

**РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ
ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ПРОРАСТАЮЩЕЙ
КУКУРУЗЕ ПРИ ПЕРЕХОДЕ ОТ ГЕТЕРОТРОФНОГО
К АВТОТРОФНОМУ ТИПУ ПИТАНИЯ****П.С. Оя, Г.Б. Анохина, А.Т. Епринцев**

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 05.05.2023 г.

Аннотация. Биология семян привлекают все больше внимания со стороны биологов растений. Прорастание семян рассматривается как одна из первых и наиболее фундаментальных стадий жизни растения, так что успех в росте и получении урожая также зависит от этой стадии. Формирование фотосинтезирующих проростков также является решающим этапом в процессе онтогенеза растительного организма, в тот момент, когда прорастающий гетеротрофный «эмбрион» переключается на автотрофный рост и развитие. Однако у разных видов растений существуют определенные различные механизмы для мобилизации резервов и активизации обмена веществ.

Были изучены биохимические, молекулярные и эпигенетические механизмы регуляции активности глутаматдегидрогеназы (ГДГ, КФ 1.4.1.3) в кукурузе (*Zea mays* L.) при переходе от гетеротрофного типа питания к автотрофному. В результате проведенного исследования было установлено, что в процессе прорастания семян кукурузы глутаматдегидрогеназа играет важную роль, обеспечивая поставку важных интермедиатов.

В ходе работы исследована динамика активности глутаматдегидрогеназы в щитках семян и проростках кукурузы в течение первых десяти дней прорастания. Максимальный уровень активности ГДГ обнаруживается в щитках в первый период прорастающего семени на 1-2 дни, а в проростках (листьях) на 9-10 дни прорастания кукурузы.

Установлено, что на второй день прорастания семян кукурузы в щитках исследуемый фермент демонстрирует максимальные значения ферментативной активности. В течении всех десяти дней отмечены флуктуирующие изменения в динамике каталитической активности глутаматдегидрогеназы.

Показано, что появление фотосинтезирующей системы и ее дальнейшее развитие приводит к тому, что роль глутаматдегидрогеназы как поставщика глутамата для синтеза аминокислот постепенно снижается. При этом данный энзим начинает выступать как поставщик 2-оксоглутарата для ЦТК, что позволяет увеличить приток энергии.

Благодаря проведению ПЦР в реальном времени исследовано изменение в транскрипции генов, в геноме кукурузы кодирующих субъединицы глутаматдегидрогеназы. Выявлена роль процесса метилирования CpG-динуклеотидов в составе промотора в регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* при переходе растительного организма от гетеротрофии к автотрофии.

Ключевые слова: *Zea mays* L., глутаматдегидрогеназа, изоферменты, транскрипция, прорастание, метилирование.

Исследования ферментных систем растений при переходе организма от гетеротрофного типа питания к автотрофному очень важны для понимания физиологических и биохимических особенностей растительных клеток, и играют большую

роль, как для фундаментальной биологии, так и для сельского хозяйства. Однако, к сожалению, до сих пор остается загадкой, то, как координируются ферментативные системы, участвующие в процессах энергетического и пластического обмена, ответственные за начало изменения метаболических потоков во время этого перехода.

Усвоение азота и углерода представляют собой два основных метаболических процесса, от которых зависит рост и развитие растения. Следовательно, крайне важно, чтобы растения поддерживали баланс между пулами метаболитов углерода и азота на каждой стадии развития, от прорастающего семени до взрослого растения [1]. Глутаматдегидрогеназа (НАД(Ф)-ГДГ, КФ 1.4.1.3) представляет собой фермент, который связывает оба этих метаболических пула в клетке, поскольку он может осуществлять реакцию восстановительного аминирования 2-оксоглутарата до глутамата и обратную реакцию окислительного дезаминирования глутаминовой кислоты.

