

УЧАСТИЕ ОКСИДОРЕДУКТАЗНЫХ И ДЕКАРБОКСИЛИРУЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗНОЙ СИСТЕМЫ В ПОДДЕРЖАНИИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ГОМЕОСТАЗА В ЛИСТЯХ КУКУРУЗЫ ПРИ ЗАСОЛЕНИИ

О. С. Федорина, Д. Н. Федорин, А. Т. Епринцев

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»
Поступила в редакцию 17.05.2021 г.

Аннотация. Биохимические механизмы солеустойчивости растений, определяют качественное и количественное своеобразие метаболических функций, ход процессов газообмена и клеточный гомеостаз в стрессовых условиях. Но, прежде чем приступить к изучению индуцированных стрессом изменений в метаболизме, необходимо идентифицировать его присутствие в клетках изучаемых растений. Установлено, что при кратковременном воздействии 150 мМ хлорида натрия проростки кукурузы действительно испытывают солевой стресс, о чем свидетельствует увеличение экспрессии гена *ZmCOI6.1*, который можно считать маркером общей стрессовой реакции. Стресс-индуцированные изменения в функционировании ферментов малатдегидрогеназной системы играют значительную роль в формировании адаптивных реакций клетки к действию стрессора. Особенный интерес здесь представляют ферменты C_4 -растений, т.к. именно эта группа растений обладает большим адаптивным потенциалом. Изучено влияние трёхчасового засоления на дифференцированные ткани проростков кукурузы (*Zea mays* L.). Показаны изменения в функционировании НАД- и НАДФ-зависимых ферментов МДГ-системы, индуцированные солью. Выявлено, что хлорид натрия в мезофилле кукурузы вызывает активацию НАД⁺-зависимой МДГ, НАД- и НАДФ⁺-малик-энзимов, а также приводит к ингибированию НАДФ⁺-зависимой МДГ. В тоже время в клетках обкладочной ткани под действием хлоридного засоления происходит интенсификация НАД-малик-энзима и НАДФ⁺-зависимой МДГ. Что касается обкладочных форм НАД⁺-зависимой МДГ, НАДФ⁺-малик-энзима, показатели их активности были в контрольных и опытных образцах были не значительны. Делается вывод о том, что работа ферментов МДГ-системы мезофилла направлена на компенсации стрессового воздействия, а клеток обкладки – на работу в как можно более автономном режиме. Создана гипотетическая схема перестройки метаболизма тканей при засолении, предполагающая торможение мезофильной ветви цикла Хетча-Слейка и поставки малата клетками мезофилла в клетки обкладки. Предложены возможные пути компенсации недостатка эндогенного углекислого газа и НАДФН за счёт анаплеротических реакций для обеспечения бесперебойной работы цикла Кальвина.

Ключевые слова: солевой стресс, маркерный белок, адаптация, малатдегидрогеназа, малик-энзим, мезофилл, обкладка.

При изучении механизмов адаптивных реакций, первостепенной задачей исследователя является выяснение вопроса: привело ли изменение того или иного фактора среды, в которой находится объект, к развитию в его организме неспецифического и специфического адаптационного синдрома? Иными словами, прежде чем приступить к изучению стресс-индуцированных изменений в функционировании интересующей нас ферментной системы, необходимо идентифицировать при-

сутствие стресса в клетках изучаемых растений как такового.

В геноме кукурузы найден ген *ZmCOI6.1*, транскрипты которого практически не обнаруживаются в нормальных условиях или их уровень очень низок. Холод, засуха и солевой стресс индуцируют значительное увеличение экспрессии данного гена. Это позволяет считать ген *ZmCOI6.1* маркерным геном общей стрессовой реакции [1].

