

## ФОТОРЕГУЛЯЦИЯ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО ФГА-ДЕГИДРОГЕНАЗНОГО КОМПЛЕКСА В ЛИСТЬЯХ ПШЕНИЦЫ

© 2020 г. В. Ю. Любимов<sup>а, \*</sup>, В. Д. Креславский<sup>а</sup>, А. Н. Шмарев<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук, “Федеральный исследовательский центр “Пушчинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”, Пушкино, Россия

\*e-mail: lvyu99@mail.ru

Поступила в редакцию 03.03.2020 г.

После доработки 19.03.2020 г.

Принята к публикации 19.03.2020 г.

Эксперименты проводили на 10-дневных проростках пшеницы (*Triticum aestivum* L), выращенных на песке с питанием Кюпа при температуре 22/18°C на белом свете (16 ч, 200 мкмоль квантов/(м<sup>2</sup> с)). Для активации фитохрома использовали матрицу светодиодов, излучающих свет в красной области спектра (КС,  $\lambda = 656$  нм,  $\lambda_{1/2} = 26$  нм), а для инактивации – матрицу светодиодов, излучающих дальний красный свет (ДКС,  $\lambda = 737$  нм,  $\lambda_{1/2} = 30$  нм). В конце ночного периода (8 ч) активность НАД-зависимого ФГА-дегидрогеназного комплекса (3-фосфоглицерат:АТФ фосфотрансфераза и D-глицеральдегид-3-фосфат:НАД<sup>+</sup> оксидоредуктаза) в направлении реакций 3-ФГК → 1,3-ФГК → 3-ФГА – составляла 6.0–7.0 мкмоль окисленного НАД\*Н/(мин г) свежего веса листа. При максимальной дозе КС-облучения (20 мин, 17.6 кДж/м<sup>2</sup>) листьев нативных растений происходило снижение ферментативной активности на 35–40%. КС-облучение в течение более длительного времени (30 и 40 мин) не приводило к дальнейшим изменениям активности фермента. При последовательном КС- и ДКС-облучении (20 мин, 3.00 кДж/м<sup>2</sup>) происходило полное снятие инактивирующего действия КС на ферментный комплекс. Было показано, что уже при 5 мин КС-облучения происходил спад скорости окисления НАД\*Н на 10–15%, а с увеличением дозы ферментативная активность снижалась линейно. При экспозиции КС-облученных растений в темноте до 120 мин было показано, что время полужизни КС-инактивированного состояния НАД-ФГА-дегидрогеназного комплекса составляло 30–45 мин. Таким образом, показана и исследована динамическая регуляция энерготрансформирующей фазы гликолиза в листьях пшеницы, опосредованная фитохромной системой. Такая фотокомпетентная низкоэнергетическая система может работать как регулятор суммарных окислительных процессов (гликолиз + цикл Кребса) при суточной смене темнота – свет и обратно.

**Ключевые слова:** *Triticum aestivum*, дальний красный свет, красный свет, НАД-фосфоглицеральдегид дегидрогеназа, фитохром, фоторегуляция

**DOI:** 10.31857/S0015330320050097

### ВВЕДЕНИЕ

В природных условиях в течение дня растения существуют в различных световых условиях, характеризующихся не только различной энергией падающей радиации, но также и различием спектров [1, с. 21–22; 2, с. 13]. В утренние часы отношение  $I_{660}/I_{730}$  имеет значение около 1.5, а в послеполуденный период  $\leq 1.0$ . Это, вероятно, может способствовать большей степени активации фитохромной системы в начале светового дня. Переход фитохрома из Ф<sub>хКС</sub> в Ф<sub>хДКС</sub> форму под действием света с длиной волны 660 нм служит регуляторным триггером ряда сложных физиологических процессов, таких