ГДГ растительных организмов обеспечивает работу опосредованного транспорта клетки, синтез аминокислот, поставку 2-оксоглутарата для цикла трикарбоновых кислот и функционирование ГАМК-шунта [2]. В основном значительная часть ГДГ растений локализуется в митохондриях. Однако незначительная доля ГДГ-активности обнаруживается в цитоплазме [3].

Ферменты семейства глутаматдегидрогеназ могут быть классифицированы на три типа в соответствии с их кофакторной принадлежностью: НАД-зависимая глутаматдегидрогеназа (КФ 1.4.1.2), НАДФ-зависимая глутаматдегидрогеназа (КФ 1.4.1.4) и глутаматдегидрогеназа, которая способна использовать сразу оба кофактора (КФ 1.4.1.3) (двойные кофермент-специфические ГДГ) [4].

В геноме кукурузы ГДГ представлена двумя генами *GDH1* (*LOC542220*) и *GDH2* (*LOC100193614*), которые кодирует отдельные типы субъединиц фермента: β и α , соответственно [5]. Оба гена хотя и имеют довольно схожий характер экспрессии, но не всегда экспрессируются на одном уровне. Известно, что преобладание в структуре полипептида ГДГ β -субъединиц смещает равновесие в сторону образования глутамата, тогда как превалирование α -субъединиц приводит к образованию 2-оксоглутаровой кислоты [6]. Показано, что метаболические роли α - и β -субъединиц, оцениваемые генетическими методами, различаются [7].

В связи этим целью работы являлось выяснение механизмов регуляции активности глутаматдегидрогеназы в прорастающей кукурузе при смене типов питания.

ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования выступали семена и проростки кукурузы (*Zea mays* L.) сорта Воронеж-

ская 76, которые были выращены при температуре 25°C гидропонным способом при 10-часовом световом дне с интенсивностью света 100 Вт/м² ("LabTech", Корея).

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Экстракция митохондриальной фракции. Растительный материал перетирали в ступке с холодной средой экстракции, которая включала в свой состав 0.4 М сахарозы, 1 мМ калия хлорида, 4 мМ магния хлорида, 2.5 мМ ЭДТА, 0.15 М Tris-HCl буфер (pH 7.4), после чего фильтровали и осаждали разрушенные клеточные стенки центрифугированием в течении 3 мин. при 3000 об/мин (Eppendorf Centrifuge 5804R, "Eppendorf", Германия). Надосадочную жидкость центрифугировали при +4°C в течении 10 минут при 18000 g. Выделенную фракцию митохондрий разрушали осмотическим шоком в холодной среде ресуспендирования (0.15 М Tris-HCl буфер (pH 7.4)). Контроль за степенью разрушения митохондрий осуществляли микроскопированием (микроскоп Olympus CX41RF, "Olympus", Япония). Степень разрушения митохондрий была более 90%. Экстрагированные митохондрии использовали для определения активности глутаматдегидрогеназы [8].

Определение активности глутаматдегидрогеназы. Активность измеряли спектрофотометрически по прямой и обратной реакции при длине волны 340 нм. Для реакции аминирования фотометрическая среда содержала 2.5 мМ α -кетоглутаровой кислоты, 0.25 мМ НАДН, 50 мМ хлорида аммония, 100 мМ Tris-HCl буфера pH 8.0 [9, 10].

Для исследования активности ГДГ по реакции дезаминирования использовали среду фотометрирования, содержащую 100 мМ Tris-HCl буфер pH 8.5, 3 мМ НАД, 1 мМ хлорид кальция, 50 мМ глутамат натрия [11].

Экстракция РНК и ДНК. Экстракцию РНК проводили фенол-хлороформным методом [12]. Выделение ДНК осуществлялось путем лизиса растительной ткани в буфере, содержащем: 2% ЦТАБ, 1.4 М хлорида натрия, 20 мМ ЭДТА, 100 мМ Tris-HCl (pH 8.0) с последующей экстракцией смесью фенола и хлороформа [13].

