

**ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ
НАДФ⁺-ЗАВИСИМОЙ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В
ЛИСТЯХ ПШЕНИЦЫ В УСЛОВИЯХ СОЛЕВОГО СТРЕССА****М. О. Гатауллина, А. Т. Епринцев**

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 19.03.2022 г.

Аннотация. Хозяйственное функционирование человека со временем изменяет биогенез экосистемы. Малорациональное использование земельных ресурсов порождает засуху, засоление, повышение радиоактивного фона. Это негативно влияет на плодородие почв и качество растений, произрастающих на них.

Загрязнение почвы солями является одним из главных экологических факторов, который может ограничивать рост и развитие растений и может привести к уменьшению урожайности и качества сельскохоззяйственных культур.

Несмотря на засоленность растения развивают сложные механизмы устойчивости для адаптации к засолению в почвах, включая физиологические и биохимические реакции, которые различаются на видовом уровне. Растения используют механизмы для снятия абиотического стресса, уменьшая потери воды, и ограничивают ее поглощение. Кроме того, растения минимизируют неблагоприятные последствия ионного Na⁺ стресса путем выведения Na⁺ из тканей листа и путем компартментализации Na⁺ в значительной степени в вакуоли. Несмотря на эти механизмы, солевой стресс снижает урожайность сельскохоззяйственных культур и негативно влияет на все метаболические процессы в организме, включая фотосинтез.

НАДФ⁺-зависимая малатдегидрогеназа катализируют реакцию восстановления малата до оксалоацетата в сочетании с восстановлением никотинамидного кофермента. Данный фермент участвует в механизме фиксации и транспорта CO₂ и в регенерации НАДФН для биосинтетических процессов, работе малат-аспаратного челнока и поддержании окислительно-восстановительного баланса. А также, может отвечать на стрессовые воздействия.

В ходе работы нами исследована динамика активности НАДФ⁺-МДГ в зеленых листьях пшеницы (*Triticum aestivum*) в условиях солевого стресса.

При воздействии солевого стресса показано резкое увеличение активности фермента в первые 6 часов экспозиции, пик которого приходится на 3 часа. Активность НАДФ⁺-МДГ увеличивается почти в 8 раз по сравнению с нормальными значениями. Однако через 24 часа экспозиции активность малатдегидрогеназы пшеницы снижается ниже нормальных значений.

Изменение относительного уровня транскриптов генов, кодирующих МДГ, в целом, соответствует динамике активности фермента, достигая своего максимума на 3 часа экспозиции в NaCl. Данный факт позволяет сделать вывод об изменении экспрессии *nadp-mdh*, как основного механизма изменения работы фермента.

Ключевые слова: малатдегидрогеназа, пшеница, *Triticum aestivum*, зеленые листья, солевой стресс, ПЦР, экспрессия

НАДФ⁺-зависимая малатдегидрогеназа (К.Ф. 1.1.1.82) – это светоактивируемый фермент хлоропластов [1, 2]. Считается, что регуляция света *in vivo* опосредуется катализируемым тиоредоксином восстановлением и повторным окислени-

ем остатков цистина. На скорость обратимой активации и инактивации фермента сильно влияют коферментные субстраты, которые, по-видимому, в конечном счете определяют стационарную степень активации [3].

В отличие от C₄- фотосинтеза, в котором НАДФ⁺-МДГ играет хорошо известную роль

в префиксации CO₂, функция фермента у C₃-растений менее ясна, поскольку нет известных примеров подобной роли фермента в ассимиляции углерода. В данных растениях НАДФ⁺-МДГ, вероятно, выполняет другие задачи [4-6]. Существуют доказательства того, что фермент участвует в тонкой настройке окислительно-восстановительного состояния стромы через «малатный челнок»: контролируемое снижение оксалоацетата способно уравновесить соотношение АТФ/НАДФН внутри хлоропласта, когда происходят изменения в использовании электронов или уровней АТФ, вызванных изменениями интенсивности света или открытием устьиц [7]. Большая часть малата, образовавшегося на свету, обусловлена активностью НАДФ⁺-МДГ [8, 9].

Проведенный поиск нуклеотидных последовательностей в базе данных Gen Bank показал, что НАДФ⁺-МДГ пшеницы кодируется одним геном, расположенным в 5 хромосоме (Gene ID: 119298570). *Nadp-mdh* имеет длину 2096 нуклеотидов и содержит в своем составе 10 экзонов.