как прорастание семян, цветение, плодоношение и др. [3, 4]. Фитохромный контроль также осуществляется и в отношении действия различных стрессовых факторов: пониженных и высоких температур, засухи, УФ-радиации, засоления и сопровождающего их увеличения продукции H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в хлоропластах и при восстановлении кислорода в дыхательных процессах [4–6]. Значительно меньше известно исследований о регуляции ферментов углеродного метаболизма как в восстановительном, так и в окислительном направлениях. Ранее в наших исследованиях было показано, что восстановительная фаза цикла Кальвина находится под положительным контролем фитохрома [7]. С другой стороны, в ряде работ на растительных митохондриях из различных объектов обнаружена отрицательная регуляция активности сукцинатдегидрогеназы через Ф<sub>хА</sub> [8, 9], а также пере-

**Сокращения:** ДКС – дальний красный свет; КС – красный свет; СВЛ – свежий вес листа; Ф<sub>х</sub> – фитохром; Ф<sub>хКС</sub> – неактивная форма фитохрома; Ф<sub>хДКС</sub> – активная форма фитохрома.

ключение транспорта электронов на альтернативную оксидазу [10], приводящее к снижению продукции пероксида водорода в митохондриях. Снижение пропускной способности ЦТК под действием КС на фоне интенсификации восстановительной фазы ВПФЦ неизбежно ставит вопрос об активности в этих условиях процессов, поставляющих субстрат в митохондрии (ацетил-КоА). Одним из главных поставщиков углерода в цикл Кребса является гликолиз с его энерготрансформирующим ферментом D-глицеральдегид-3-фосфат:НАД<sup>+</sup> оксидоредуктазой (КФ 1.2.1.12).

Цель работы – выяснение возможного влияния фитохром-активного облучения целого растения на активность цитоплазматической НАД-ФГА-ДГГ, энергетических и временных параметров этого процесса.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Объект исследования.** В экспериментах использовали 15-дневные проростки пшеницы (*Triticum aestivum* L), которую выращивали на белом свете (16 ч фотопериод и интенсивность света 200 мкмоль квантов/(м<sup>2</sup> с)) при температуре 20–22/18°C и относительной влажности воздуха 60–70%. Субстратом для выращивания растений служил тщательно промытый песок с питательным раствором Кнопа.

**Облучение монохроматическим светом.** Для контролируемого и строго дозируемого облучения целых растений красным (КС) и дальним красным (ДКС) светом использовали матрицы светодиодов. Спектральные характеристики излучателей были измерены с помощью спектрометра S100 (“Solar Laser Systems”, Беларусь). Были получены величины для КС:  $\lambda_{\max} = 656$  нм,  $\lambda_{1/2} = 26$  нм,  $I = 80$  мкмоль квантов/(м<sup>2</sup> с) и для ДКС:  $\lambda_{\max} = 737$  нм,  $\lambda_{1/2} = 30$  нм,  $I = 30$  мкмоль квантов/(м<sup>2</sup> с). Дозирование КС осуществляли с помощью варьирования времени облучения, 1 мин = 0.88 кДж/м<sup>2</sup>. ДКС облучали в течение 20 мин (5.84 кДж/м<sup>2</sup>).

**Измерение ферментативной активности.** Измерение активности сопряженной системы ферментов (КФ 2.7.2.3 – фосфоглицераткиназа и КФ 1.2.1.12 – глицеральдегид фосфат НАД-оксидоредуктаза) цитоплазматического НАД-зависимого ФГА-дегидрогеназного комплекса (в направлении реакций 3-ФГК → 1,3-бисФГК → 3-ФГА) проводили в суммарном белковом экстракте из листьев пшеницы. Для этого среднюю часть второго листа (100–150 мг) гомогенизировали при температуре 4–6°C в НЕРЕС-КОН буфере (рН 7.6), содержащем 2 мМ MgSO<sub>4</sub>, 1 мМ ЭДТА\*Na<sub>4</sub>, 5 мМ ДТТ и 0.5% нерастворимого ПВП. Центрифугирование при 10000 g длилось 20 мин. Реакцию проводили по стандартной методике [11, с. 111] с