Реакция обратной транскрипции для синтеза кДНК. Обратную транскрипцию мРНК проводили с использованием обратной транскриптазы MMLV ("Евроген", Россия).

Подбор праймеров. Подбор праймеров осуществлялся на основе нуклеотидных последовательностей из GenBank, с помощью программы

Primer-BLAST (табл. 1) [10]. Подбор праймеров для МС-ПЦР осуществляли также с помощью онлайн-сервиса MethPrimer (табл. 2).

Полимеразная цепная реакция в реальном времени. Полимеразную цепную реакцию проводили на приборе LightCycler96 (“Roche”, Швеция) с красителем SybrGreen I (“Евроген”, Россия). Количество матрицы контролировали с помощью параллельной амплификации фактора элонгации *ef-1a* [14]. В качестве отрицательного контроля использовали суммарную РНК без этапа обратной транскрипции. Относительный уровень экспрессии исследуемых генов определяли с применением $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -метода [15].

Конверсия ДНК бисульфитом натрия. Трансформация ДНК проводилась в три этапа с использованием бисульфита натрия в качестве основного модифицированного агента. На первом этапе, предварительно денатурированная ДНК конвертировалась путём добавления смеси 4 М NaHSO₃ и 200 мМ С₆Н₄(ОН)₂ с последующей инкубацией в темноте при 55 °С в течение 4 часов. Второй этап включал в себя отмывку ДНК с использованием набора CleanMag DNA (Евроген, Россия). Десульфитирование проводили в два этапа. На первом этапе модифицированную ДНК термостатировали при 37°С в присутствии 0.3 М гидроксида натрия в течение двадцати минут. Затем переводили ДНК

Таблица 1

Праймеры к генам глутаматдегидрогеназы для проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени

Ген	Праймер	Нуклеотидная последовательность	Температура отжига, °С
GDH1	прямой	GCGGAGAACAAGGGGATCAA	58
	обратный	ACAGGATCTCGTCTGCCTCT	
GDH2	прямой	TGATCCAGAGGCAGACGAGA	60
	обратный	GTAATGCGCGGTCAATGGTC	

Таблица 2

Праймеры к генам глутаматдегидрогеназы для метил-специфичной полимеразной цепной реакции

Ген	Название	Положение исследуемого цитозина		Последовательность	Температура отжига, °С
GDH1	Прямой М	1	-779	ATTTGTAGATTTAATCGGTTGGGT	52-53
	Обратный М			AAAAACTAAAATCACTATTCTCGTT	
	Прямой U			ATTTGTAGATTTAATTGGTTGGGT	
	Обратный U			AAAAACTAAAATCACTATTCTCATT	
	Прямой М	2	-419	TCGTAGTAATTTTGTTTTGTGG	52-53
	Обратный М			AAAAACTAAAATCACTATTCTCGTT	
	Прямой U			TTGTAGTAATTTTGTTTTGTGG	
	Обратный U			AAAAACTAAAATCACTATTCTCATT	
	Прямой М	3	-340	TAAGATTGTATATTTTCGGTGGTAT	52-53
	Обратный М			AAAAACTAAAATCACTATTCTCGTT	
	Прямой U			TAAGATTGTATATTTTGGTGGTAT	
	Обратный U			AAAAACTAAAATCACTATTCTCATT	
GDH2	Прямой М	1	-304	AGATAAGTTAGTTATGGGATGGGC	53
	Обратный М			TACGTCTTCTTAATAACCAAACGAA	
	Прямой U			AGATAAGTTAGTTATGGGATGGGTG	
	Обратный U			TACATCTTCTTAATAACCAAACAAA	
	Прямой М	2	-263	GGTAAGTGGACGGAAAAGGA	53
	Обратный М			TACGTCTTCTTAATAACCAAACGAA	
	Прямой U			GGTAAGTGGATGGAAAAGGA	
	Обратный U			TACATCTTCTTAATAACCAAACAAA	
	Прямой М	3	-185	GGTTCGGTTTAGTTTTGAAATAAT	53
	Обратный М			TACGTCTTCTTAATAACCAAACGAA	
	Прямой U			GGTTCGGTTTAGTTTTGAAATAAT	
	Обратный U			TACATCTTCTTAATAACCAAACAAA	

