

ISSN 1561-8323 (Print)
ISSN 2524-2431 (Online)

БИОЛОГИЯ
BIOLOGY

УДК 581.1
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2019-63-1-61-71>

Поступило в редакцию 27.08.2018
Received 27.08.2018

Е. М. Кабачевская, С. В. Суховеева, академик И. Д. Волотовский

*Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь*

**САХАРОЗАВИСИМАЯ РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ФОСФОЛИПАЗЫ D
В ПРОРОСТКАХ ОВСА**

Аннотация. Исследовали зависимость активности фосфолипазы D (ФлD), катализирующей катаболизм глицерофосфолипидов, от действия экзогенных растворимых сахаров в условиях сахарного голодания растений, вызванного затемнением. Обнаружено, что активность ФлD в этилированных проростках овса (*Avena sativa* L.) подавляется обработкой растений моно- и дисахаридами: глюкозой, сахарозой и маннозой. Эти же сахара нивелируют активирующее действие затемнения на активность фермента в зеленых проростках овса. Обработка проростков неорганическим фосфатом также приводит к модуляции активности данного фермента, сходной с действием сахаров. При этом действие протестируемых сахаров имитирует световую модуляцию активности ФлD. Секвенирование частичной последовательности мРНК гена *ФлD* овса показывает более чем 80 %-ное сходство с последовательностями *ФлD* других видов злаковых. Облучение этилированных проростков овса красным светом и затемнение зеленых проростков ингибируют или индуцируют экспрессию выявленного гена *ФлD* соответственно. Таким образом, экспрессия гена *ФлD* овса и ферментативная активность продукта его экспрессии (ФлD) проявляют чувствительность к изменениям световых условий роста растений. Следовательно, эти данные указывают на то, что ФлD играет важную роль в адаптации растений к действию затемнения и связанного с ним сахарного голодания.

Ключевые слова: проростки овса (*Avena sativa* L.), фосфолипаза D, сахарное голодание, *din*-гены

Для цитирования: Кабачевская, Е. М. Сахарозависимая регуляция активности фосфолипазы D в проростках овса / Е. М. Кабачевская, С. В. Суховеева, И. Д. Волотовский // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2019. – Т. 63, № 1. – С. 61–71. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2019-63-1-61-71>

Alena M. Kabachevskaya, Sviatlana V. Sukhaveyeva, Academician Igor D. Volotovskii

Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

SUGAR-DEPENDENT REGULATION OF THE PHOSPHOLIPASE D ACTIVITY IN OAT SEEDLINGS

Abstract. The dependence of the phospholipase D (PLD) activity, catalyzing the catabolism of glycerophospholipids, on exogenous soluble sugars under the conditions of sugar starvation caused by darkening of plants was studied in oat (*Avena sativa* L.) seedlings. It was found that the PLD activity in etiolated oat seedlings was suppressed by the treatment of plants with mono- and disaccharides: glucose, sucrose and mannose. These sugars neutralized the activating effect of darkening on the activity of PLD in green oat seedlings. The treatment of oat seedlings with inorganic phosphate also led to the modulation of the PLD activity similar to that with sugars. In this case, the action of the tested sugars mimicked the light modulation of the PLD activity. Sequencing the partial mRNA sequence of oat PLD gene showed more than 80 % homology with the sequences of PLD α of other cereal species. Illumination of etiolated oat seedlings with red light and darkening of green seedlings in darkness inhibited or induced the PLD expression, respectively. Thus, the expression of PLD and the enzymatic activity of PLD showed the sensitivity to changes in the light conditions of a plant growth. Consequently, these data indicate that PLD plays an important role in adaptation of oat plants to darkening and sugar starvation.

Keywords: oat seedlings (*Avena sativa* L.), phospholipase D, sugar starvation, *din*-genes

For citation: Kabachevskaya E. M., Sukhaveyeva S. V., Volotovskii I. D. Sugar-dependent regulation of the phospholipase D activity in oat seedlings. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2019, vol. 63, no. 1, pp. 61–71 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2019-63-1-61-71>

Введение. Развитие растения под действием света (фотоморфогенез) и в темноте (скотоморфогенез, или этиоляция) заметно отличается по параметрам клеточного метаболизма, генной экспрессии, морфологии органов и пр. Известно, что перенос растений, выращенных на свету, в темноту является сигналом для модуляции многочисленных клеточных характеристик, отражающих адаптацию развития растения в условиях, неблагоприятных для процесса фотосинтеза [1; 2]. В частности, при экспонировании растений в темноте клеточные запасы углеводов быстро истощаются, а возникающее при этом сахарное голодание активирует работу различных катаболических ферментов, катализирующих деградацию липидов, белков, жирных кислот, аминокислот, что необходимо для компенсации недостатка сахаров как источника углерода в клетке [3; 4]. В научной литературе описана большая группа так называемых *din* (dark-inducible)-генов, общим свойством которых является увеличение накопления транскриптов в темноте и снижение экспрессии при облучении видимым светом или при обработке растворимыми сахарами, такими как глюкоза (Глю), сахароза (Сах) или манноза (Ман) [5; 6]. Предполагается, что большая часть *din*-генов кодирует ферменты с катаболическими функциями.

Принято считать, что ключевую роль в различных внутри- и межклеточных процессах в растениях играет катаболизм липидов [7; 8]. Среди растительных ферментов, катализирующих гидролиз липидов, центральное место занимает фосфолипаза D (ЕС 3.1.1.4., ФлD) [9; 10]. ФлD выполняет ряд метаболических и сигнальных функций и участвует в контроле роста и развития растений: прорастании семян, старении клетки, адаптации растений к действию различных стрессовых факторов внешней среды. Известно, что активность ФлD в этиолированных проростках (ЭП) овса выше, чем в зеленых проростках (ЗП), выращенных на свету, а освещение ЭП белым или красным светом (КС) приводит к ингибированию активности ФлD, что свидетельствует о фитохромной зависимости данного процесса [11]. Несмотря на очевидную важность этих событий для жизни растений, об их функциональной значимости до сих пор известно мало. Механизмы наблюдаемого эффекта модуляции активности ФлD под действием света/темноты остаются до конца неясными. Между тем, в условиях затемнения растительные ткани начинают испытывать недостаток углеводов (сахарное голодание), являющихся в клетке основным источником углерода, который необходим для поддержания биосинтетических реакций и энергетического баланса клетки. Остается неясным, имеется ли связь между адаптивной реакцией растения на индуцированное темнотой сахарное голодание и активностью ФлD, изменяющейся при затемнении растения и восстановлении нормальных условий роста. Для того чтобы проверить эту гипотезу, в данной работе проводились эксперименты по оценке возможной сахарозависимости активности ФлD, а также по оценке того, может ли ген *ФлD* быть отнесен к группе *din*-генов.

