее открывание), но

наблюдалось более позднее (на 1 час), чем у дикого типа, утреннее открывание устьиц, а также отсутствовало вечернее закрывание. Таким образом, вклад фитохрома В в формировании ритма устьичных движений в течение светового дня менее существенный, чем вклад фитохрома А, хотя, по-видимому, он определяет более раннее открывание устьиц, а также закрывание их в конце дня.

Таким образом, фитохром А необходим и почти достаточен для обеспечения ритмических движений устьиц в течение светлого времени суток. Фитохром В также необходим, но роль его более второстепенна.

Форма кривой, полученной при сложении ритмов устьичных движений обоих фитохромных мутантов (рис. 10 В), фактически совпадает с ритмом дикого типа. Это свидетельствует о том, что фитохромы являются основными регуляторами циркадных ритмов устьичных движений (по крайней мере, у гороха), тогда как рецепторы синего света, вероятно, занимают подчинённое положение и не могут компенсировать отсутствие фитохрома. Что согласуется с выявленным ранее отсутствием ритма устьичных движений и транспирации на естественном фотопериоде у бесфитохромного мутанта томата *aurea* (Константинова, 2007).

Более полный вывод о состоянии эндогенных циркадных ритмов у мутантных растений можно будет сделать после исследования суточных изменений устьичной апертуры в постоянных условиях (постоянной темноте и/или освещении).