из растворенного состояния в осадок добавлением 1/10 от общего объема смеси 10 М ацетата аммония и трёх объемов 80% этилового спирта. Инкубация при -20°C способствовала выпадению ДНК в осадок. После тридцатиминутного центрифугирования при 13 тыс. об/мин. ДНК отмывали от солей и иных ингибиторов ПЦР двумя объемами 80% этилового спирта и высушивали. Полученный осадок растворяли в 50 мкл ТЕ-буфера [16, 17].

Проведение полимеразной цепной реакции с метилспецифичными праймерами. Для определения метильного статуса CpG-динуклеотидов в промоторах генов *GDH1* и *GDH2* глутаматдегидрогеназы проводили метил-специфичную ПЦР с применением ScreenMix (“Евроген”, Москва). Амплификацию проводили на приборе Mini AMP Thermal cycler (Thermo Fisher, США)[17].

Анализ промоторной области генов на наличие CpG-островков. Промоторные области исследуемых генов семейства GDH анализировали на присутствие в их составе CG-богатых областей с помощью онлайн-сервиса MethPrimer.

Статистическая обработка данных. Опыты проводили в 3-4-кратной повторности, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в трех повторностях. Статистический анализ полученных данных проводился с использованием программы STATISTICA 12.0. Количественные показатели оценивались на предмет соответствия нормальному распределению с помощью критерия Шапиро-Уилка. Результаты на графиках выражали как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (SEM). Различия анализировали на статистическую значимость с использованием критерия Стьюдента. Кроме того, применялся однофакторный дисперсионный анализ ANOVA. Полученные в рамках исследования различия статистически достоверны ($p \leq 0.05$)[18].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты исследования активности глутаматдегидрогеназы в щитках и листьях кукурузы показали, что активность фермента изменяется в течение всего периода прорастания растения. Измерение активности ГДГ по реакции аминирования в щитках и листьях кукурузы в течение первых 10 дней прорастания показало, что в щитках фермент активизируется уже начиная с момента набухания семени. В первый день прорастания активность ГДГ достигает значения в 236.3 Е/г. с. м., в дальнейшем постепенно снижаясь. К 8 дню прорастания семени общая ферментативная ак-

тивность глутаматдегидрогеназы в щитках кукурузы снижается в 6.5 раз, и к 10 дню достигает своих наименьших значений за весь период прорастания равных 13.3 Е/г. с. м.

Появление зеленых листьев кукурузы отмечается на 5 день прорастания семени. Каталитическая активность энзима в этот момент составляет 25.7 Е/г. с. м. и в последующие дни прорастания с ростом проростков увеличивается. К 10 дню прорастания активность ГДГ увеличивается в 4.9 раза. Активность в листьях кукурузы по сравнению с щитками несколько ниже, что возможно связано с присутствием в зеленых листьях глутамин-синтетазной активности, доминирующей на свету. Однако следует отметить, что с каждым днем прорастания активность стабильно растет (Рис. 1).