В предыдущих исследованиях [2], показано, что интенсификация активности пероксидазы, накопление лактата (признаки неспецифического

адаптивного ответа), накопление пролина (маркер осмотического стресса) при засолении происходили только в мезофилле, по крайней мере в первые часы действия стрессора, т.е. клетки мезофильной ткани в значительно большей степени испытывают солевой стресс по сравнению с обкладочными клетками при кратковременном засолении. Известно, что для поддержания водного баланса на уровне, необходимом для жизнедеятельности, растению необходимо сохранять постоянную разницу водных потенциалов в системе «почва – корень – лист» [3]. Для этого некоторые растения способны закачивать ионы соли в периферические ткани побега. Такой механизм показан, по крайней мере, для галофитов [3]. Учитывая, что C_4 -растения обладают определенными признаками солеустойчивости [4], можно предположить, у них соль также транспортируется в наиболее удаленную от проводящей системы ткань – в мезофилл. В свете этих представлений возникает гипотеза, что данная ткань испытывает более мощное стрессовое воздействие при засолении.

МДГ-система по ряду причин способна играть важную роль в компенсации влияния разного рода стрессов на клеточный метаболизм эукариотов [5]. Ферменты, участвующие в утилизации мала-та, входят в состав центральных метаболических путей клетки, следовательно, функциональное состояние МДГ-системы имеет важное значение для их сопряжения [5]. Кроме того, малатдегидрогеназы (НАД-МДГ, КФ 1.1.1.37 и НАДФ-МДГ, КФ 1.1.1.82) и малик энзимы (НАД-МЭ, КФ 1.1.1.39 и НАДФ-МЭ, КФ 1.1.1.40) способны выполнять ряд анаплеротических функций, в том числе связанных с синтезом некоторых интермедиатов [6]. При возникновении стрессовых ситуаций они поставляют клетке метаболиты, необходимые для компенсации негативного воздействия, а также участвуют в мобилизации накопленных в экстремальных условиях вторичных продуктов [7]. Важно понять какую роль малатдегидрогеназы и малик-энзимы играют в адаптивных перестройках метаболических путей дифференцированных тканей C_4 -растений при засолении.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследования служили 14-дневные проростки кукурузы (*Zea mays* L.) сорта Воронежская-76, выращенные 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. Первую пробу снимали до начала инкубации, а затем – через час и три часа экспозиции. Для анализа содержания NaCl - индуцибельного белка экспозиция в соли составляла 18 часов засоления.

Суммарную клеточную РНК из листьев исследуемых растений выделяли использовался методом фенол-хлороформной экстракции с использованием в качестве осадителя LiCl [8] Нуклеиновые кислоты разделяли в 1%-ном геле агарозы (Helicon, Россия). Обратную транскрипцию РНК осуществляли с использованием обратной транскриптазы M-MuLV RT (Fermentas, Литва) для синтеза первой цепи кДНК согласно рекомендациям производителя. Праймеры подбирали осуществляли на основе нуклеотидной последовательности гена NaCl-индуцируемого белка кукурузы с помощью программы Primer3: прямой – 5'- GGGTGTTCCTCAAGTACGGG -3'; обратный – 5'- GGGTGGGTACGGTAGCAAAA -3'. Для выяснения изменения уровня экспрессии генов проводили ПЦР в реальном времени на приборе LightCycler96 (“Roche”, Швеция), используя в качестве красителя SYBR Green I. Количество матрицы контролировали с помощью параллельной амплификации фактора элонгации ef-1 α с генспецифичными праймерами [9] Определение относительного уровня экспрессии исследуемых генов проводили с применением 2^{- $\Delta\Delta C_t$} -метода [10]

Разделение мезофилла и обкладки исследуемых растений проводили на холоду, механически, по методу Клечковского, используя индивидуальные для каждого изучаемого фермента среды выделения [11]. Чистоту разделенных тканей определяли по активности маркерных ферментов – ФЕП-карбоксилазы и НАДФ-зависимой глицеральдегидфосфат дегидрогеназы [11]. Активность всех ферментов регистрировали спектрофотометрически на СФ-46, при разных длинах волн с использованием специфических для каждого фермента сред колориметрирования [12]. Активность выражали в Е/гсм, где Е – ферментативная активность, а гсм – грамм сырой массы.