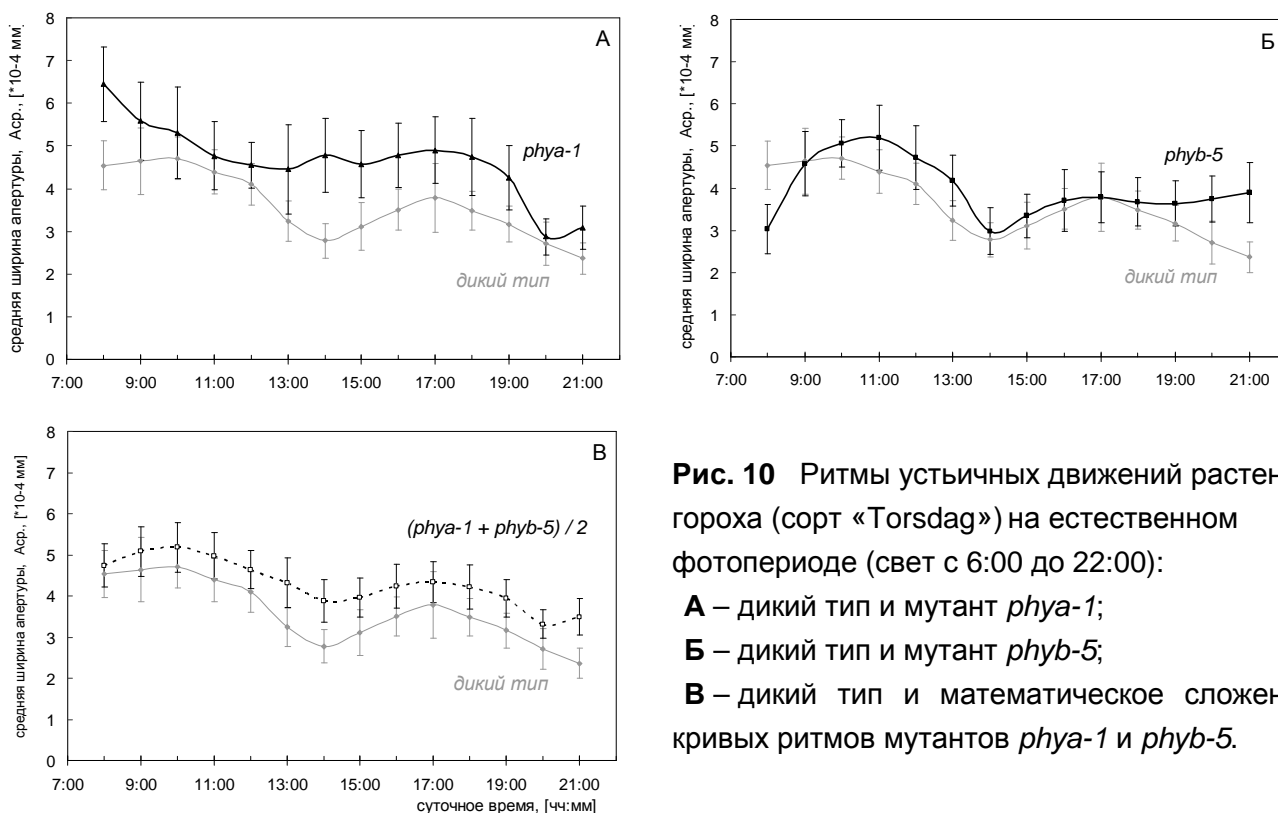


Рис. 10 Ритмы устьичных движений растений гороха (сорт «Torsdag») на естественном фотопериоде (свет с 6:00 до 22:00):
А – дикий тип и мутант *phyA-1*;
Б – дикий тип и мутант *phyB-5*;
В – дикий тип и математическое сложение кривых ритмов мутантов *phyA-1* и *phyB-5*.

5. Исследование содержания крахмала в замыкающих клетках устьиц бесхлорофильного мутанта XL-18

Одним из механизмов, обеспечивающих увеличение осмотического давления в замыкающих клетках при открывании устьиц, является деградация крахмала с образованием сахарозы и/или малата (Talbot, Zeiger, 1993). Для выяснения возможной роли этого процесса в фитохром-зависимом открывании устьиц были проведены наблюдения эпидермальных срезов, окрашенных раствором йода в молочной кислоте, методом световой микроскопии (Барыкина и др., 2000) (фотографии представлены в диссертации).

В хлоропластах замыкающих клеток устьиц дикого типа гороха после темновой адаптации наблюдались многочисленные крупные густо окрашенные гранулы. После освещения интактного листа КС (660 нм, 20 мин) окраска гранул в хлоропластах замыкающих клеток устьиц заметно ослаблялась, что свидетельствует об уменьшении количества крахмала вследствие его частичного гидролиза. Ранее запуск светозависимой деградации крахмала в устьичных клетках связывали в основном с рецептором синего света – фототропином (Roelfsema, Hedrich, 2005), однако отмечалось также небольшое уменьшение размеров крахмальных зёрен в ответ на красный свет, хотя эффективность его гораздо меньше, чем синего света (Vavasseur, Raghavendra, 2004).

В пластидах бесхлорофильного мутанта XL-18 после темновой адаптации также наблюдались окрашенные гранулы крахмала, хотя их размер и количество меньше, чем у дикого типа, что, очевидно, связано с общим дефицитом углеводов у бесхлорофильного мутанта, единственным источником органического углерода у которого служит запасной крахмал в семядолях. После освещения КС (660 нм, 20 мин) интактного листа бесхлорофильного мутанта XL-18 окраска гранул в пластидах замыкающих клеток устьиц, как и в случае дикого типа, заметно ослаблялась. Приведённые данные свидетельствуют о наличии крахмала в пластидах замыкающих клеток устьиц у бесхлорофильного мутанта XL-18, по крайней мере, на ранних стадиях его развития, и об участии процесса гидролиза крахмала (возможно, наряду с другими механизмами) в увеличении внутриклеточного осмотического давления, приводящего к открыванию устьиц в ответ на красный свет. Поскольку у бесхлорофильного мутанта XL-18 единственным пигментом, поглощающим КС, является фитохром (см. 1.3, 1.4), очевидно, именно этот фоторецептор запускает наблюдаемый процесс гидролиза крахмала.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование регуляция работы устьичного аппарата одним из важнейших сигналов окружающей среды – светом – насчитывает более 150 лет. Обнаруженный эффект открывания устьиц в ответ на белый свет интерпретировался сначала как результат

процесса фотосинтеза. Первые спектры действия открывания устьиц с максимумами в синей и красной областях подтверждали эти предположения. Но затем более детальные исследования выявили участие в регуляции устьичных движений дополнительных рецепторов синего света: фототропинов и криптохромов. Наиболее спорный вопрос о роли рецепторов красного света – фитохромов – в данном процессе получает в последнее время всё больше подтверждений. Однако при этом, как правило, исследуется лишь наличие классического, К/ДК-обратимого ответа низкоэнергетического (LFR) типа, вызываемого в большинстве случаев фитохромом В. В данной работе впервые представлены данные, свидетельствующие об участии в регуляции устьичных движений наряду с фотостабильным фитохромом В также и фотолабильного фитохрома А. Об участии фитохрома А в этом процессе свидетельствует обнаруженный нами ответ на дальний красный свет (высокоэнергетический, FR-HIR), свойственный только фитохрому А, а также наличие ответа на красный свет у мутанта по фитохрому В.