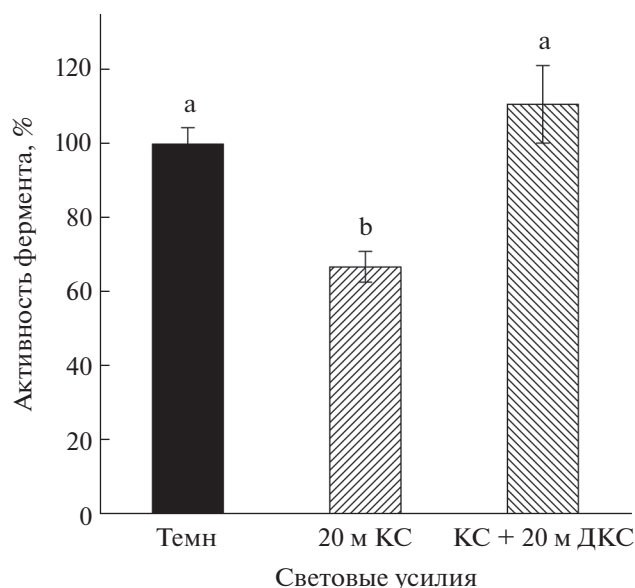
небольшой адаптацией к измерению активности в суммарном белковом экстракте в среде НЕРЕС-КОН буфера (рН 7.6), содержащей 2 мМ MgSO<sub>4</sub>, 1 мМ АТФ, 5 мМ 3-ФГК и 0.2 мМ НАД\*Н на спектрофотометре GENESYS 10 (“Termo Spectronic”, США). Скорость реакции выражали в микромольах окисленного НАД\*Н за 1 мин на 1 г свежесобранного листа (СВЛ). Фоновое окисление НАД\*Н в реакционной смеси, содержащей все, кроме 3-ФГК, составляло 0.05–0.07 мкмоль/(мин г СВЛ) и было постоянным во всех вариантах эксперимента.

Статистическую обработку данных и построение графиков осуществляли с помощью Sigma-Plot 11.0. Результаты представлены как среднее значение из трех биологических (выращивание растений) и 3–4 аналитических (получение суммарного белкового экстракта) повторностей в каждой биологической со среднеквадратической ошибкой. Латинскими буквами обозначено статистически достоверное отличие результатов при  $P < 0.05$ .

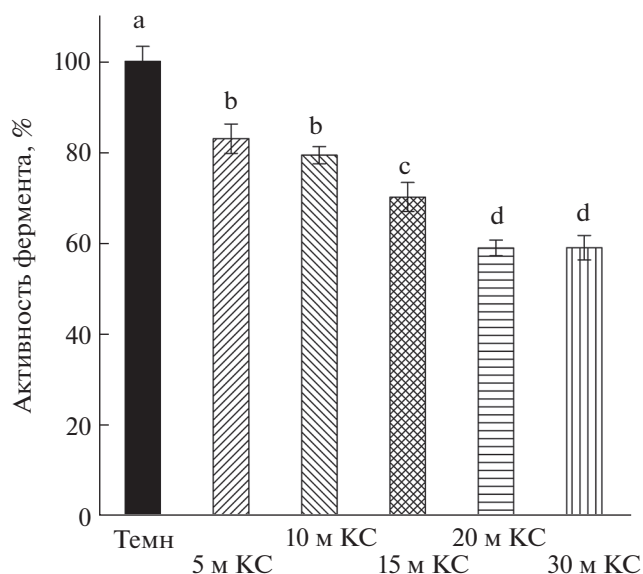
## РЕЗУЛЬТАТЫ

Измерения активности ФГА-дегидрогеназного (ДГГ) ферментного комплекса сразу после темного периода показали 6.0–7.0 мкмоль окисленного НАД\*Н/(мин г СВЛ). После облучения КС в течение 20 мин (17.6 кДж/м<sup>2</sup>) адаптированных в темноте растений, регистрировали снижение активности фермента, в среднем, до 5.0–6.0 мкмоль окисленного НАД\*Н/(мин г), что составляло, в среднем, снижение на 25–40% от темнового контроля. При последовательном экспонировании растений на КС и ДКС (20 минут) активность ферментного комплекса не отличалась от темнового варианта измерений (рис. 1).