Опыты проводили в 3-х кратной биологической повторности, аналитическое определение для каждой пробы – в трех повторностях. В таблицах и на рисунках приведены данные типичных опытов, где каждое значение есть среднее арифметическое. При математической обработке использовали статистический критерий Стьюдента [13].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Была проанализирована экспрессия маркерного гена *ZmCOI6.1* в листьях проростков кукурузы (*Zea mays* L.), подвергнутых 18- часовому засолению 150мМ хлоридом натрия. Данные динамики относительного уровня транскриптов гена NaCl - индуцибельного белка представлены на рисунке 1. Показано, что экспрессия данного белка в листьях кукурузы в условиях солевого стресса была максимальной в период 3-6 часов экспозиции. Опираясь на более ранние исследования [2], мы предполагаем, что в первые 3 часа действия хлорида натрия, ионы соли не оказывают негативного влияния на клетки обкладки, а более длительная экспозиция приводит к развитию солевого стресса в обеих тканях. Поэтому исследование функционирования малатдегидрогеназ и маликэнзимов проводилось в условиях трёхчасового засоления. Было изучено влияние хлорида натрия на функционирование четырёх основных ферментов МДГ - системы в клетках мезофилла и обкладки кукурузы – НАД⁺- и НАДФ⁺-зависимых МДГ и малик-энзимов. Данные о динамике их активности представлены в таблице 1. Показано, что под действием хлорида натрия в мезофилле кукурузы происходила активация НАД⁺-зависимой МДГ (в 1.83 раза выше контрольных значений) В обкладке показатели активности данной МДГ были сходны в контрольных и опытных образцах. В листьях кукурузы засоление интенсифицировало работу НАД-МЭ мезофилла на протяжении всего времени экспозиции. Наибольшая разница между опытными и контрольными значениями была зафиксирована в мезофилле и составляла 98.8%. В

обкладке активность данного фермента в была на 87.7% выше в условиях опыта, по сравнению с образцами, экспонированными в воде. Активность НАДФ⁺-МЭ под действием хлорида натрия в мезофилле значительно увеличивалась, достигая максимума в 5.6 раз выше, чем в контроле. Различия контрольных и опытных показателей в обкладке для данного фермента были не значительны. Показано ингибирование мезофильной формы НАДФ⁺-зависимой МДГ кукурузы при засолении. Её активность падала в мезофилле в 1.18 раз. В обкладке кукурузы было показано увеличение активности данной формы МДГ по сравнению с контролем в 1.7 раз.

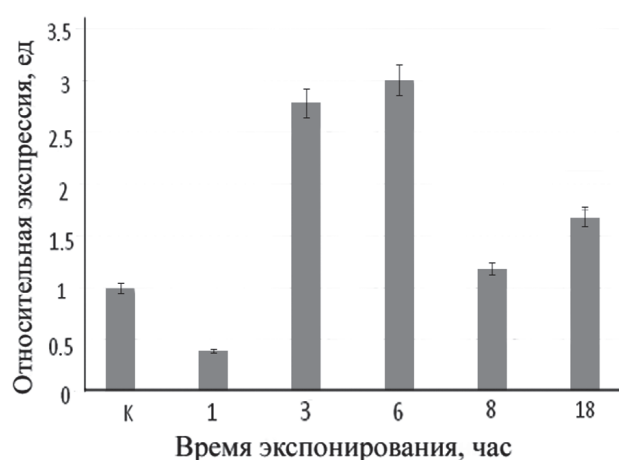


Рис. 1. Относительный уровень транскриптов гена NaCl - индуцибельного белка в листьях кукурузы в условиях солевого стресса

Известно, что НАД-МДГ катализирует взаимопревращение малата в ОАА, причём реакция легко обратима и равновесие сдвинуто в сторону образо-

Таблица 1.