Материалы и методы исследования. Проростки овса (*Avena sativa* L.) выращивали на двух слоях мокрой фильтровальной бумаги в полной темноте или на белом свету (12 ч фотопериод при 150 мкмоль/м²с). Все манипуляции с ЭП проводили на тусклом зеленом свету (вольфрамовая лампа, 15 Вт, стеклянный фильтр с коробкой передач при 470–650 нм, 0,45 мкмоль/м²с). Для КС-облучения ЭП использовали вольфрамовую лампу 100 Вт (40 мкмоль/м²с) с соответствующим интерференционным фильтром (660 нм). Интенсивность света измеряли с помощью РМА 2140 фотометра (Solar Light Company, США).

В экспериментах с тестируемыми сахарами и неорганическим ортофосфатом (Pi) корни интактных проростков овса погружали в рабочие растворы и инкубировали в течение указанного времени: ЭП – 1 ч и 20 мин; ЗП – 48 ч соответственно. Для обработки растений использовались 3 %-ный раствор Глю, 3 %-ный раствор Сах, 0,3 %-ный Ман, 6,25 М раствор Pi. Ингибитор протеинкиназ Н7 (Sigma, Германия) использовался в концентрации 10 мкМ.

Общую РНК выделяли из замороженных в жидком азоте листьев проростков овса (100 мг на образец) с помощью TRI Reagent (Sigma, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Образцы РНК (2 мкг) обрабатывали свободной от РНКаз ДНКазой (Thermo Fisher Scientific), а затем проводили обратную транскрипцию. Реакционная смесь для синтеза кДНК содержала 200 ед. обратной транскриптазы RevertAidTM M-MuLV (Fermentas), случайные (random) гексамерные праймеры (0,2 мкг), 0,1 мМ дНТФ, 20 ед. ингибитора рибонуклеаз RiboLock (Thermo Fisher Scientific) в общем объеме реакционной смеси 20 мкл. Ген-специфические ПЦР-праймеры для

генов *ФлD* и *18S рPHK* (использовался как референсный ген) были разработаны при помощи программного обеспечения Vector NT110 (Invitrogen). Последовательности праймеров были следующими: ФлD(F), 5'-CAAGGGCGCCACCAAGATAT-3'; ФлD(R), 5'-TGTGGAAGGACTCGTACCAACG-3' (ожидаемый размер продукта – 113 пар оснований); 18S рPHK(F), 5'-CATGTGTCGTGACCCTGACCAAAA-3'; 18S рPHK(R), 5'-TGCCGCGCACTCAGCAGGAATA-3' (64 п. н. продукт). ПЦР-праймеры были синтезированы фосфорамидитным методом с использованием ДНК-синтезатора MerMade-4 (Bioautomation, США). ПЦР в реальном времени проводили с помощью системы MiniOpticon (MJ Research) в течение 40 циклов (95 °С – 45 с, 57 °С – 30 с и 72 °С – 30 с). Реакционная смесь для ПЦР в реальном времени состояла из 1×SYBR Green I (Invitrogen), 1 ед. Taq ДНК-полимеразы (Thermo Fisher Scientific), 10×Taq буфер с KCl, по 8 пмоль каждого праймера, 0,2 мМ смесь дНТФ, 5 мкл кДНК (50 нг) в общем объеме 20 мкл. Изменения уровня экспрессии генов определяли с использованием сравнительного C_T -метода с *18S рPHK* в качестве референсного гена. Для секвенирования продукты ПЦР клонировали в векторе pUC19 DNA/Smal (Thermo Fisher Scientific) и секвенировали с использованием Big Dye Terminator v. 3.1. Sequencing kit (Applied Biosystems, США). Анализ фрагментов после реакции секвенирования проводили на ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (США).

Проростки овса измельчали и гомогенизировали в фарфоровой ступке с пестиком в 0,1 М ацетатном буфере (рН 5,6), содержащем 40 мМ CaCl₂ и 8 % Сах. Соотношение массы навески растительной ткани к объему гомогенизационного буфера составляло 1 : 1. Гомогенат фильтровали через капроновую мелкоячеистую ткань и полученные фильтраты центрифугировали при 3000g в течение 20 мин. Осадок отбрасывали, а супернатанты использовали для измерения активности ФлD. Для оценки активности ФлD использовали набор Two-Step Amplex® Red Phospholipase D Assay Kit (Molecular Probes). Данный набор позволяет определять активность ФлD в фермент-связанном анализе с использованием 10-ацетил-3,7-дигидроксибензоксазина (Amplex Red реагента), флуорогенного зонда для H₂O₂. Смысл анализа состоит в том, что первоначально ФлD расщепляет фосфатидилхолин с образованием холина и фосфатидной кислоты. Затем холин окисляется до бетаина и H₂O₂, а H₂O₂ в присутствии пероксидазы хрена взаимодействует с Amplex Red реагентом с образованием флуоресцентного продукта резорурфина. Для анализа активности ФлD овса использовался двухступенчатый вариант коммерческого протокола Amplex® Red Phospholipase D Assay Kit, в которой катализируемая ФлD реакция гидролиза фосфатидилхолина проводилась при рН 5,6. Дальнейшие операции проводили при рН 7,0, оптимальной для активностей холиноксидазы и пероксидазы хрена, что позволяло провести детекцию образования резорурфина из Amplex Red реагента.

Инкубационная смесь для проведения реакции гидролиза, катализируемой ФлD, содержала исследуемый гомогенат (10 мкг белка) в ацетатном буфере (рН 5,6) и 5 мкл 100 мМ фосфатидилхолина. Смесь инкубировалась при 37 °С в течение 30 мин. Общий объем смеси составлял 100 мкл. По истечении этого времени к реакционной смеси добавляли 100 мкл раствора холинксидазы (2 ед/мл), пероксидазы (0,2 ед/мл) и 100 мкМ Amplex Red реагента в 50 мМ Трис-НСl буфере (рН 8,0), содержащем 25 мМ CaCl₂. Смесь инкубировали в течение 30 мин при 37 °С для образования резорурфина. Интенсивность флуоресценции образовавшихся продуктов измеряли на флуориметре фирмы Solar. Флуоресценция возбуждалась светом с длиной волны 530 нм и измерялась при 590 нм. Интенсивность флуоресценции резорурфина использовалась в качестве показателя активности ФлD, на графиках она представлена в относительных единицах.