Далее необходимо было исследовать зависимость активности ферментного комплекса от дозы КС-облучения. Этот параметр показывает, имеет ли процесс сигнальную природу и насколько он энергоемкий. В листьях растений, экспонированных на белом свете в течение 2–3 ч после темного периода, активность ФГА-ДГГ комплекса была на 10–15% ниже, чем в листьях, адаптированных к темноте в течение 8 ч. При облучении растений КС в течение минимально возможного в эксперименте времени (5 мин, 4.4 кДж/м<sup>2</sup>) регистрировали снижение активности ферментной системы на 18–20% (рис. 2). При увеличении времени КС-обработки растений до 10 (8.8 кДж/м<sup>2</sup>), 15 (13.2 кДж/м<sup>2</sup>) и 20 мин (17.6 кДж/м<sup>2</sup>) наблюдалось дальнейшее линейное снижение активности ферментной системы вплоть до 60% от контрольной величины. Более длительное действие фитохром-активной радиации (30 мин, 26.4 кДж/м<sup>2</sup> и дольше) не давало никаких дополнительных изменений в исследуемой системе.



**Рис. 1.** Активность ФГА-дегидрогеназного комплекса (% от темнового варианта) в суммарном белковом экстракте вторых листьев пшеницы после 8-часовой адаптации в темноте, после облучения нативных растений красным светом (КС) и дальним красным светом (20 мин ДКС) сразу после КС.



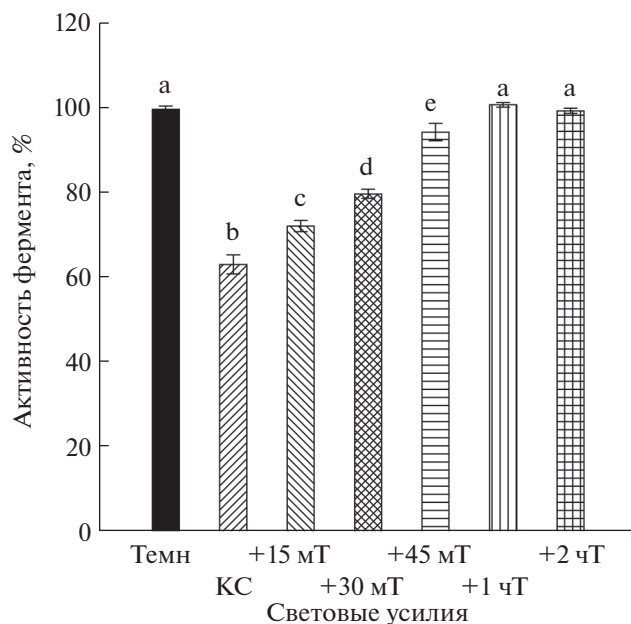
**Рис. 2.** Активность ФГА-дегидрогеназного комплекса (% от темнового варианта) в суммарном белковом экстракте вторых листьев пшеницы после 8-часовой адаптации в темноте и облучения различными дозами красного света (в течение 5, 10, 15, 20 и 30 мин) растений, адаптированных в темноте.