Изменение активности основных ферментов МДГ-системы в листьях кукурузы под действием солевого стресса, Е/гсм (n=3, P ≤ 0.05)

Фермент	Тип ткани	Вариант опыта	Время экспозиции, час		
			0	1	3
НАД-МДГ	Мезофилл	контроль	22.15 ± 0.65	21.75 ± 0.65	18.98 ± 0.57
		150 мМ NaCl	22.15 ± 0.65	35.52 ± 1.07	34.75 ± 0.72
	Обкладка	контроль	4.75 ± 0.14	4.75 ± 0.14	6.34 ± 0.22
		150 мМ NaCl	4.75 ± 0.14	4.75 ± 0.14	6.55 ± 0.58
НАД-М.Э.	Мезофилл	контроль	4.06 ± 0.12	3.57 ± 0.11	4.18 ± 0.13
		150 мМ NaCl	4.06 ± 0.12	7.10 ± 0.21	6.83 ± 0.14
	Обкладка	контроль	1.15 ± 0.04	1.00 ± 0.03	0.85 ± 0.03
		150 мМ NaCl	1.15 ± 0.04	1.87 ± 0.06	1.75 ± 0.03
НАДФ-М.Э.	Мезофилл	контроль	1.93 ± 0.06	1.71 ± 0.05	1.96 ± 0.06
		150 мМ NaCl	1.93 ± 0.06	4.71 ± 0.14	11.27 ± 0.34
	Обкладка	контроль	0.86 ± 0.03	0.80 ± 0.02	0.89 ± 0.03
		150 мМ NaCl	0.86 ± 0.03	0.85 ± 0.03	0.89 ± 0.03
НАДФ-МДГ	Мезофилл	контроль	2.83 ± 0.08	2.83 ± 0.08	3.44 ± 0.10
		150 мМ NaCl	2.83 ± 0.08	1.75 ± 0.05	2.90 ± 0.15
	Обкладка	контроль	0.67 ± 0.02	0.55 ± 0.02	0.60 ± 0.02
		150 мМ NaCl	0.67 ± 0.02	0.93 ± 0.03	1.02 ± 0.02

вания малата [6]. Фермент выполняет разнообразные биологические функции, среди которых стоит отметить участие НАД-МДГ в цикле Кребса, обеспечение функционирования малат-аспартатного челнока в митохондриальной мембране, синтез малата и ОАА [5]. Активацию данного фермента в мезофилле изучаемых растений в условиях солевого стресса можно связать с двумя аспектами адаптивного ответа клеток на засоление. Во-первых, с необходимостью дополнительного притока энергии для компенсации негативного влияния соли [14], а во-вторых, с интенсивным синтезом осмолитов, имеющим место при засолении [15]. Предполагается, таким образом, что хлорид натрия индуцирует работу МДГ в цикле Кребса и мобилизует синтетическую способность данного фермента. Скорее всего, резкое увеличение активности обсуждаемого фермента на первых этапах действия стрессора в тканях изучаемых растений связано с явлением “солевого дыхания”. Кроме того, поддержание активности фермента в модифицированных условиях на высоком уровне, по нашему мнению, обусловлено необходимостью синтеза малата для конструктивного метаболизма и для поддержания осмотического баланса клетки. НАД-зависимый малик-энзим локализован в митохондриях и выполняет анаплеротическую функцию, что особенно важно в тех случаях, когда гликолиз не обеспечивает полностью потребности клетки в энергии и углеродных скелетах для биосинтеза аминокислот [6]. Вследствие этого, его активность особенно высока в тканях, где протекают интенсивные биосинтетические и энергетические процессы [76]. НАД-МЭ способен утилизировать запасной фонд органических кислот, главным образом малата [6]. Кроме того, фермент может и пополнять клеточный пул малата, когда концентрация субстратов ЦТК становится недостаточной для его поддержания. В случае ингибирования цикла из-за блокирования в силу каких-либо причин (низкий рН, высокий уровень ОАА и др.) НАД-МДГ, НАД-МЭ посредством синтеза пирувата обеспечивает высокий уровень ацетил Ко-А и восстанавливает работу ЦТК.