Представленные в сообщении данные являются средними из трех биологических и трех аналитических повторностей. Повторность в пределах одного варианта для разных измерений составляла 15–20 растений. На рисунках приведены средние значения и их стандартные ошибки. Достоверность различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Изучали зависимость активности ФлD в клетках проростков овса от действия сахаров и Рi. Первоначально оценивали влияние экзогенных растворимых сахаров (Сах, Глю и Ман) на активность ФлD в ЭП и ЗП овса (рис. 1, а). Обработка ЭП сахарами снижала активность ФлD аналогично облучению КС. Кроме того, все исследованные сахара оказались эффективными в блокировании действия темноты на активность ФлD в ЗП (рис. 1, б).

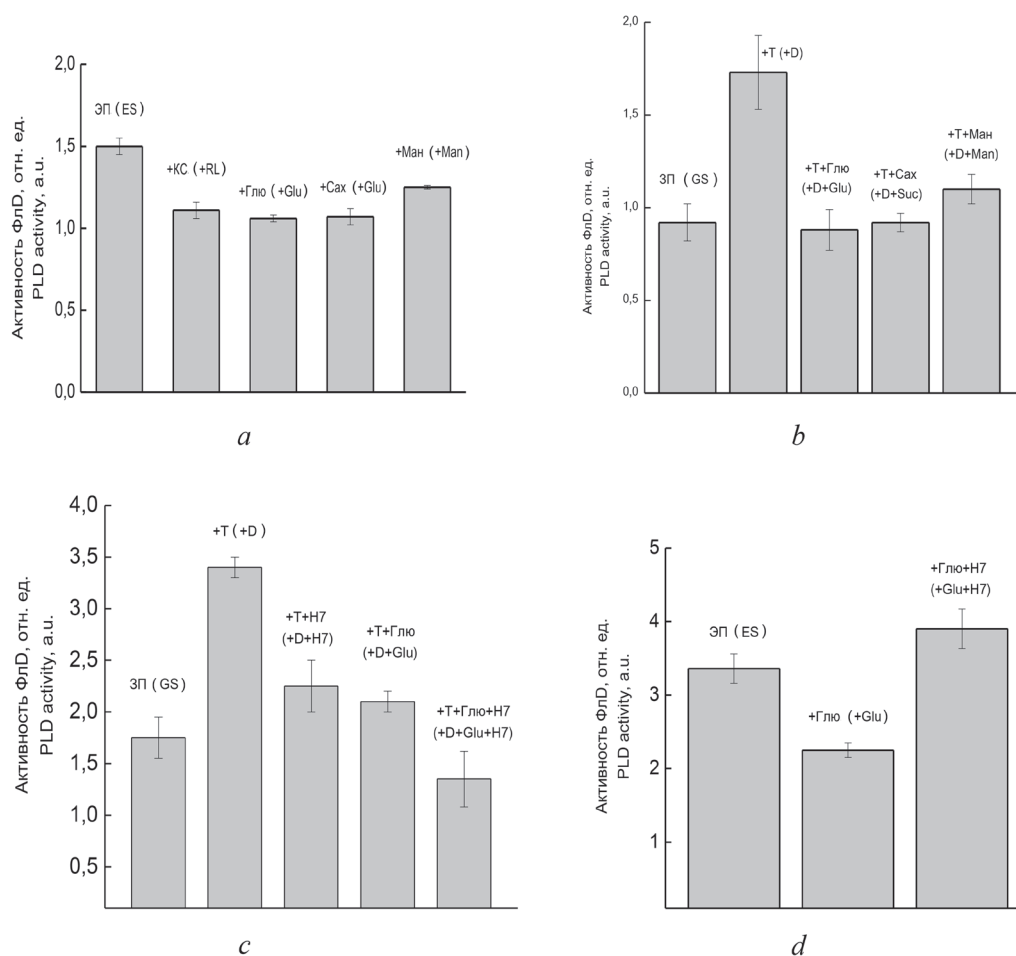


Рис. 1. Зависимость активности ФлД от обработки проростков овса растворимыми сахарами: влияние Глю, Сах, Ман и КС на активность ФлД в ЭП (а); влияние Глю, Сах, Ман и затемнения на активность ФлД в ЗП (b); влияние Н7 на модуляцию активности ФлД, индуцированную Глю в ЗП на фоне затемнения (с); влияние Н7 на модуляцию активности ФлД, индуцированную Глю в ЭП в темноте (d). Т – затемнение

Fig. 1. The influence of soluble sugar on oat seedlings: glucose (Glc), sucrose (Suc), mannose (Man), and red light (RL) on phospholipase D (PLD) activity in etiolated seedlings (ES) (a); Glc, Suc, Man, and dark treatment (D) on PLD activity in green seedlings (GS) (b); influence of protein kinase inhibitor H7 on Glc-induced PLD activity in GS under D (c); influence of protein kinase inhibitor H7 on Glc-induced PLD activity in ES in D (d). D – dark treatment

Как оказалось, влияние сахара и темновой обработки зависело от процессов фосфорилирования. Ингибитор протеинкиназ Н7 обращал эффект темновой обработки на активность ФлД в ЗП и усиливал эффект Глю в ходе темновой обработки растений (рис. 1, c). В то же время Н7 блокировал ингибирующее действие Глю в ЭП (рис. 1, d).

Принимая во внимание данные о взаимосвязи между сигнальными цепями, индуцированными сахарами и неорганическим фосфатом [12; 13], были проведены эксперименты для проверки их возможного взаимодействия при регуляции активности ФлД. Установлено, что экзогенный Рi обращал активирующее действие темноты на активность ФлД в ЗП и не влиял на активность фермента в ЗП на свету (рис. 2, a). Рi в темноте подавлял активность ФлД в ЭП в меньшей степени, чем КС-облучение (рис. 2, b). Если ЗП обрабатывали Ман и Рi, активность ФлД повышалась без какого-либо темнового воздействия (рис. 2, c). Одновременное действие Ман и Рi на ЭП в темноте не снижало активность ФлД по сравнению с их одиночными эффектами (рис. 2, d). Сравнительный анализ совместных эффектов Глю, Ман, Рi и темновой обработки на активность ФлД показал, что одновременная обработка ЗП Рi и Ман на фоне переноса растений в темноту не влияла на ее ФлД-активирующий эффект (рис. 2, e), в то время как обработка Глю + Рi блокировала действие темновой обработки (рис. 2, f).