Существенной характеристикой модифицированного фитохромной системой функционирования фермента является время полужизни его модифицированного состояния. Этот параметр наряду с данными дозовой зависимости процесса может ха-

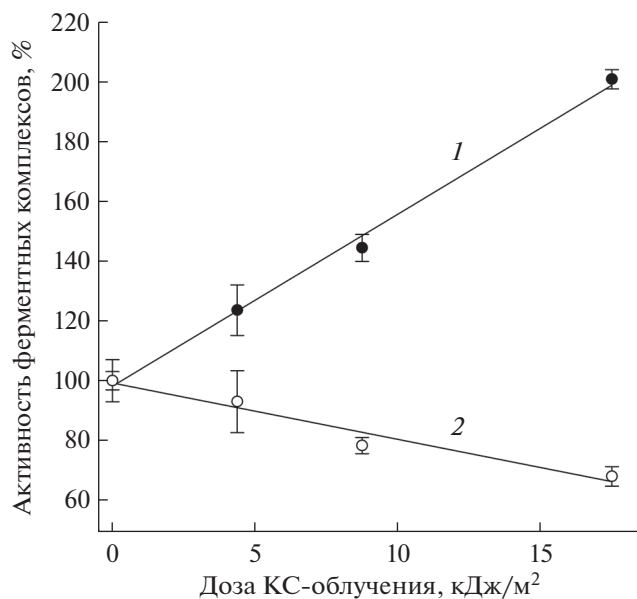
рактеризовать последовательность молекулярно-биохимических процессов, которые приводят к изменению активности того или иного фермента: затрагиваются ли какие-то реакции транскрипции и трансляции фермента, на что тратится значительное количество времени, или модуляция активности происходит на каком-то посттрансляционном этапе, как это было показано для пероксидазы [12]. Мы осуществили серию экспериментов, в которых измеряли активность ФГА-ДГГ комплекса сразу после облучения максимально эффективной дозой КС ( $17.6 \text{ кДж/м}^2$ ) и спустя определенные периоды времени в темноте после КС-облучения (рис. 3). Как и в других сериях, облучение КС приводило к подавлению ферментативной реакции  $3\text{-ФГК} \rightarrow 1,3\text{-бисФГК} \rightarrow 3\text{-ФГА}$  приблизительно на 40% (рис. 1, 2). При экспонировании растений в темноте после облучения КС регистрировали уменьшение степени ингибирования ферментной системы. Возвращение величины скорости реакции к темновому уровню линейно зависело от времени экспозиции в темноте. Полное возвращение к исходной величине, определенной в темновых условиях, происходило приблизительно через 60–90 мин. Экспонирование в темноте до 2 ч не давало каких-либо отличий от 60-минутной экспозиции. Таким образом можно определить, что время полужизни инактивированного состояния данной ферментной системы составляет около 30–45 мин.

## ОБСУЖДЕНИЕ

При облучении интактных листьев пшеницы красным светом дозой  $17.6 \text{ кДж/м}^2$  после длительного периода темновой адаптации происходило снижение активности цитоплазматического ФГА-ДГГ-комплекса на 35–40% (рис. 1). На этом же рисунке видно, что облучение растений дальним красным светом в течение 20 мин сразу после КС приводило к полному нивелированию эффекта последнего. Такая последовательность событий может свидетельствовать о том, что наблюдаемые изменения активности цитоплазматического ферментного комплекса при последовательном облучении  $\text{КС} \rightarrow \text{ДКС}$  модулируются фитохромной системой при ее переходе  $\Phi_{\text{КС}} \rightarrow \Phi_{\text{ДКС}} \rightarrow \Phi_{\text{КС}}$ . Действие ДКС в течение 20 мин может быть интерпретировано также следующим образом: за такое достаточно длительное время возможна самопроизвольная деградация  $\Phi_{\text{ДКС}}$ . Однако в работе [13] было показано, что время полужизни  $\Phi_{\text{ДКС}}$  составляет 1–2 ч в то время как в наших экспериментах полное обращение ингибирующего действия КС происходило при облучении ДКС за время, меньшее в 3–5 раз. Регуляторный потенциал фитохрома зависит, по крайней мере, от двух параметров: 1) его общего количества и 2) отношения содержания его активной формы к общему пулу ( $\Phi_{\text{ДКС}}/(\Phi_{\text{ДКС}} + \Phi_{\text{КС}})$ ) [14].