НАДФ-зависимый малик-энзим в листьях C_4 -растений малатного типа принимает участие в цикле Хетча-Слейка, где осуществляет декарбоксилирование малата с образованием CO_2 , который направляется в цикл Кальвина. Этот процесс локализован в клетках обкладки сосудистых пучков [16]. Однако под влиянием NaCl происходит существенное изменение в работе НАДФ-МЭ. Значительная доля индуцированной солью актив-

ности фермента приходится на клетки мезофилла, тогда как в обкладке его активность подавлена. Такое перераспределение, вероятно, открывает дополнительные возможности реализации адаптивного ответа мезофилла. Нельзя забывать, что помимо своей основной функции – декарбоксилирование малата – НАДФ-МЭ играет важную роль в регенерации НАДФН для биосинтетических процессов. Возможно, увеличение скорости его работы следует связывать именно с интенсификацией синтеза стрессовых белков, аминокислот и других биологических молекул, выполняющих протекторные функции при стрессе. Кроме того, считается, что данный фермент способен к декарбоксилированию ОАА [6]. Может быть, часть его активности, индуцированной в стрессовых условиях, связана именно с синтезом пирувата. Активация НАДФ-МДГ в Kranz-клетках не связана с процессом фиксации углерода и, по-видимому, имеет значение для реализации других функций данного фермента. Так, например, считается, что НАДФ-МДГ участвует в функционировании малатного клапана через оболочку хлоропласта, который является одним из важных механизмов, помогающих создавать требуемую гибкость метаболизма [17]. Благодаря увеличению активности данного фермента, большая часть электронов, генерированных при свете, используется для формирования малата, хотя и создаётся высокая разница рН, которая вызывает обратное давление на электронный поток. Малатный клапан, посредством повышения активности НАДФ-МДГ способен предотвращать ограничения в работе ФС I, связанные с лимитированием со стороны акцептора [17]. Кроме того, образуемый с её помощью НАДФ(Н) активно используется только в фотосинтетических процессах, поэтому активность данной МДГ может сказываться на работе главного пути образования органического вещества в растениях [18].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализируя вышеизложенные аспекты, можно с большой вероятностью предполагать следующий механизм действия соли на НАД- и НАДФ-зависимые ферменты МДГ системы (рис 2). Хлорид натрия вызывает торможение мезофильной ветви цикла Хетча-Слейка, по крайней мере, на стадии образования малата. Процесс декарбоксилирования яблочной кислоты в клетках обкладки с помощью НАДФ-МЭ при кратковременном засолении остается на контрольном уровне, очевидно за

счет фонда запасного малата. Таким образом, процесс захвата атмосферного CO_2 , по-видимому, весьма чувствителен к соли, тогда как поставка углекислоты в цикл Кальвина за счет декарбоксилирования обладает определенным запасом прочности. Это и понятно, ведь бесперебойная работа этого цикла необходима для нормального роста растений [20]. Дополнительным источником CO_2 может служить процесс дыхания, который интенсифицируется в стрессовых условиях [21], и в котором участвует НАД-МДГ. Пул углекислого газа может пополняться также за счет декарбоксилирования малата НАД-зависимым МЭ, этот процесс, вероятно, имеет место в обкладке кукурузы (рис.2).

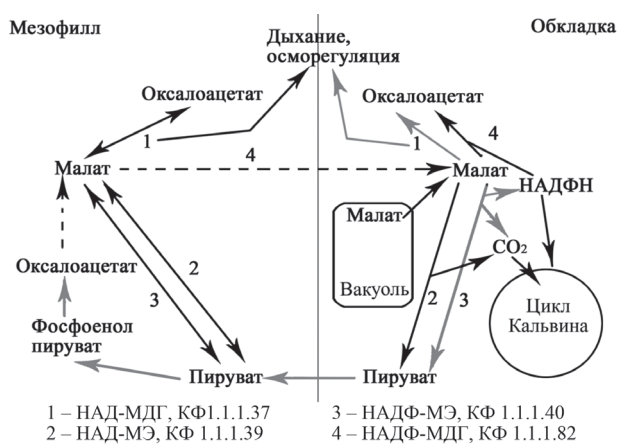


Рис. 2. Гипотетическая схема быстрой перестройки метаболизма за счет работы малатдегидрогеназ и малик-энзимов в клетках дифференцированных тканей кукурузы при засолении.

