

ЭКСПРЕССИОННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ГЕНОВ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В АМАРАНТЕ СОРТА «ХАРЬКОВСКИЙ» ПРИ ЗАСОЛЕНИИ

А. М. Хаба, О. С. Федорина, А. В. Сальников, М. В. Зайчикова, А. Т. Епринцев

Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 08.02.2013 г.

Аннотация. При действии засоления в мезофилле листьев амаранта увеличивается активность НАД⁺-МДГ путем индукции дополнительной изоформы. В обкладке интенсифицируется функционирование имеющихся форм НАД⁺-МДГ. Активность НАД⁺-МДГ в мезофильной ткани более вариабельна в стрессовых условиях по сравнению с обкладкой. По-видимому, основное давление стрессора принимают на себя клетки мезофилла. Выявлена взаимосвязь экспрессии митохондриального и цитоплазматического генов МДГ и ферментативной активности.

Ключевые слова: малатдегидрогеназа, изоформы, субклеточная локализация, солевой стресс, экспрессия генов.

Abstract. Under the action of salinity in the mesophyll of leaves of amaranth increases the activity of NAD⁺-MDH by induction of additional isoform. In bundle sheath cell is enhanced functioning of the available forms of NAD⁺-MDH. The activity of NAD⁺-MDH in mesophilic tissue are more variable in stressful conditions compared to bundle sheath tissue. Apparently, the main pressure stressor assume mesophyll cells. The correlation between the genes expression of mitochondrial and cytoplasmic MDH and enzyme activity.

Keywords: malate dehydrogenase, isoforms, subcellular localization, salt stress, genes expression.

ВВЕДЕНИЕ

Действие стрессора в растительном организме вызывает значительные изменения, направленные на нейтрализацию осмотических и токсических эффектов [1, 2]. В такой ситуации наибольший адаптационный потенциал имеют растения, относящиеся к C₄-типу (кукуруза, сорго, амарант и др.) [3].

Важнейшим ферментом растительного метаболизма является малатдегидрогеназа (МДГ, КФ 1.1.1.37) [4]. МДГ представлена четырьмя дегидрогеназами, две из которых обладают оксидоредуктазной активностью, а две другие – декарбоксиллирующей [5]. Целью нашей работы являлось исследование экспрессионной регуляции МДГ в амаранте при засолении.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили 14-дневные проростки амаранта (*Amaranthus L.*) сорта «Харьковский». Растения были выращены гидропонно

по стандартной методике при 16 часовом световом дне с интенсивностью света 25 Вт/м². Солевой стресс моделировали инкубацией проростков в растворе 150 мМ NaCl. Контролем служили образцы, экспонированные в воде. Разделение мезофилла и обкладки исследуемых растений проводили по методу Клечковского. Активность фермента регистрировали спектрофотометрически на СФ-2000, при длине волны 340 нм. Нативный диск-электрофорез в полиакриламидном геле проводили по Девису. Специфическое проявление гелей осуществляли тетразолиевым методом. Для выделения суммарной клеточной РНК использовался метод гуанидинтиоционат-фенол-хлороформной экстракции с использованием в качестве осадителя LiCl.

ПЦР в реальном времени на приборе Bio-Rad DNA Engine Thermal Cycler Chromo 4 (Bio-Rad, США), используя в качестве красителя SYBR Green I. Праймеры к гену *mdh-mtx*: прямой – 5'-gggatgaccgwgayggatctc -3'; обратный – 5'-traanauctcwgcgwcaaty -3'. Праймеры к гену *mtx_cyt*: прямой – 5'-TTATGCTTGGTGCAGACCAG-3'; обратный – 5'-GTGCAATTATAATATGGGTGG-3'. Параметры амплификации: предварительная де-

натурация 95 °С - 5 мин., затем цикл: 95 °С – 30 сек., 57°С – 40 сек., 72 °С – 30 сек. (детекция), финальная элонгация - 72 °С – 10 мин. Опыты проводили в 3 кратной биологической повторности, аналитическое определение для каждой пробы – в трех повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Действие солевого стресса активизирует НАД⁺-зависимую МДГ в мезофильных тканях амаранта в течение всей экспозиции (рис.1). При этом активность увеличилась в 3-3,5 раза по сравнению с контрольными образцами уже через 1 час воздействия соли.

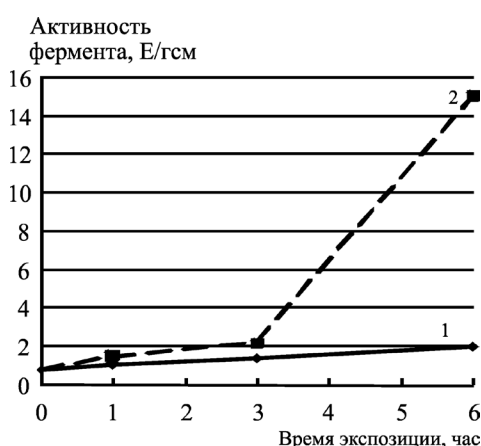


Рис.1. Динамика активности НАД-МДГ в листьях амаранта в условиях солевого стресса (мезофилл). Обозначения: 1 – контроль, 2 – 150 мМ NaCl.

После шестичасового воздействия хлорида натрия индуцировалось увеличение активности НАД⁺-зависимой МДГ почти в 16 раз. Характер изменения ферментативной активности НАД⁺-зависимой МДГ в обкладке мало менялся в течение первых трех часов выдерживания объекта в условиях солевого стресса. Максимальное возрастание активности приходилось на более позднее время (рис.2).