**Рис. 3.** Активность ФГА-дегидрогеназного комплекса (% от темнового варианта) в суммарном белковом экстракте листьев пшеницы после 8-часовой адаптации в темноте, после облучения 20 мин красным светом (КС) с последующим выдерживанием растений различное время в темноте (15 мин, 30 мин, 45 мин, 1 ч и 2 ч).



**Рис. 4.** Зависимость активности ФГА-дегидрогеназного комплекса (% от темнового варианта) в суммарном белковом экстракте листьев пшеницы после 8-ч адаптации в темноте от дозы КС-облучения. 1 – хлоропластный НАДФ-зависимый фермент, 2 – цитоплазматический НАД-зависимый фермент. Точки – значения, полученные в эксперименте, линии – линейная регрессия по экспериментальным точкам и бары – среднеквадратические ошибки среднего.

Синтез *de novo* белковой части фоторегулятора происходит одинаково и в темноте, и при освещении объекта [15]. Вследствие КС-облучения происходят два процесса: фотохимическое образование активной формы фитохрома ( $\Phi_{\text{хДКС}}$ ) и ферментативное образование убиквитин- $\Phi_{\text{хДКС}}$  комплекса с последующим его протеолизом [14–16], на два порядка превышающим скорость деградации  $\Phi_{\text{хКС}}$ . Функционирование ФГА-ДГГ комплекса при выдерживании растений в темноте после КС-облучения восстанавливается до исходного уровня за 1 ч, а величина полужизни этого состояния равна приблизительно 30–45 мин (рис. 3). Этот экспериментальный факт также позволяет нам отнести ингибирующее действие КС на счет фитохромной системы, вероятно –  $\Phi_{\text{хВ}}$ , учитывая обратимость эффекта КС последующим ДКС.

На рис. 4 представлены объединенные результаты данных и ранее опубликованных [7] исследований по хлоропластному ФГА-ДГГ комплексу. При увеличении дозы КС-облучения интактных листьев происходило разнонаправленное линейное изменение активности хлоропластного и цитоплазматического ФГА-ДГГ комплексов. В относительном выражении активация НАДФ-зависимого фермента достигала 200%, тогда как НАД-зависимый фермент инaktivировался только на 40%. Однако, исходная (сразу после темновой адаптации растений) активность этих ферментных систем составила 1.0–1.2 и 6.0–7.0 мкмоль НАД(Ф)\*Н/(мин г), соответственно. Из этого следует, что в абсолютном выражении максимальные разнонаправленные изменения активности энерготрансформирующих систем в хлоропластах и цитоплазме имели приблизительно одинаковые значения: 2.0–2.4 и 2.4–2.8 мкмоль НАД(Ф)\*Н/(мин г), соответственно.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования можно резюмировать следующим образом.

Градualное снижение активности цитоплазматического ФГА-дегидрогеназного комплекса при действии узкополосного КС (656 нм) осуществляется под контролем фитохромной системы, вероятно –  $\Phi_{\text{хВ}}$ , и количественно зависит от отношения ( $\Phi_{\text{хДКС}}/(\Phi_{\text{хДКС}} + \Phi_{\text{хКС}})$ ).

Кинетика темновой реактивации НАД-ФГА-ДГГ идентична таковой для энзиматической деградации фитохрома [13], что также может свидетельствовать о контроле фитохромной системы над цитоплазматическим ферментным комплексом.

Предполагается наличие фитохром-зависимой регуляции дыхания и фотодыхания растений [19], а также фотосинтетических процессов [14]. Из наших данных следует, что одинаковые количественные и энергетические показатели зависимо-

сти снижения гликолитической и увеличения хлоропластной ФГА-ДГГ [7] активности фитохромной системы можно интерпретировать как частичное фоторегуляторное переключение метаболизма и энергетики фотоавтотрофной клетки с дыхания на фотосинтез.