Вторая составляющая компенсаторных механизмов в тканях C_4 растений, затрагивающих МДГ-систему, связана с особенностями их фотосинтетического аппарата. У C_4 -растений малатного типа в клетках мезофилла функционируют обе фотосистемы, и имеет место как циклическое, так и нециклическое фотофосфорилирование [16]. В обкладке присутствует только ФС I, ФС II практически нет. Хлоропласты клеток обкладки проявляют только реакцию циклического фотофосфорилирования, поэтому они не способны к фотовосстановлению НАДФ [16]. В силу этого, у растений данного типа ФГК транспортируется в мезофилл, и восстановительные реакции ВПФП протекают именно там. Если допустить, что на первых этапах солевого стресса крапц-клетки не испытывают непосредственного воздействия стрессора, то скорее всего адаптационно выгодным путем является перестройка их метаболизма на работу в как можно более автономном режиме. В такой ситуации для нормального протекания цикла Кальвина, помимо источника углерода,

требуется дополнительный приток НАДФН. Вероятно, стресс-индуцированная интенсификация обкладочной формы НАДФ-МДГ, которая наблюдалась в обоих исследованных растениях связана именно с поставкой НАДФ для фотосинтеза. Кроме того, высокий уровень активности этого фермента в обкладке изученных растений компенсирует негативное влияние соли на ФС I данной ткани. С той же функцией НАДФ-МДГ можно связать всплеск её активности в мезофилле кукурузы.

Таким образом, показано, что при кратковременном засолении проростки кукурузы действительно испытывают солевой стресс, но в наибольшей степени стрессу подвержены клетки мезофилла. Здесь 150 мМ хлорид натрия вызывает быструю перестройку метаболизма в сторону компенсации стрессового воздействия, что показано на уровне ферментов МДГ-системы. Клетки обкладки, которые менее подвержены негативному влиянию соли, в первые часы действия стрессора стремятся к перестройке метаболизма на работу в как можно более автономном режиме, находя обходные пути синтеза эндогенного CO_2 и НАДФН, в том числе и за счет работы малатдегидрогеназ и малик-энзимов.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2020-2022 годы, проект № FZGU-2020-0044.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nguyen T., Leipner J., Stamp P., Guerra-Peraza O. // Plant Physiology and Biochemistry. 2009. V. 47 (2). P. 116-122.
2. Епринцев А.Т., Федорина О.С., Бессмельцева Ю.С. // Физиология растений. 2011. Т. 58. № 3. С. 384-390.
3. Балнокин Ю.В., Котов А.А., Мясодев Н.А., Хайлова Г.Ф., Куркова Е. Б., Луньков Р. В., Котова Л. М. // Физиология растений. - 2005. -Т52, №4. - С.549-557.
4. Васекина А.В., Ершов П.В., Решетова О.С., Тихонова Т.В., Лунин В.Г., Трофимова М.С., Бабков А.В. // Биохимия. - 2005. - том 70-вып 1- с 123-132.
5. Епринцев А.Т., Федорина О.С. // Физиология растений - 2007. - № 6. - С.820-827
6. Иванищев В.В., Курганов Б.И. // Биохимия. - 1992. - Т.57, вып.5. - С. 653-661.
7. Gulzar S., Khan M.A., Ungar I.A. // Seed Sci. and Technol. - 2001. - V.29, №.1. - P.21-29.
8. Chomczynski P., Sacchi N. // Anal. Biochem. 1987. V. 162. P. 156-159.