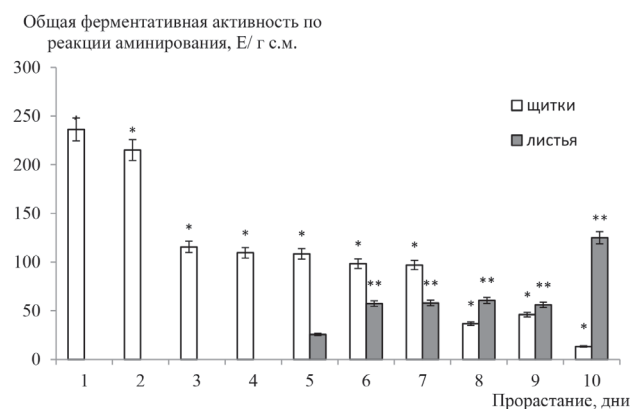


Рис. 1. Изменение общей ферментативной активности по реакции аминирования глутаматдегидрогеназы в листьях (серые столбцы) и щитках (белые столбцы) при прорастании кукурузы. Различия статистически значимы: *- ($p < 0.05$) в щитках по сравнению с первым днем прорастания семени; **- ($p < 0.05$) в листьях по сравнению с 5 днем

Анализ дезаминирующей активности ГДГ в щитках в процессе прорастания семени показал изменения еще с первого дня эксперимента: значения общей ферментативной активности фермента возросли более чем в 8 раз в сравнении с показателями, зарегистрированными в первые часы после набухания семян. Последующие дни также происходило увеличение активности глутаматдегидрогеназы до шестого дня прорастания. На седьмой день отмечалось постепенное снижение дезаминирующей активности энзима (Рис. 2).

По мнению ряда авторов, этиолированное растение – это структурно-функциональная модельная единица, способная реализовать возможную модель

развития различных физиологических ответных реакций [19]. В результате измерения активности ГДГ в условиях отсутствия света было установлено, что в первый день прорастания ферментативная активность в щитках была максимальной и составила 56 Е/г.с.м., однако дальнейшие результаты эксперимента показали уменьшение значений почти в 3 раза. Появление проростков, лишенных хлорофилла, отмечается на 5 день, и далее характеризуется снижением глутаматдегидрогеназной активности вследствие отсутствия фотосинтезирующей системы (Рис. 3).

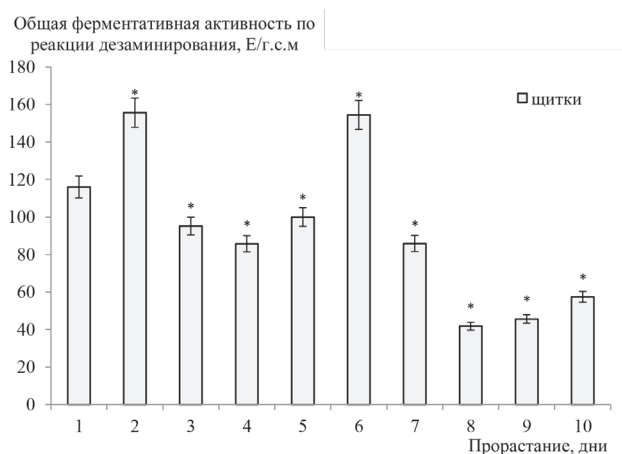


Рис. 2. Изменение общей ферментативной активности по реакции дезаминирования глутаматдегидрогеназы в щитках при прорастании кукурузы. Различия статистически значимы: *- ($p < 0.05$) в щитках по сравнению с первым днем прорастания семени

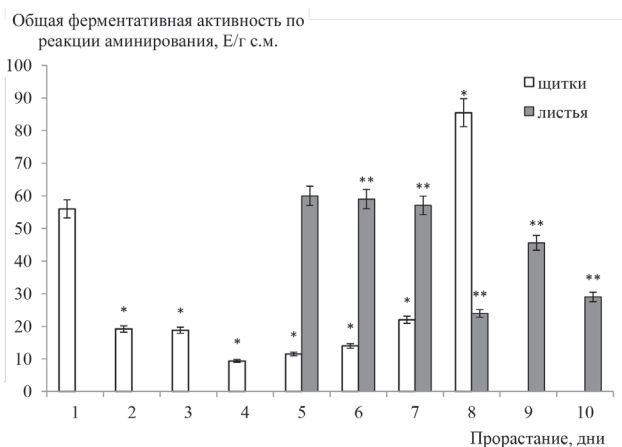


Рис. 3. Динамика общей ферментативная активность глутаматдегидрогеназы в листьях (серые столбцы) и щитках (белые столбцы) при прорастании кукурузы в условиях недостаточной освещенности. Различия статистически значимы: *- ($p < 0.05$) в щитках по сравнению с первым днем прорастания семени; ** - ($p < 0.05$) в листьях по сравнению с 5 днем