Работа выполнена при поддержке грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 20-04-00512а.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шульгин И.А. Растение и солнце. Л.: Гидрометеоздат. 1973. 251 с.
2. Тооминг Х.Г. Солнечная радиация и формирование урожая. Л.: Гидрометеоздат. 1977. 200 с.
3. Dechaine J.M., Gardnerand G., Weinig C. Phytochromes differentially regulate seed germination responses to light quality and temperature cues during seed maturation // *Plant Cell Environ.* 2009. V. 32. P. 1297.
4. Carvalho R.F., Campos M.L., Azevedo R.A. The role of phytochrome in stress tolerance // *J. Integr. Plant Biol.* 2011. V. 53. P. 920.
5. Carvalho R.F., Moda L.R., Silva G.P., Gavassi M.A., Prado R.M. Nutrition in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) as affected by light: revealing a new role of phytochrome // *AJCS.* 2016. V. 10. P. 331.
6. Kreslavski V.D., Schmitt F.-J., Keuer C., Friedrich T., Shirshikova G.N., Zarmukhamedov S.K., Kosobryukhov A.A., Allakhverdiev S.I. Response of the photosynthetic apparatus to UV-A and red light in the phytochrome B-deficient *Arabidopsis thaliana* L. hy3 mutant // *Photosynthetica.* 2016. V. 54. P. 321.
7. Любимов В.Ю., Креславский В.Д. Фитохром-В-зависимая регуляция восстановительной фазы фотосинтетической ассимиляции углерода // *Физиология растений.* 2017. Т. 64. С. 383.
8. Popov V.N., Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Leonova Yu.A. Light influence on succinate dehydrogenase activity in maize leaves // *J. Stress Physiol. Biochem.* 2005. V. 1. P. 30.
9. Popov V.N., Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Igamberdiev A.U. Succinate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* is regulated by light via phytochrome A // *FEBS Letters.* 2010. V. 584. P. 199.
10. Ribas-Carbo M., Giles L., Flexas J., Briggs W., Berry J. A. Phytochrome-driven changes in respiratory electron transport partitioning in soybean (*Glycine max.* L.) cotyledons // *Plant Biology.* 2008. V. 10. P. 281.
11. Биссвангер Х. Практическая энзимология. Изд. Бином Лаборатория знаний, Москва, 2010. 328 с.
12. Sharma R., Sopory S. K., Guha-Mukherjee S. Phytochrome regulation of peroxidase activity in maize // *Plant Science Letters.* 1976. V. 6. P. 669.
13. Clough R. C., Vierstra R. D. Phytochrome degradation // *Plant, Cell and Environment.* 1997. V. 20. P. 713.
14. Kreslavski V.D., Los D.A., Schmitt F.J., Zharmukhamedov S.K., Kuznetsov V.V., Allakhverdiev S.I. The impact of the phytochromes on photosynthetic processes // *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics* 2018. V. 1859. P. 400.
15. Quail P. H., Schxfer E., Marme D. Turnover of phytochrome in pumpkin cotyledons // *Plant Physiol.* 1973. V. 52. P. 128.
16. Войцеховская О.В. Фитохромы и другие (фото)рецепторы информации у растений // *Физиология растений.* 2019. Т. 66. С. 163.
17. Franklin K.A., Quail P.H. Phytochrome functions in *Arabidopsis* development // *J. Exp. Bot.* 2010. V. 61. P. 11.
18. Епринцев А.Т., Федорин Д.Н., Сазонова О.В. Фитохром-зависимая регуляция активности фумаратгидратазы в зеленых листьях кукурузы // *Физиология растений.* 2015. Т. 62. С. 474.
19. Igamberdiev A.U., Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Popov V.N. Phytochrome-mediated regulation of plant respiration and photorespiration // *Plant Cell Environ.* 2014. V. 37. P. 290.