9. Nicot N., Hausman J.F., Hoffmann L., Evers D. // *J. of Exp. Bot.* 2005. V. 56. P. 2907–2914.
10. Livak K.J., Schmittgen T.D. // *Methods.* 2001. V. 25. - P. 402-408.
11. Епринцев А.Т., Ивентьев А.Н., Попов В.Н.// *Физиология растений.* - 2005. - Т.52, №4. - С.622-627.
12. Селиванова Н.В., Федорин Д.Н., Епринцев А.Т. Биохимические методы исследования ферментов глиоксилатного цикла и ЦТК: учебно-методическое пособие для вузов (практикум). Воронеж. гос. ун-т. — Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2014. — 39 с.
13. Лакин Г.Ф. Биометрия. Москва: Высш. шк., 1990. — 351с.
14. Мутлу Ф., Бозкук С.// *Физиология растений.*-2005.-Т.52.-№1.-С.36-42
15. Hare P.D., Cress W.A., Van Staden J. // *Plant Cell and Environment.* - 1998. - V.21.- P.535–553.
16. Епринцев А.Т., Федорин Д.Н. Фотосинтез в схемах : учебное пособие для студ. Вузов. Воронеж. гос. ун-т. — Воронеж : ИПЦ ВГУ, 2009. — 121 с.
17. Backhausen J.E., Emmerlich G., Holtgreffe S., Horton G., Pjpt, Rogers J.M., Mueller-Roeber B., Scheibe R.// *Planta.* - 1998. - V.207. - P.105-114.
18. Pierre J.-N., Prieto J.-L., Gadal P., Vidal J.// *Photosynth. Res.* №3. - 2004. -V.79. - P.349-355
19. Khan M.Ajmal, Gul Bilquees, Weber Darrell J. // *Commun. Soil Sci. and Plant Anal.* - 2001. - №.17-18. - V.32. - P.2965-2977.
20. Delauney A.J., Verma D.S. // *Plant J.* - 1993. - № 4. - P.215-223.
21. Семихатова О.А., Иванова Т.И., Юдина О.С. // *Физиология растений.* - 1993. - Т.40, №4. - С.558-567.

*Воронежский государственный университет
Федорина О. С., ассистент кафедры биохимии и физиологии клетки
E-mail: solka_81@mail.ru*

*Федорин Д. Н., доцент кафедры биохимии и физиологии клетки
E-mail: rybolov@mail.ru*

*Епринцев А. Т., заведующий кафедрой биохимии и физиологии клетки
E-mail: bc366@bio.vsu.ru*

*Voronezh State University
Fedorina O. S., Assistant Professor, department of biochemistry and cell physiology
E-mail: solka_81@mail.ru*

*Fedorin D. N., Assistant Professor, biochemistry and cell physiology
E-mail: rybolov@mail.ru*

*Eprintsev A. T., head of the department of biochemistry and cell physiology
E-mail: bc366@bio.vsu.ru*

PARTICIPATION OF OXIDO-REDUCTASE AND DECARBOXYLATING ENZYMES OF THE MALATE DEHYDROGENASE SYSTEM IN THE MAINTENANCE OF METABOLIC HOMEOSTASIS IN MAIZE LEAVES UNDER SALINITY

A. T. Eprintsev, O. S. Fedorina, D. N. Fedorin

Voronezh State University

Abstract. The biochemical mechanisms of plant salt tolerance determine the qualitative and quantitative uniqueness of metabolic functions, the course of gas exchange processes and cellular homeostasis under stressful conditions. But, before embarking on the study of stress-induced changes in metabolism, it is necessary to identify its presence in the cells of the studied plants. It was found that after a short-term exposure to 150 mM sodium chloride, corn seedlings actually experience salt stress, as evidenced by an increase in the expression of the ZmCOI6.1 gene, which can be considered a marker of the general stress response. Stress-induced changes in the functioning of enzymes of the malate dehydrogenase system play a significant role in the formation of adaptive reactions of the cell to the action of the stressor. Enzymes of C4

plants are of particular interest here, because it is this group of plants that has great adaptive potential. The effect of three-hour salinity on differentiated tissues of corn seedlings (*Zea mays* L.) was studied. Salt-induced changes in the functioning of NAD- and NADP-dependent enzymes of the MDH system are shown. It was found that sodium chloride in the mesophyll of maize causes the activation of NAD⁺-dependent MDH, NAD- and NADP⁺- malic-enzymes, and also leads to inhibition of NADP⁺-dependent MDH. At the same time, the NAD-malic-enzyme and NADP⁺-dependent MDH are intensified in the cells of the lining tissue under the influence of chloride salinization. As for the parietal forms of NAD⁺-dependent MDH, NADP⁺-malic-enzyme, the indices of their activity were not significant in the control and experimental samples. It was found that sodium chloride in the mesophyll of maize causes the activation of NAD⁺-dependent MDH, NAD- and NADP⁺- malic-enzymes, and also leads to inhibition of NADP⁺-dependent MDH. At the same time, the NAD-malic-enzyme and NADP⁺-dependent MDH are intensified in the cells of the lining tissue under the influence of chloride salinization. As for the parietal forms of NAD⁺-dependent MDH, NADP⁺-malic-enzyme, the indices of their activity were not significant in the control and experimental samples. It is concluded that the work of the enzymes of the mesophyll MDH system is aimed at compensating for the stress effect, and the sheath cells work in the most autonomous mode as possible. A hypothetical scheme for the rearrangement of tissue metabolism during salinization has been created, suggesting inhibition of the mesophilic branch of the Hatch-Slack cycle and the supply of malate by mesophyll cells to the sheath cells. Possible ways to compensate for the lack of endogenous carbon dioxide and NADPH due to anaerobic reactions to ensure uninterrupted operation of the Calvin cycle are proposed.