Целью работы являлось исследование функционирования НАДФ⁺-зависимой оксидоредущей малатдегидрогеназы в условиях солевого стресса в зеленых листьях кукурузы.

ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объектов исследования в работе использовали листья 10-ти дневных проростков пшеницы (*Triticum aestivum*), выращенные гидропонным способом при 10-ти часовом световом дне, температуре 25°C и интенсивности света 25 Вт/м².

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Определение активности малатдегидрогеназы Ферментативной единицей активности считали количество фермента, которое превращало 1 мкмоль НАДФН за 1 мин при 25°.

Активность НАДФ⁺-МДГ определяли спектрофотометрически при 340 нм. Для определения скорости восстановления пирувата среда спектрофотометрирования содержала 100мМ Tris-HCl, рН 8.0; 1.5 мМ оксалоацетат, 0.15 мМ НАДФН. В качестве кофермента использовали 5 мМ MgCl₂ [10].

Постановка эксперимента по действию солевого стресса на растительный организм

Группы растений без корневой системы культивировали в растворе NaCl 24 часа. Концентрация солевого раствора хлорида натрия (NaCl) составляла 150мМ. Контрольной группой являлись растения, помещенные в воду.

Первые образцы для исследования извлекали ещё до начала инкубации (нулевой образец) и из контрольной, и из опытной группы растений. Далее, образцы отбирались из инкубационной среды через час, два, три, шесть, двенадцать и двадцать четыре часа от начала эксперимента [11].

Выделение тотальной РНК из растительных образцов осуществляли методом гуанидинтиоцианат-фенол-хлороформной экстракции [12]. Обратную транскрипцию мРНК проводили с использованием обратной транскриптазы MMLV («Евроген», Россия) согласно инструкции производителя. Подбор праймеров осуществлялся на основе нуклеотидных последовательностей, представленных в международной базе GeneBank, с помощью программы Primer-BLAST (табл.1). Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием специфичных праймеров на приборе LightCycler96 (Roche, Швеция), используя SybrGreen I в качестве красителя. Количество матрицы контролировали с помощью параллельной амплификации фактора элонгации *ef-1a* с ген-специфичными праймерами [13]. Относительный уровень экспрессии исследуемых генов рассчитывали с применением 2^{-ΔΔCt}-метода [14].

Опыты проводили в 3-4-кратной повторности, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в трех повторностях. Предварительная оценка характера распределения проводилась по асимметрии и эксцессу (Excel, Microsoft Office), а также с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Полученные значения позволили оценить характер распределения как нормальный. Критерий Стьюдента использовался с применением поправки Бонферрони на множественные сравнения [15]. Дополнительно применялся однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, который показал, что исследуемый в работе фактор действительно оказывал влияние (влияние фактора достоверно при $p < 0.05$) [16].

Таблица 1.

Разработка олигонуклеотидных последовательностей к *nadp-mdh*.

Праймер	Последовательность	Tm:	GC:
Прямой	CCATGAGGTCCCTTGTGACT	60.0 °C	55.0 %
Обратный	TCCTGTTGGGAATGTTGTCA	59.9 °C	45.0 %

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Воздействие хлорида натрия, как стрессового фактора, зачастую оказывает сильное воздействие на метаболизм растений [17]. Для адаптации организм способен замедлять и ускорять биохимические процессы [18].

Спектрофотометрическими методами была определена динамика активности НАДФ⁺-МДГ в листьях пшеницы в условиях солевого стресса. Показано, что в первые часы воздействия стрессового фактора активность исследуемого фермента резко возрастает. Пик активности приходится на 3 час экспозиции, увеличиваясь почти в 8 раз. После 12 часов наблюдается падение ферментативной активности (Рис.1).