Использование мутантов *Pisum sativum* L., дефицитных по хлорофиллу, фитохромам А и В, а также отсутствие у гороха минорных фитохромов, как правило имеющихся у других видов растений, позволило разделить вклады этих трёх составляющих в комплексном устьичном ответе на свет красного и дальнего красного диапазонов. Из-за отсутствия мутантов, дефицитных одновременно по хлорофиллу и одному из фитохромов, фотосинтетическая составляющая у зелёных растений исключалась благодаря использованию длинноволнового или низкоинтенсивного света, неэффективного для фотосинтеза, но действующего для фитохромных ответов. Фотосинтетическая составляющая вызывает открывание устьиц в ответ на любой свет, поглощаемый хлорофиллом, обеспечивая замыкающие клетки необходимой для этого энергией и осмотиками. Суммирование данных о роли фитохромной системы позволяет сказать, что фитохром А обеспечивает открывание устьиц на КС и на ДКС, а фитохром В – К/ДК обратимые ответы: открывание на КС и закрывание на ДКС. При этом зависимые от фотолабильного фитохрома А устьичные ответы усиливаются при увеличении длительности темновой адаптации, во время которой происходит накопление белка данного фоторецептора.

Таким образом, в красной области спектра устьичные ответы, обусловленные обоими фитохромами, сонаправлены. Полученный спектр действия устьичных движений на КС у бесхлорофильного мутанта гороха *XL-18* имеет характерный для фитохромных ответов низкоэнергетического типа максимум 660-670 нм. Ответы на ДКС, обусловленные фитохромами А и В, направлены противоположно, причём соотношение вкладов двух фоторецепторов зависит от длины волны и интенсивности действующего света, а также от длительности темновой адаптации, что даёт сложные дозовые зависимости устьичных ответов, наблюдаемые при действии ДКС.

Преобразование фитохромного сигнала в осмотический механизм устьичных движений нуждается в подробном изучении. Из приведённых данных следует, что одним из механизмов реализации фитохромного сигнала является процесс гидролиза крахмала в пластидах замыкающих клеток. Образующиеся при этом растворимые сахара и/или малат

могут использоваться в качестве осмотиков и/или субстратов для активизирующегося дыхания при открывании устьиц. Этот механизм не требует наличия фотосинтетического аппарата в замыкающих клетках, так как наблюдается как у растений гороха дикого типа, так и у бесхлорофильного мутанта *XL-18*.

С помощью фитохромных мутантов выявлены роли обоих фитохромов гороха в регуляции ритма устьичных движений в течение светового дня. Показано, что при формировании ритма устьичных движений на естественном фотопериоде главную роль играет фитохром А, обеспечивая основные компоненты ритма: утреннее и вечернее открывания и дневное прикрывание. Фитохром В играет более минорную роль – из всех компонентов ритма обеспечивает только вечернее закрывание.

Показана также важная роль фитохрома В в контроле развития эпидермы листа: как основных эпидермальных, так и замыкающих клеток.