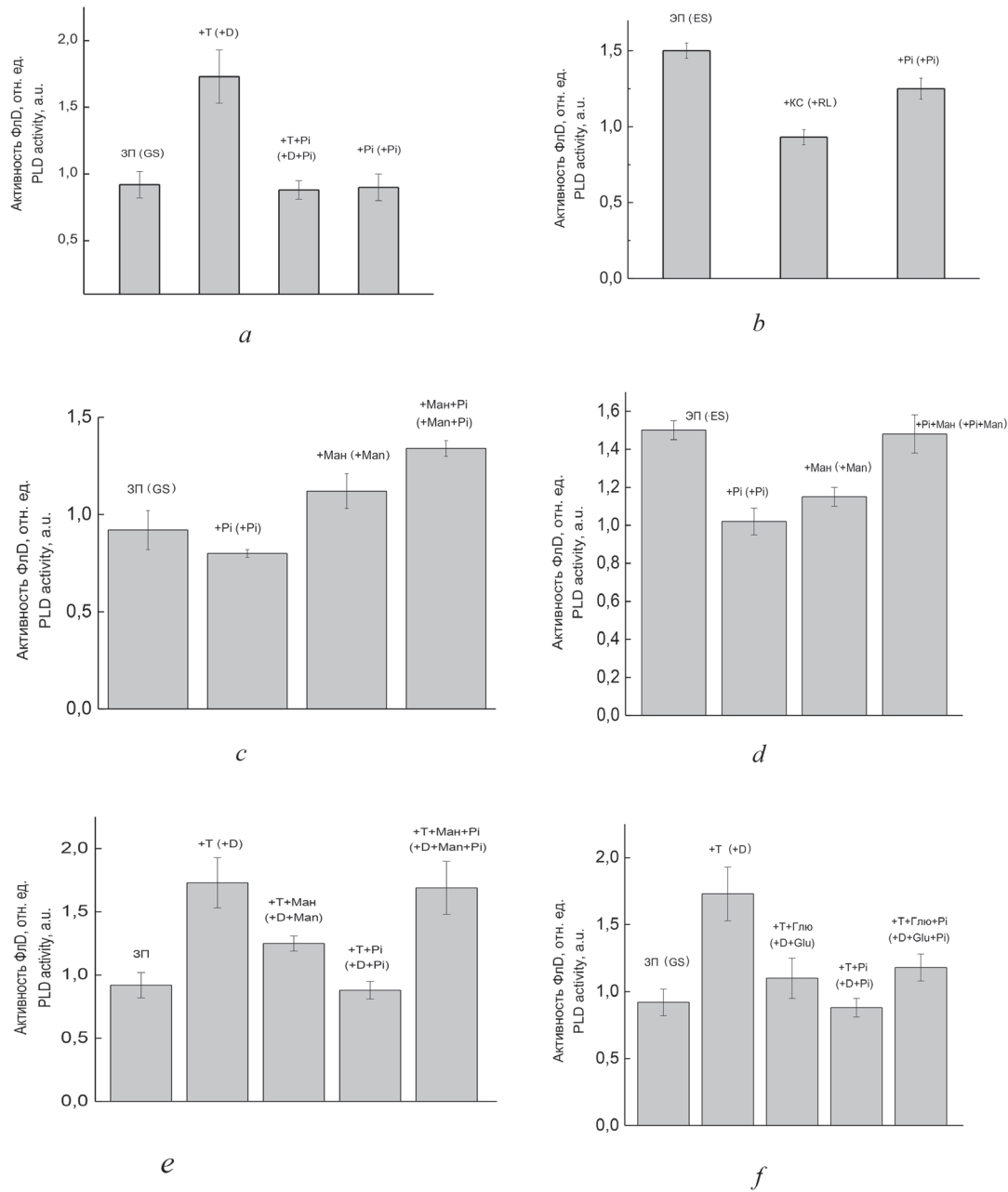


Рис. 2. Влияние Pi на активность ФлD в проростках овса: в ЗП (a); в ЭП (b); отдельные и комбинированные эффекты Pi и Ман на активность ФлD в ЗП (c); отдельные и комбинированные эффекты Pi и Ман на активность ФлD в ЭП (d); отдельные и комбинированные эффекты Pi и Ман на активность ФлD в ЭП при 48-часовом затемнении (e); отдельные и комбинированные эффекты Pi и Глю на активность ФлD в ЭП при 48-часовом затемнении (f). Т – затемнение

Fig. 2. The influence of inorganic phosphate (Pi) on phospholipase D (PLD) activity in oat seedlings: in green seedlings (GS) (a); in etiolated seedlings (ES) (b); separate and combined effects of Pi and mannose (Man) on PLD activity in GS (c); separate and combined effects of Pi and Man in ES (d); separate and combined effects of Pi and Man in ES under 48 h dark treatment (e); separate and combined effects of Pi and Glc in ES under 48 h dark treatment (f). D – dark treatment

Чтобы оценить возможный механизм светозависимой регуляции активности ФлD овса, была проанализирована экспрессия гена *ФлD* по критерию транскрипции с использованием метода ОТ-ПЦР в реальном времени. Из-за отсутствия опубликованных нуклеотидных последовательностей гена *ФлD* для *Avena sativa* L., известные последовательности мРНК для *ФлDa* риса, кукурузы, ячменя (GenBank, Numbers – D73411.1, D73410.1, AJ495780.1, AB001920, AF271356.1) были использованы для дизайна пар праймеров, пригодных для идентификации и анализа экспрессии предполагаемого гена *ФлD* овса в ходе ОТ-ПЦР в реальном времени.