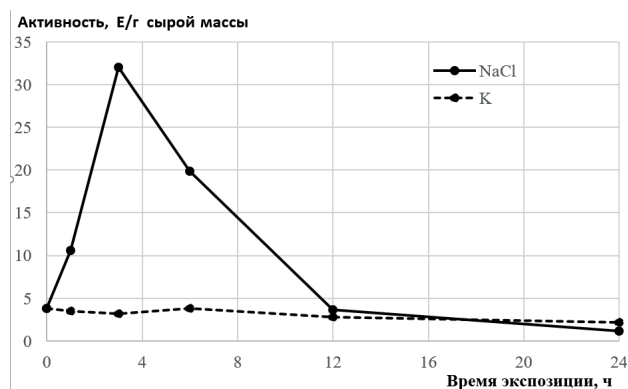


Рис. 1. Динамика активности НАДФ⁺-МДГ в листьях пшеницы при солевом стрессе. К – контроль, NaCl – опытные образцы.

Показанная выше динамика активности связана, в первую очередь, с физиологическими функциями фермента. Активация НАДФ⁺-МДГ в первые часы приводит к накоплению малата, который как и цитрат является необходимым запасным веществом растений, или НАДФН, в зависимости от потребностей клетки [19]. Так окислительно-восстановительные эквиваленты могут обеспечивать клетку дополнительной энергией и сокращать количество АФК. Интермедиаты малат и оксалоацетат превращаются в необходимые компоненты азотистого метаболизма [20].

Установлено, что уровень транскриптов генов, кодирующих МДГ, в целом, коррелирует с изменениями общей ферментативной активности при солевом стрессе (Рис. 2). В условиях повышенной концентрации хлорида натрия в первые часы инкубации происходит увеличение концентрации мРНК по сравнению с контролем. Максимальное значение относительного уровня транскриптов для гена *nadp-mdh* показано через три часа, после чего он начинает снижаться.

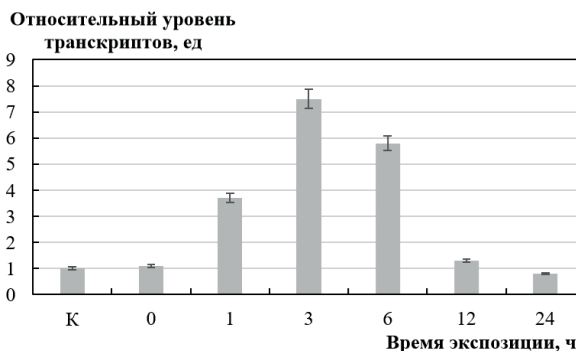


Рис. 2. Уровень относительных транскриптов *nadp-mdh* в листьях пшеницы в условиях солевого стресса

Растения, находившиеся в воде в течение всего эксперимента, демонстрировали постоянные значения относительного уровня транскриптов. Таким образом, изменение активности НАДФ⁺-зависимой малатдегидрогеназы связано с изменением экспрессии гена *nadp-mdh*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании приведенных исследований была изучена физиологическая роль НАДФ⁺-зависимой оксидоредуцирующей малатдегидрогеназы растений. НАДФ⁺-зависимая малатдегидрогеназа катализирует реакцию восстановления малата до оксалоацетата в сочетании с восстановлением никотинамидного кофермента. Данный фермент участвует в механизме фиксации и транспорта CO₂ и в регенерации НАДФН для биосинтетических процессов, работе малат-аспаратного челнока и поддержания окислительно-восстановительного баланса. А также может отвечать на солевой стресс.

Показано, что в первые часы воздействия данного вида стресса, активность НАДФ⁺-МДГ в листьях C₃- растений резко возрастает, что связано с синтезом окислительно-восстановительных эквивалентов, интермедиатов биохимических реакций. Повышение активности исследуемого фермента сохраняется на протяжении 6 часов экспозиции, после чего растение входит в фазу истощения. К 24 часам воздействия солевого стресса уровень НАДФ⁺-зависимой малатдегидрогеназы падает ниже контрольных значений.

НАДФ⁺-МДГ как в листьях пшеницы кодируется одним геном. Его уровень экспрессии регулирует активность МДГ в условиях солевого стресса.