В результате анализа нуклеотидной последовательности промоторной области генов семейства *GDH* на наличие CpG-островков показал, что промотор гена *GDH1* не содержит ни одного CpG-островка, в то время как в составе промоторной области гена *GDH2* обнаружено два островка размером 404 и 383 п.н. (Рис.4). Анализ промоторной области гена *GDH1* на наличие сайтов CpNpG и CpNpN позволил установить, что исследуемый участок промотора размером 1000 п.н. содержит около 24.9% CpNpN- сайтов и 13.8% приходится на сайты CpNpG [17].

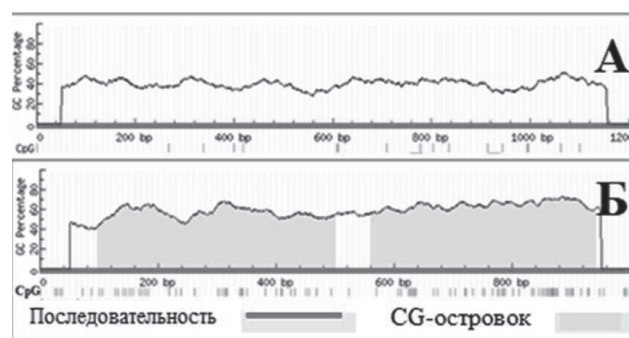


Рис. 4. Анализ промоторов генов *GDH1* (А) и *GDH2* (Б) *Zea mays* L. на наличие CpG-островков

Установлено, что в щитках в процессе прорастания семян транскрипционная активность гена *GDH1* с момента набухания семени и в последующие пять дней минимальна. Далее начиная на 6 дня эксперимента число транскриптов гена *GDH1* резко возрастает, что, вероятно, связано с появлением фотосинтезирующей системы (Рис. 5). Следует отметить, что наблюдаемые колебания метильного статуса проанализированных CpG- динуклеотидов, не были сопряжены с модуляциями уровня транскриптов данного гена. По видимому, изменения в степени метилирования носят фоновый характер и, как видно из полученных результатов, не вызывают увеличения/снижения транскрипционной активности гена *GDH1*.

В то же время, экспрессия гена *GDH2* глутаматдегидрогеназы также минимальна в период гетеротрофного прорастания семени. Появление проростка на 7 день прорастания характеризуется увеличением относительного уровня транскриптов исследуемого гена более чем в 13 раз относительно показаний отмеченных в первый день эксперимента (Рис. 6). При этом показано, что степень метилирования составляла 50% на протяжении всего времени эксперимента.

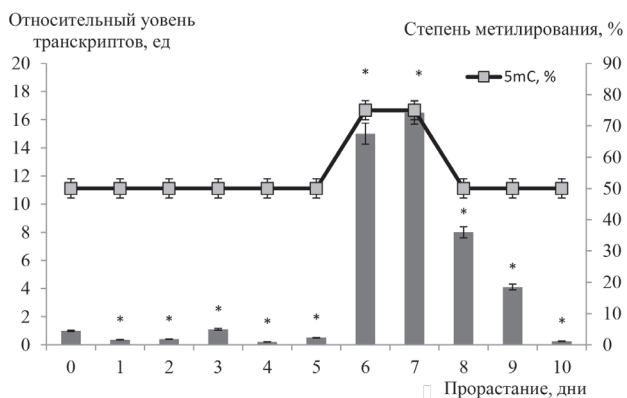


Рис 5. Динамика изменения относительно уровня транскриптов гена *GDH1* и степени метилирования CpG-динуклеотидов промотора в щитках кукурузы при прорастании. Различия статистически значимы: * - ($p < 0.05$) в щитках по сравнению с первым днем прорастания семени