Результаты исследования изоферментного спектра зеленых листьев НАД-МДГ у амаранта, являющегося С₄-типом растений, показали присутствие трех изоформ этого фермента. Интересно отметить, что в контрольных образцах было обнаружено 2 изоформы МДГ, причем одна из них с R_f = 0,6 была локализована как в мезофилле, так и в обкладке. Для мезофильных тканей выявлена специфичная изоформа с R_f = 0,55. В результате действия соли в тканях исследуемого растения происходила лишь незначительная пере-

стройка спектра изоформ данного фермента. Солевой стресс индуцировал появление ещё одной дополнительной молекулярной формы фермента с R_f=0,66 в клетках мезофилла НАД-МДГ. В обкладке стресс-индуцированных изменений изоферментного спектра у амаранта не обнаружено.

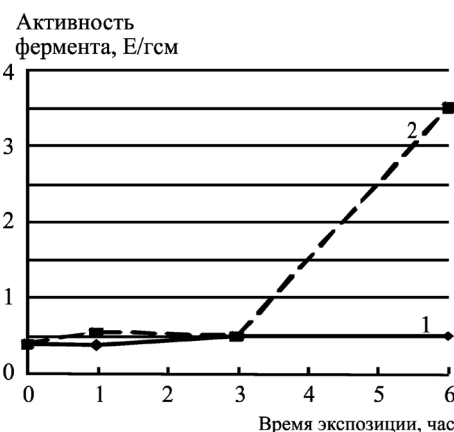


Рис. 2. Динамика активности НАД-МДГ в листьях амаранта в условиях солевого стресса (обкладка). Обозначения: 1 – контроль, 2 – 150 мМ NaCl.

В экспериментах по действию солевого стресса на уровень экспрессии гена митохондриальной *mdh* было установлено, что индуцируется изменение в функционировании генетического аппарата растительной клетки, обеспечивающее увеличение содержания мРНК митохондриальной МДГ в клетках (рис.3).



Рис. 3. Концентрация продуктов амплификации кДНК с праймерами для гена *mdh_mtx* после 40 циклов в листьях амаранта в норме и при солевом стрессе.

Было установлено наличие корреляции экспрессии цитоплазматического гена малатдегидрогеназы с ферментативной активностью при действии солевого фактора. Максимальный уро-

вень экспрессии гена *mdh_cyt* был обнаружен после 6-ти часового воздействия гидрохлорида натрия. При этом наблюдалось его совпадение с максимальным пиком активности НАД-МДГ (рис.4).



Рис. 4. Концентрация продуктов амплификации кДНК с праймерами для гена после 40 циклов в листьях амаранта в норме и при солевом стрессе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об изменении экспрессии генома клетки под действием солевого стресса. Экспрессия митохондриального и цитоплазматического

генов малатдегидрогеназы коррелирует с увеличением ферментативной активности данного фермента в дифференцированных тканях амаранта в условиях солевого стресса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кафи М. Содержание углеводов и пролина в листьях, корнях и апексах сортов пшеницы, устойчивых и чувствительных к засолению / М. Кафи, В. С. Стюарт, Л. М. Борланд // Физиология растений. — 2003. — Т.50. — №.2. — С. 174-182.
2. Иванищев В.В. Ферменты метаболизма малата: характеристика, регуляция активности и биологическая роль / В.В.Иванищев, Б.И. Курганов // Биохимия. 1992. — Т.57, вып.5. — С. 653-661.
3. Епринцев А.Т. Реакция малатдегидрогеназной системы мезофилла и обкладки кукурузы на солевой стресс / А.Т. Епринцев, О.С. Федорина, Ю.С. Бессмельцева // Физиология растений. — 2011. — Т.58, №.3. — С. 384-390.
4. Delauney A.J. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. / A.J. Delauney, D.S. Verma // Plant J. — 1993, № 4. — P. 215-223.
5. Faleiro A.C. Malate dehydrogenase isozyme patterns in cladophylls of a *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae) clonal population / A. C. Faleiro [et al.] // Acta sci. Biol. Sci. — 2003. — V.25, №1. — P.207-211.

Ассиль Мундер Хаба — аспирант, Воронежский государственный университет; e-mail: bc366@bio.vsu.ru

Федорина Ольга Сергеевна — к.б.н., преподаватель, Воронежский государственный университет; e-mail: bc366@bio.vsu.ru

Сальников Алексей Владимирович — Воронежский государственный университет, аспирант; e-mail: bc366@bio.vsu.ru

Зайчикова Марина Викторовна — аспирант, Воронежский государственный университет; e-mail: bc366@bio.vsu.ru

Епринцев Александр Трофимович — д.б.н., профессор, заведующий кафедрой биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет; e-mail: bc366@bio.vsu.ru

Assil Munder Haba — postgraduate student, Voronezh State University; e-mail: bc366@bio.vsu.ru

Fedorina Olga S. — Voronezh State University, Lecturer, PhD, Tel.: (473)220-88-77; e-mail: bc366@bio.vsu.ru

Salnikov Alexey V. — postgraduate student, Voronezh State University; e-mail: bc366@bio.vsu.ru

Zaichikova Marina V. — postgraduate student, Voronezh State University; e-mail: bc366@bio.vsu.ru

Eprintsev Alexander T. — PhD, Full Professor, Head of the Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University; e-mail: bc366@bio.vsu.ru