Keywords: salinity. salt stress, marker protein, adaptation, malate dehydrogenase, malic enzyme, mesophyll, bundle sheath cells.

REFERENCES

1. Nguyen T., Leipner J., Stamp P., Guerra-Peraza O., *Plant Physiology and Biochemistry*, 2009, 47 (2), 116-122.
2. Eprintsev AT, Fedorina OS, Bessmeltseva Yu.S., *Plant Physiology*. 2011, 58 (3), 384-390.
3. Balnokin Yu.V., Kotov A.A., Myasoedov N.A., Khailova G.F., Kurkova E.B., Lunkov R.V., and Kotova L.M., *Plant Physiology*, 2005, 52 (4), 549-557.
4. Vasekina A.V. Vasekina A.V., Ershov P.V., Reshetova O.S., Tikhonova T.V., Lunin V.G., Trofimova M.S., Babkov A.V., *Biochemistry*. 2005, 70(1), 123-132.
5. Eprintsev A.T., Fedorina O.S., *Plant Physiology*, 2007, 6, 820-827.
6. Ivanishchev V. V., Kurganov B.I., *Biochemistry*, 1992. 57(5), 653-661.
7. Gulzar S., Khan M.A., Ungar I.A., *Seed Sci. and Technol*, 2001,29(1), 21-29.
8. Chomczynski P., Sacchi N., *Anal. Biochem*. 1987, 162, 156-159.
9. Nicot N., Hausman J.F., Hoffmann L., Evers D., *J. of Exp. Bot.*, 2005, 56, P. 2907–2914.
10. Livak K.J., Schmittgen T.D., *Methods*, 2001, 25, 402-408.
11. Eprintsev AT, Iventyev A.N. and Popov V.N., *Plant Physiology*, 2005, 52 (4) 622-627.
12. Selivanova N.V., Fedorin D.N., Yeprintsev A.T.; *Biochemical methods for the study of enzymes of the glyoxylate cycle and CTC: teaching aid for universities*, Voronezh. state Univ. —Voronezh: Voronezh State University Publishing House, 2014, 39 p.
13. Lakin G.F. *Biometrics*, Moscow: Vyssh. shk., 1990. 351 p.
14. Mutlu F. Bozkuk S., *Plant Physiology*, 2005, 52(1), 36-42.
15. Hare P.D., Cress W.A., Van Staden J., *Plant Cell and Environment*, 1998, 21, 535–553.
16. A.T. Eprintsev, Fedorin D.N. *Photosynthesis in schemes: a tutorial for students*. Universities, Voronezh. state un-t. - Voronezh: IPC VGU, 2009, 121 p.
17. Backhausen J.E., Emmerlich G., Holtgreffe S., Horton G., Pjpt, Rogers J.M., Mueller-Roeber B., Scheibe R., *Planta*. 1998, 207, 105-114.
18. Pierre J.-N., Prieto J.-L., Gadal P., Vidal J., *Photosynth. Res.* №3, 2004, 79, 349-355
19. Khan M.Ajmal, Gul Bilquees, Weber Darrell J., *Commun. Soil Sci. and Plant Anal.*, 2001, 17-18 (32) 2965-2977.
20. Delauney A.J., Verma D.S. // *Plant J.*, 1993, 4, 215-223.
21. Semikhatova O.A. Ivanova T.I., Yudina O.S., *Plant Physiology*, 1993, 40(4), 558-567