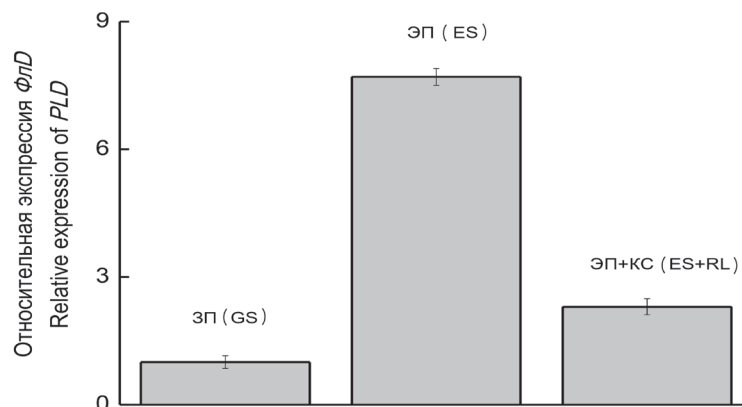
Среди протестированного набора пар праймеров была выбрана одна, наиболее эффективная для амплификации нуклеотидной последовательности целевого гена в образцах РНК, полученных из клеток проростков овса. В ходе ОТ-ПЦР образовывался продукт ожидаемого размера (113 п. о.). Секвенирование показало, что нуклеотидная последовательность данного ПЦР-продукта проявляет 87-, 84-, 81-процентную гомологию с эквивалентными последовательностями генов *ФлD* кукурузы, плевела опьяняющего (*Lolium temulentum* L.) и риса соответственно (рис. 3, а). Анализ секвенированной последовательности позволил предположить, что этот ПЦР-продукт представляет собой фрагмент гена *ФлDa* овса.

```

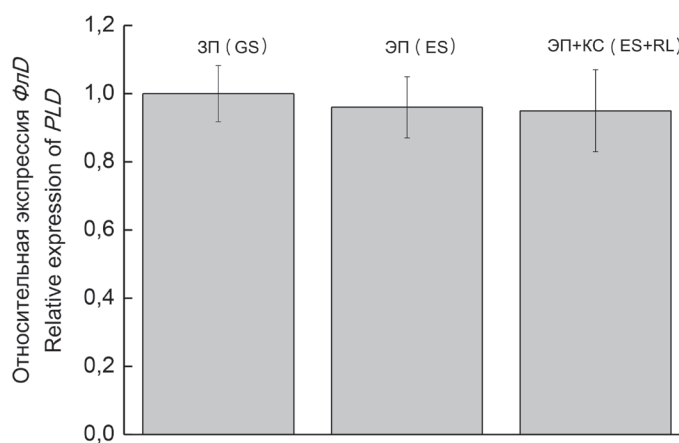
(1) 1      10      20      30      40      50      60      70      80
1 (1) TGTGGAGG--CTCGTACCCAACGAGGGTTCAAGGGCTCGTTGGACAACATCCTGGTACGCCCGACACCGAGCTTTCTCCGAGA
2 (1) TGTGGAAGGACTCGTACCCAACGAGGGTTCAAGGGCTCGTTGGAGATCATCCGGGTCCGCCCGACACGGGCSTTCTCCGAGA
3 (1) TGTGGAACGACTCATACCAAGCGAGGGTTGATGGGCTCATTGGTTATCATCCTAGTTCGCCCTACACCGAGCTTTCTCCGAGA
4 (1) TGTGGAATGACTCGTACCAAGCGAGGGTCACTGGGCTCGTTAGCCCAACATCCTGGTACGCCCAACCGGAGCCSTTCTCCAGG

```

а



b



c

Рис 3. Экспрессия гена *PLD* в проростках овса: сравнение нуклеотидных последовательностей ДНК-фрагмента предполагаемого гена *ФлD* овса (1) и *ФлD* других видов злаковых (а): 2 – *Zea mays* L., 3 – *Lolium temulentum* L., 4 – *Oryza sativa* L.; относительный уровень экспрессии *ФлD* в базальной зоне листьев ЗП, ЭП, ЭП, облученных КС в течение 1 ч (b); относительный уровень экспрессии *ФлD* в апикальной зоне листа ЗП, ЭП и ЭП, облученных КС в течение 1 часа (c)

Fig. 3. Expression of phospholipase D (*PLD*) gene in oat seedlings: multiple alignment of nucleotide sequences of the DNA-fragment containing a part *PLD* in oat genome (1) and *PLDs* in other grain species: 2 – *Zea mays* L., 3 – *Lolium temulentum* L., 4 – *Oryza sativa* L., Japonica Group (a); relative expression level of *PLD* in basal zone of green seedlings (GS), etiolated seedlings (ES), and ES irradiated by red light (RL) for 1 h (b); relative expression level of *PLD* in apical zone of GS, ES, and ES irradiated by RL for 1 h (c)

Относительный уровень его экспрессии в базальной зоне ЭП овса оказался значительно более высоким, чем в базальной зоне ЗП (рис. 3, *b*). Освещение ЭП КС в течение 1 ч приводило к снижению уровня экспрессии гена *ФлD* в базальной части проростка (рис. 3, *b*), в то время как влияние светового облучения на экспрессию *ФлD* в апикальной части ЭП обнаружено не было (рис. 3, *c*). Перенос ЗП в темноту на длительное время вызывал повышение уровня экспрессии гена *ФлD* в базальной зоне проростков (рис. 4, *a*). В то же время в ходе инкубации растений в темноте в апикальной части ЗП изменение в уровне экспрессии было значительно менее выраженным (рис. 4, *b*).