Таким образом, в работе доказана двухкомпонентная природа фитохромной регуляции устьичных движений, выявлены и разделены роли обоих имеющихся у гороха фитохромов как в быстром ответе на свет, так и в формировании ритма движений замыкающих клеток в течение светового периода.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что в регуляции устьичных движений у гороха принимают участие оба имеющихся у него компонента фитохромной системы: фитохромы А и В. Фитохром В вызывает открывание устьиц на красном свете и закрывание на дальнем красном (К/ДК-обратимый LFR тип ответа); фитохром А вызывает открывание устьиц в ответ как на красный, так и на дальний красный свет (ответ НIR типа).
2. Зависимые от фототемного фитохрома А устьичные ответы усиливаются при увеличении длительности темновой адаптации, во время которой происходит ресинтез и накопление данного фоторецептора.
3. Получены спектры действия устьичных движений: открывания на КС – с характерным для фитохромных ответов максимумом при 660-670 нм; и закрывания на ДКС – с характерным максимумом при 730 нм. При получении спектра действия закрывания, вероятно, не удалось полностью избавиться от вклада фитохрома А и вызываемого им параллельного открывания устьиц.
4. Обнаружено, что при формировании ритма устьичных движений на естественном фотопериоде главным фоторецептором является фитохром А, фитохром В также необходим, но его роль более второстепенна.
5. Показано, что одним из механизмов реализации фитохромного сигнала при открывании устьиц на красном свете является гидролиз крахмала в пластидах замыкающих клеток.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Кочетова Г.В., Сокольская С.В., Баштанова У.Б. Доказательства отсутствия функционального фотосинтетического аппарата в замыкающих клетках устьиц бесхлорофильного мутанта гороха *XL-18*. // Физиология растений и экология на рубеже веков: материалы всероссийской научно-практической конференции, Ярослав. гос. ун-т – Ярославль, 26-28 мая 2003, с. 33-34.
2. Сокольская С.В., Кочетова Г.В., Баштанова У.Б. Циркадный ритм транспирации. Регуляция светом и биологическими часами. // V съезд общества физиологов растений России и Международная конференция "Физиология растений – основа фитобиотехнологии", Пенза, 15-21 сентября 2003, ИФР РАН, 2003, с. 75-76.
3. Sokolskaya S.V., Sveshnikova N.V., Kochetova G.V., Solovchenko A.E., Gostimski S.A., Bashtanova O.B. Involvement of phytochrome in regulation of transpiration: red-/far red-induced responses in the chlorophyll-deficient mutant of pea. // Functional Plant Biology, 2003, Vol. 30, N 12, pp. 1249-1259.
4. Кочетова Г.В., Константинова С.В., Баштанова У.Б. Участие фитохромов А и В в регуляции устьичных движений на примере *Pisum sativum* L. и его бесхлорофильного мутанта *XL-18*. // Тезисы докладов XII международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов – 2005». Секция «Биология»; 12-15 апреля 2005г., М.: МАКС Пресс, 2005, с.109-110.
5. Кочетова Г.В., Константинова С.В., Баштанова У.Б. Участие фитохромов А и В в регуляции устьичных движений на примере *Pisum sativum* L. и его бесхлорофильного мутанта *XL-18*. // IV Съезд фотобиологов России. 26-30 сентября 2005 г. Материалы съезда. – Саратов, 2005. – С.87-90.
6. Кочетова Г.В., Константинова С.В., Баштанова У.Б. Участие фитохромов А и В в регуляции устьичных движений на примере *Pisum sativum* L. и его бесхлорофильного мутанта *XL-18*. // Регуляция роста, развития и продуктивности растений (Материалы IV Международной научной конференции, г. Минск, 26-28 октября 2005). – Мн.: Право и экономика, 2005. – с. 115.
7. Кочетова Г.В., Константинова С.В., Баштанова У.Б. Доказательство участия фитохрома в регуляции транспирации и устьичных движений. // Сигнальные системы клеток растений: роль в адаптации и иммунитете. Тезисы докладов второго международного симпозиума. Казань, 27-30 июня 2006 года. – Казань: «ФизтехПресс» КФТИ КазНЦ РАН, 2006. – с.188-189.
8. Кочетова Г.В., Константинова С.В., Баштанова У.Б. Разделение вкладов фитохромов А и В в регуляции устьичных движений у *Pisum sativum* L. // Современная физиология растений: от молекул до экосистем: Материалы докладов Международной конференции (в трёх частях). Часть 1. (Сыктывкар, 18-24 июня 2007 г.). – Сыктывкар: Коми НЦ УрО РАН, 2007. – с. 97-98.
9. Кочетова Г.В., Константинова С.В., Баштанова У.Б. Двухкомпонентная система фитохромной регуляции устьичных движений. // V Съезд Российского фотобиологического общества. Пушино 8-13 июня 2008 г. Тезисы докладов. – Пушино: ИФПБ РАН, 2008. – с. 132.