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. Perrot-Rechenmann C., Jacquot J.P., Gadal P., Weeden N.F., Cseke C., Buchanan B.B. //Plant Science Letters. 1983. Т. 30. №. 2. С. 219-226.
2. Климов С.В. //Успехи современной биологии. 2008. Т. 128. №. 3. С. 281-299.
3. Trevanion S. J., Furbank R. T., Ashton A. R. //Plant physiology. 1997. Т. 113. №. 4. С.1153-1165
4. Minarik P., Tomaskova, N., Kollarova, M., Antalík, M. //General physiology and biophysics. 2002.Т. 21. №. 3. С. 257-266.
5. Miginiac-Maslow M., Johansson, E. Ruelland K., Issakidis-Bourguet E., Schepens I., Goyer A., Lemaire-Chamley M., Jacquot J.-P., Le Maréchal P., Decottignies P. //Physiologia Plantarum. 2000. Т. 110. №. 3. С. 322-329.
6. Krämer M., Kunz H. H. //Frontiers in Plant Science. 2021. Т. 12. С. 2319
7. Федулов Ю. П., Подушин Ю. В. Фотосинтез и дыхание растений. //Краснодар, КубГАУ, 2019, 101 с.
8. Selinski J., Scheibe R. //Plant Biology. 2019. Т. 21. С. 21-30.
9. Edwards G.E., Andreo C. S. //Phytochemistry. 1992. Т. 31. №. 6. С. 1845-1857.
10. Епринцев А. Т., Гатаулина М. О. //Прикладная биохимия и микробиология. 2021. Т. 57. №. 1. С. 54-58.
11. Анохина, Г. Б., Картавцева, Л. С., Дедов, Я. И., Оя, П. С., Епринцев, А. Т. //Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2019. №. 3. С. 26-33.
12. Chomczynski P, Sacchi N.// Anal. Biochem. 1987. Т. 162. С. 156–159.
13. Livak K.J., Schmittgen T.D // Methods. 2001. Т. 25. С. 402-408.
14. Nicot N., Hausman J.F., Hoffmann L., Evers D. // J. Exp. Bot. 2005. Т. 56. С. 2907-2914.
15. Lakin G.F. Biometrics. Moskow, Higher School, 1990, 351 с.
16. Чернышев Г.А. Вероятность и статистика в биологии и химии. Воронеж, ВГУ, 1998, 270 с.
17. Авальбаев А. М., Юлдашев Р. А., Фатхутдинова Р. А., Урусов Ф. А., Сафутдинова, Ю. В., Шакирова Ф. М. //Прикладная биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. №. 1. С. 109-112.
18. Епринцев А. Т. , Федорина О.С. //Journal of Stress Physiology & Biochemistry. 2006. Т. 2. №. 2. С. 1-10.
19. Igamberdiev A. U., Eprintsev A. T. //Frontiers in Plant Science. 2016. Т. 7. С. 1042.
20. Yoo, H., Kim, S. J., Kim, Y., Lee, H., & Kim, T. Y. // Int. J. Biochem. Cell. Biol. 2007. Т. 39, № 6. С. 1248-1259.

*Воронежский государственный университет
Гатаулина М. О., ассистент кафедры физиологии человека и животных, ассистент кафедры биохимии и физиологии клетки*

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

*Voronezh State University
Gataullina M. O., assistant of the Department of Physiology Human and Animal, assistant Department of Biochemistry and Cell Physiology*

*Eprintsev A. T., PhD., DSci., Head of the Biochemistry and Cell Physiology Dept.
E-mail: bc366@bio.vsu.ru*

FUNCTIONING OF NADPH⁺-DEPENDENT MALATE DEHYDROGENASE IN WHEAT LEAVES UNDER SALT STRESS

M. O. Gataullina, A. T. Eprintsev

Voronezh State University

Abstract. The economic humans functioning changes the biogenesis of the ecosystem over time. Irrational use of land resources generates drought, salinization, and an increase in the radioactive background. This negatively affects soil fertility and the quality of plants growing on them.

Salinity of the soil with salts is one of the main environmental factors that can limit the growth and development of plants and can lead to a decrease in the yield and quality of crops.

Despite salinity, plants develop complex tolerance mechanisms to adapt to salinity in soils, including physiological and biochemical responses that differ at the species level. Plants use mechanisms to relieve abiotic stress by reducing water loss and limiting water uptake. In addition, plants minimize the adverse effects of Na⁺ ion stress by excreting Na⁺ from leaf tissues and by compartmentalizing Na⁺ to a large extent in the vacuole. Despite these mechanisms, salt stress reduces crop yields and adversely affects all metabolic processes in the body, including photosynthesis.