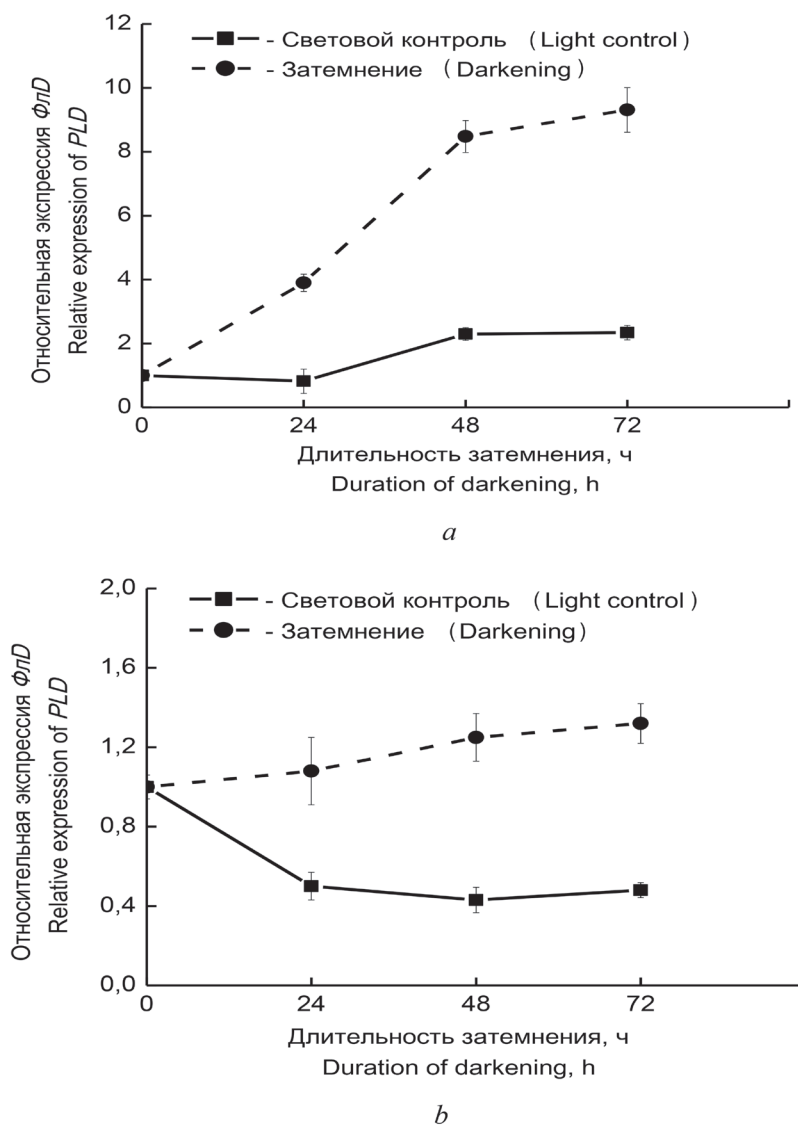


Рис. 4. Модуляция относительного уровня экспрессии *ФлD* при длительном затемнении: в базальной зоне ЗП (*a*); в апикальной зоне ЗП (*b*)
 Fig. 4. Modulation of relative expression level of *PLD* under extended darkness: in the basal zone of green seedlings (GS) (*a*); in the apical zone of GS (*b*)

Повышенный уровень активности *ФлD* в ЭП и увеличение активности фермента в ЗП после их переноса в условия длительного затемнения указывают на важную роль данного фермента в адаптации растений к темноте. Катализируемый *ФлD* гидролиз мембранных фосфолипидов может быть для растительной клетки одним из возможных способов замещения Глю как источника углерода в условиях, неблагоприятных для фотосинтеза и возникающего при этом недостатка углеводов. Действительно, активность *ФлD* в ЭП овса ингибировалась не только КС-осве-

щением, но и инкубацией растений в растворах ряда моно- или дисахаридов. Принимая во внимание, что ингибитор фотосинтеза диурон увеличивал активность ФлД в ЗП на свету аналогично эффекту затемнения [9], можно предполагать связь активности ФлД с фотосинтетическими процессами.

Сахарозависимые ответы растений принято подразделять на три типа: зависимые от гексокиназы, независимые от гексокиназы и зависимые от сахарозы (инвертазозависимые) [5; 14]. Чтобы лучше понять характер опосредованной сахарами регуляции активности ФлД, были протестированы и сопоставлены эффекты Глю, Сах и Ман на активность данного фермента в проростках овса. Все три исследованных сахара показали способность блокировать эффект затемнения на активность ФлД в ЗП и уменьшать активность ФлД в ЭП аналогично действию КС. Тот факт, что не только Глю, но и Ман была эффективна при модуляции активности ФлД, указывает на то, что действие сахаров в данном случае протекало по гексокиназозависимому пути [3; 4]. На основании того, что и Глю, и Сах модулировали активность ФлД овса, можно сделать вывод, что выявленные эффекты сахаров развиваются независимо от действия инвертазы [4].

Известно, что ключевую роль в передаче сигнала в клетке, опосредуемого гексокиназой, играют протеинкиназы [15]. Участие реакций фосфорилирования в сахарозависимом контроле активности ФлД подтверждается тем фактом, что ингибитор протеинкиназ Н7 обращал как эффект Глю на ФлД в ЭП, так и эффект затемнения на активность ФлД в ЗП.

Существует много доказательств, свидетельствующих о тесном взаимодействии между сахаро- и Рi-зависимыми реакциями [12; 13]. Можно предполагать, что обе эти системы участвуют и в контроле активности ФлД овса. Проведенные эксперименты показали, что экзогенный Рi нивелировал эффект затемнения на активность ФлД в ЗП и имитировал эффект КС на ЭП в темноте. Очевидно, что эффекты Рi были аналогичны эффектам растворимых сахаров. Сходные результаты были описаны для другого фермента катаболизма фосфолипидов липоксигеназы сои [13]. Следует отметить, что обработка растений овса отдельно Ман или Рi уменьшала активность ФлД в ЭП, тогда как их совместное действие имело противоположный эффект. Кроме того, Рi и Ман по отдельности не влияли на активность ФлД в ЗП на свету, но одновременная обработка ими ЗП увеличивала активность ФлД даже без действия темноты. Было также обнаружено, что одновременная обработка ЗП Ман и Рi на фоне затемнения не влияла на индуцируемое темнотой увеличение активности ФлД, тогда как обработка Глю и Рi блокировала эффект затемнения.

Высокая концентрация Рi должна способствовать снижению активности ФлД по принципу отрицательной обратной связи. Этим обстоятельством можно объяснить индуцированное экзогенным Рi ингибирование активности ФлД в ЭП овса. Кроме того, важное значение для модуляции активности ФлД может иметь содержание гексозофосфатов. Действительно, комбинированный эффект Ман и Рi может вызвать образование маннозо-6-фосфата, который не метаболизирует в растительной клетке и тем самым способствует уменьшению содержания Рi [5]. Сигнал, генерируемый при этом, должен поддерживаться в течение длительного времени и, следовательно, индуцировать наблюдаемое увеличение активности ФлД. Если вместе с Рi для обработки растений овса применяли Глю, то образующийся глюкозо-6-фосфат быстро использовался в различных метаболических реакциях, в результате чего интенсивность сахарозависимого сигнала уменьшалась, в то время как сигнал от маннозо-6-фосфата не менялся. Однако маннозо-6-фосфат должен образовываться и при применении одной экзогенной Ман. В этом случае можно предположить, что его количество недостаточно, чтобы вызвать модуляцию активности ФлД. Можно также предполагать, что соотношение гексозо-6-фосфата, Рi и гексозы, а не просто уровень содержания растворимых сахаров или Рi играет решающую роль в контроле активности ФлД овса.

Таким образом, полученные данные показывают, что активность ФлД овса зависит от световых условий выращивания растений и ее повышенный уровень наблюдается в условиях, неблагоприятных для процесса фотосинтеза и способствующих развитию сахарного голодания. Вышеописанные эффекты обнаруживаются после достаточно длительного периода действия, например, световые эффекты проявляются через 1 час после включения света. Такие длительные реакции могут сопровождаться изменениями в экспрессии гена *ФлД*. Следует отметить, что

до настоящего времени гены *ФлD* из овса не были клонированы и охарактеризованы. Анализ нуклеотидной последовательности, изолированной нами с помощью ген-специфических праймеров, сконструированных на основании известных последовательностей других злаковых, подтвердил, что ДНК-фрагмент, идентифицированный в овсе, проявляет высокую гомологию (81–87 %) с генами *ФлD* кукурузы, риса и плевела опьяняющего.

Оценка уровня экспрессии *ФлD* показала, что в основе модуляции активности фермента ФлD, вызванной изменениями световых условий роста, лежат изменения содержания транскриптов данного гена. Обнаружено, что экспрессия *ФлD* в ЗП заметно активировалась после переноса растений в темноту, особенно в базальной зоне листа проростка, являющейся зоной роста листьев однодольных. При этом для апикальной зоны тех же листьев не было обнаружено существенных различий транскрипции *ФлD* в ЭП и КС-облученных проростках овса. Эти результаты можно объяснить разным физиологическим состоянием различных частей развивающихся листьев. Видимо, молодые, растущие зоны ЭП обладают способностью модулировать экспрессию *ФлD* при световом облучении, тогда как стареющие ткани теряют эту способность. Аналогичные результаты были продемонстрированы для светочувствительности ферментативной активности ФлD, которая исчезала с увеличением возраста проростков [9]. Различия также наблюдались для модуляции экспрессии *ФлD* в апикальных и базальных зонах ЗП, перенесенных в темноту: а именно, наблюдался устойчивый рост экспрессии *ФлD* в базальной зоне листа, в то время как в апикальной области повышения уровня экспрессии *ФлD* не происходило. Хотя с учетом того, что в данной зоне листа ЗП, растущих на свету, наблюдалось постепенное снижение уровня экспрессии с увеличением возраста проростков, а при переносе в темноту оно не происходило, можно предполагать наличие активирующего влияния темноты и в данном случае.

Полученные данные свидетельствуют о том, что ферментативная активность ФлD овса и экспрессия ее гена проявляют чувствительность к изменениям световых условий роста растения, сопровождающимся блокированием процесса фотосинтеза и связанным с этим сахарным голоданием. Светозависимая модуляция ФлD была в большей степени выражена в молодых тканях проростков овса. Это можно объяснить потерей способности тканей старшего возраста к быстрым функциональным изменениям в изменяющихся условиях роста и развития. Полученные результаты косвенно указывают на принадлежность *ФлD* к группе индуцируемых темнотой *din*-генов.

Заключение. Таким образом, световая/темновая модуляция активности ФлD овса имитируется различными экзогенными моно-, дисахаридами, а также Pi. Это предполагает участие в контроле активности ФлD сахарозависимого сигнального пути, опосредованного гексокиназой. Влияние сахаров и Pi, вероятно, зависит от соотношения между уровнями содержания гексозы, Pi, гексозо-6-фосфата, что может быть сигналом для изменения активности ФлD при затемнении и сахарном голодании. Обнаружено также, что ген *ФлD* овса проявляет чувствительность к изменениям светового режима развития, увеличивая уровень своей экспрессии при затемнении, т. е. в условиях сахарного голодания. Полученные данные свидетельствуют о том, что модуляция ферментативной активности ФлD может иметь важное значение для адаптации организма растения к недостатку углеводов, выступающих в роли негативных регуляторов функционирования ФлD.

Для более четкого определения механизмов, контролирующих активность ФлD в описанных условиях, необходимы дальнейшие исследования, в частности, важно полностью прояснить роль активации ФлD при затемнении, чтобы понять, связано ли это с метаболическим голоданием или нет.

Список использованных источников

1. Möller, S. G. The cell biology of phytochrome signaling / S. G. Möller, P. J. Ingles, G. C. Whitelam // *New Phytol.* – 2002. – Vol. 154, N 3. – P. 553–590. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00419.x>
2. Chen, M. Phytochrome signaling mechanisms and the control of plant development / M. Chen, J. Chory // *Trends Cell Biol.* – 2011. – Vol. 21, N 11. – P. 664–671. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.07.002>
3. Ruan, Y. L. Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling / Y. L. Ruan // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2014. – Vol. 65, N 1. – P. 33–67. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040251>

4. Sheen, J. Master Regulators in Plant Glucose Signaling Networks / J. Sheen // *J. Plant Biol.* – 2014. – Vol. 57, N 2. – P. 67–79. <https://doi.org/10.1007/s12374-014-0902-7>
5. Dark-inducible genes from *Arabidopsis thaliana* are associated with leaf senescence and repressed by sugars / Y. Fujiki [et al.] // *Physiol. Plant.* – 2001. – Vol. 111, N 3. – P. 345–352. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1110312.x>
6. Activation of senescence-associated Dark-inducible (DIN) genes during infection contributes to enhanced susceptibility to plant viruses / L. Fernández-Calvino [et al.] // *Mol. Plant Pathol.* – 2015. – Vol. 17, N 1. – P. 3–15. <https://doi.org/10.1111/mpp.12257>
7. Sugar signals and molecular networks controlling plant growth / S. Smeeckens [et al.] // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2010. – Vol. 13, N 3. – P. 273–278. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.12.002>
8. Borek, S. Regulation by sucrose of storage compounds breakdown in germinating seeds of yellow lupine (*Lupinus luteus* L.), white lupine (*Lupinus albus* L.) and Andean lupine (*Lupinus mutabilis* Sweet). II. Mobilization of storage lipid / S. Borek, S. Pukacka, K. Michalski // *Acta Phys. Plant.* – 2012. – Vol. 34, N 3. – P. 1199–1206. <https://doi.org/10.1007/s11738-011-0916-4>
9. Zhao, J. Phospholipase D and phosphatidic acid in plant defence response: from protein-protein and lipid-protein interactions to hormone signaling / J. Zhao // *J. Exp. Bot.* – 2015. – Vol. 66, N 7. – P. 1721–1736. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru540>
10. Canonne, J. Phospholipases in action during plant defense signaling / J. Canonne, S. Froidure-Nicolas, S. Rivas // *Plant Signal. Behav.* – 2011. – Vol. 6, N 1. – P. 13–18. <https://doi.org/10.4161/psb.6.1.14037>
11. Red far-red light modulates phospholipase D activity in oat seedlings. Relation of enzyme photosensitivity to photosynthesis / A. M. Kabachevskaya [et al.] // *J. Plant Physiol.* – 2007. – Vol. 164, N 1. – P. 108–110. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.02.008>
12. Phosphate status affects the gene expression, protein content and enzymatic activity of UDP-glucose pyrophosphorylase in wild-type and pho mutants of *Arabidopsis* / I. Ciereszko [et al.] // *Planta.* – 2001. – Vol. 212, N 4. – P. 598–605. <https://doi.org/10.1007/s004250000424>
13. Genome-wide analysis of the *Arabidopsis* leaf transcriptome reveals interaction of phosphate and sugar metabolism / R. Müller [et al.] // *Plant Physiol.* – 2007. – Vol. 143, N 1. – P. 156–171. <https://doi.org/10.1104/pp.106.090167>
14. Rolland, F. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms / F. Rolland, E. Baena-Gonzales, J. Sheen // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2006. – Vol. 57, N 1. – P. 675–709. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105441>
15. The SnRK1A protein kinase plays a key role in sugar signaling during germination and seedling growth of rice / C. A. Lu [et al.] // *Plant Cell.* – 2007. – Vol. 19, N 8. – P. 2484–2499. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.037887>