NADP⁺-dependent malate dehydrogenase catalyzes the reduction of malate to oxaloacetate in combination with the reduction of nicotinamide coenzyme. This enzyme is involved in the mechanism of fixation and transport of CO₂ and in the regeneration of NADPH for biosynthetic processes, the operation of the malate-aspartate shuttle and the maintenance of redox balance. And also, it can respond to stressful influences.

We studied the dynamics of NADP⁺-MDH activity in green leaves of wheat (*Triticum aestivum*) under salt stress.

When exposed to salt stress, a sharp increase in enzyme activity was shown in the first 6 hours of exposure, the peak of which falls on 3 hours. The activity of NADP⁺-MDH increases almost 8 times compared to normal values. However, after 24 hours of exposure, the activity of wheat malate dehydrogenase decreases below normal values. The change in the relative level of transcripts of genes encoding MDH generally corresponds to the dynamics of enzyme activity, reaching its maximum at 3 hours of exposure to NaCl. This fact allows us to conclude that there is a change in *nadp-mdh* expression as the main mechanism for changing the functioning of the enzyme.

Keywords: malate dehydrogenase, wheat, *Triticum aestivum*, green leaves, salt stress, PCR, expression

REFERENCES

1. Perrot-Rechenmann C., Jacquot J.P., Gadal P., Weeden N.F., Cseke C., Buchanan B.B., Plant Science Letters, 1983, V. 30, № 2, pp. 219-226.
2. Klimov S. V., Successes of modern biology, 2008, V. 128, №. 3, pp. 281-299.
3. Trevanion S. J., Furbank R. T., Ashton A. R., Plant physiology. 1997, V. 113, №. 4, pp.1153-1165
4. Minarik P., Tomaskova, N., Kollarova, M., Antalík, M., General physiology and biophysics, 2002, V. 21, № 3, pp. 257-266.
5. Miginiac-Maslow M., Johansson, E. Ruelland K., Issakidis-Bourguet E., Schepens I., Goyer A., Lemaire-Chamley M., Jacquot J.-P., Le Maréchal P., Decottignies P., Physiologia Plantarum, 2000, V. 110, № 3, pp. 322-329.
6. Krämer M., Kunz H. H., Frontiers in Plant Science, 2021, V. 12, P. 2319.
7. Fedulov Yu. P., Podushin Yu. V. Fotosintez i dihanie rastenii. Krasnodar, KubGAU, 2019, 101 p.
8. Selinski J., Scheibe R., Plant Biology, 2019, V. 21, pp. 21-30.
9. Edwards G. E., Andreo C. S., Phytochemistry, 1992, V. 31, № 6, pp. 1845-1857
10. Eprintsev A. T., Gataullina M. O., Applied Biochemistry and Microbiology, 2021, V. 57, № 1, pp. 54-58.
11. Anokhina, G. B., Kartavtseva, L. S., Dedov, Ya. I., Oya, P. S., Eprintsev, A. T., Bulletin of the Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy, 2019, № 3, pp. 26-33.
12. Chomczynski P., Sacchi N., Anal. Biochem, 1987, V. 162, pp. 156-159.
13. Livak K.J., Schmittgen T.D., Methods, 2001, V. 25, pp. 402-408.
14. Nicot N., Hausman J.F., Hoffmann L., Evers D., J. Exp. Bot. , 2005, V. 56, pp. 2907-2914.
15. Lakin G.F. Biometrics. Moscow, Higher School, 1990, 351 p.
16. Chernishev G.A. Veroyatnost i statistika v biologii i himii. Voronezh, VGU, 1998, 270 p.
17. Avalbaev A. M., Yuldashev R. A., Fathutdinova R. A., Urusov F. A., Safutdinova Yu. V., Shakirova F. M., Applied Biochemistry and Microbiology, 2010, V. 46, № 1, pp. 109-112.
18. Yeprintsev A. T., Fedorina O.S., Journal of Stress Physiology & Biochemistry, 2006, V. 2, № 2, pp. 1-10.
19. Igamberdiev A. U., Eprintsev A. T., Frontiers in Plant Science, 2016, V. 7, pp. 1042.
20. Yoo, H., Kim, S. J., Kim, Y., Lee, H., & Kim, T. Y., Int. J. Biochem. Cell. Biol., 2007, V. 39, № 6, pp. 1248-1259.