References

1. Möller S. G., Ingles P. J., Whitelam G. C. The cell biology of phytochrome signaling. *New Phytologist*, 2002, vol. 154, no. 3, pp. 553–590. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00419.x>
2. Chen M., Chory J. Phytochrome signaling mechanisms and the control of plant development. *Trends in Cell Biology*, 2011, vol. 21, no. 11, pp. 664–671. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.07.002>
3. Ruan Y. L. Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 2014, vol. 65, no. 1, pp. 33–67. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040251>
4. Sheen J. Master Regulators in Plant Glucose Signaling Networks. *Journal of Plant Biology*, 2014, vol. 57, no. 2, pp. 67–79. <https://doi.org/10.1007/s12374-014-0902-7>
5. Fujiki Y., Yoshikawa Y., Sato T., Inada N., Ito M., Nishida I., Watanabe A. Dark-inducible genes from *Arabidopsis thaliana* are associated with leaf senescence and repressed by sugars. *Physiologia Plantarum*, 2001, vol. 111, no. 3, pp. 345–352. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1110312.x>
6. Fernández-Calvino L., Guzmán-Benito I., Del Toro F. J., Donaire L., Castro-Sanz A. B., Ruíz-Ferrer V., Llave C. Activation of senescence-associated Dark-inducible (DIN) genes during infection contributes to enhanced susceptibility to plant viruses. *Molecular Plant Pathology*, 2015, vol. 17, no. 1, pp. 3–15. <https://doi.org/10.1111/mpp.12257>
7. Smeeckens S., Ma J., Hanson J., Rolland F. Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Current Opinion in Plant Biology*, 2010, vol. 13, no. 3, pp. 273–278. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.12.002>
8. Borek S., Pukacka S., Michalski K. Regulation by sucrose of storage compounds breakdown in germinating seeds of yellow lupine (*Lupinus luteus* L.), white lupine (*Lupinus albus* L.) and Andean lupine (*Lupinus mutabilis* Sweet). II. Mobilization of storage lipid. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2012, vol. 34, no. 3, pp. 1199–1206. <https://doi.org/10.1007/s11738-011-0916-4>
9. Zhao J. Phospholipase D and phosphatidic acid in plant defence response: from protein-protein and lipid-protein interactions to hormone signaling. *Journal of Experimental Botany*, 2015, vol. 66, no. 7, pp. 1721–1736. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru540>
10. Canonne J., Froidure-Nicolas S., Rivas S. Phospholipases in action during plant defense signaling. *Plant Signaling & Behavior*, 2011, vol. 6, no. 1, pp. 13–18. <https://doi.org/10.4161/psb.6.1.14037>
11. Kabachevskaya A. M., Liakhnovich G. V., Kisel M. A., Volotovskii I. D. Red far-red light modulates phospholipase D activity in oat seedlings. Relation of enzyme photosensitivity to photosynthesis. *Journal of Plant Physiology*, 2007, vol. 164, no. 1, pp. 108–110. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.02.008>
12. Ciereszko I., Johansson H., Hurry V., Kleczkowski L. A. Phosphate status affects the gene expression, protein content and enzymatic activity of UDP-glucose pyrophosphorylase in wild-type and pho mutants of *Arabidopsis*. *Planta*, 2001, vol. 212, no. 4, pp. 598–605. <https://doi.org/10.1007/s004250000424>

13. Müller R., Morant M., Jarmer H., Nilsson L., Nielsen T. H. Genome-wide analysis of the Arabidopsis leaf transcriptome reveals interaction of phosphate and sugar metabolism. *Plant Physiology*, 2007, vol. 143, no. 1, pp. 156–171. <https://doi.org/10.1104/pp.106.090167>

14. Rolland F., Baena-Gonzales E., Sheen J. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 2006, vol. 57, no. 1, pp. 675–709. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105441>

15. Lu C. A., Lin C. C., Lee K. W., Chen J. L., Huang L. F., Ho S. L., Liu H. J., Hsing Y. I., Yu S. M. The SnRK1A protein kinase plays a key role in sugar signaling during germination and seedling growth of rice. *Plant Cell online*, 2007, vol. 19, no. 8, pp. 2484–2499. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.037887>

Информация об авторах

Кабачевская Елена Михайловна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: lmbc@ibp.org.by.

Суховеева Светлана Владимировна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: suhoveevalmbc@mail.ru.

Волотовский Игорь Дмитриевич – академик, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: volot@biobel.bas-net.by.

Information about the authors

Kabachevskaya Alena Mikhaylovna – Ph. D. (Biology), Senior researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Academicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lmbc@ibp.org.by.

Sukhaveyeva Sviatlana Vladimirovna – Junior researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Academicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: suhoveevalmbc@mail.ru.

Volotovskii Igor Dmitrievich – Academician, D. Sc. (Biology), Professor, Head of the Laboratory. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Academicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: volot@biobel.bas-net.by.