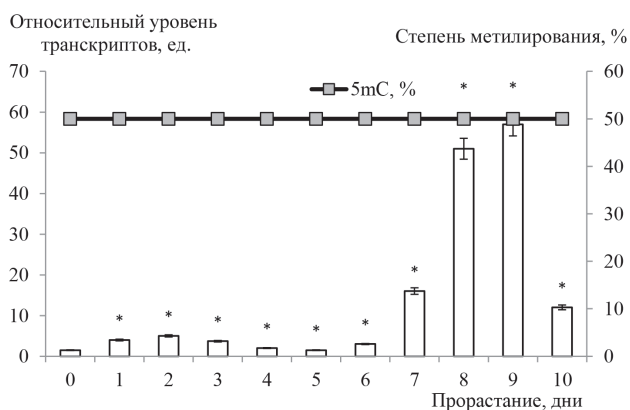


Рис 6. Динамика изменения относительного уровня транскриптов гена *GDH2* от степени метилирования его промотора в щитках кукурузы при прорастании. Различия статистически значимы: * - ($p < 0.05$) в щитках по сравнению с первым днем прорастания семени

Исследование транскрипционной активности генов глутаматдегидрогеназы в листьях при прорастании кукурузы показало, что на 5 день прорастания семян отмечалась максимальная экспрессия гена *GDH1*. Дальнейшие результаты эксперимента показали, что к 10 дню прорастания количество транскриптов гена *GDH1* снижается в 25 раз, постепенно приближаясь к нулю, что иллюстрирует потребность проростков в ГДГ как в поставщике глутамата для синтеза аминокислот (Рис.7). Интересно отметить, что относительный уровень транскриптов гена *GDH2*, наоборот, имеет восходящий характер (Рис.8). Максимальная концентрация мРНК исследуемого гена отмечается на 9 день прорастания листьев, что говорит

об увеличивающихся потребностях клетки в 2-оксоглутарате – субстрате для ЦТК. В результате проведенной МС-ПЦР выявлено, что динамика транскрипционной активности гена *GDH1* имеет прямую зависимость от метильного статуса нуклеотидов в составе его промоторной области. В 5 и 6 день степень метилирования составляла 50 %, однако в последующие дни она не превышала 25%. Изменения в степени метилирования CpG-динуклеотидов гена *GDH2* глутаматдегидрогеназы не наблюдалось (метилированы были 50 % исследуемых цитозинон).

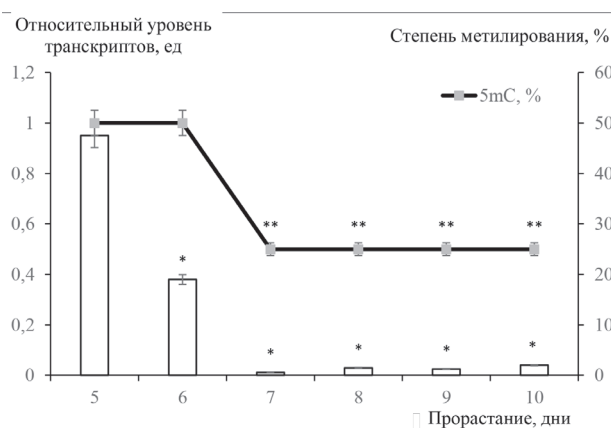


Рис. 7. Динамика изменения относительного уровня транскриптов гена *GDH1* и степени метилирования CpG-динуклеотидов промотора в проростках кукурузы при прорастании семян кукурузы. Различия статистически значимы: * - ($p < 0.05$) по сравнению с 5 днем прорастания семени; ** - ($p < 0.05$) по сравнению с 5 и 6 днем прорастания

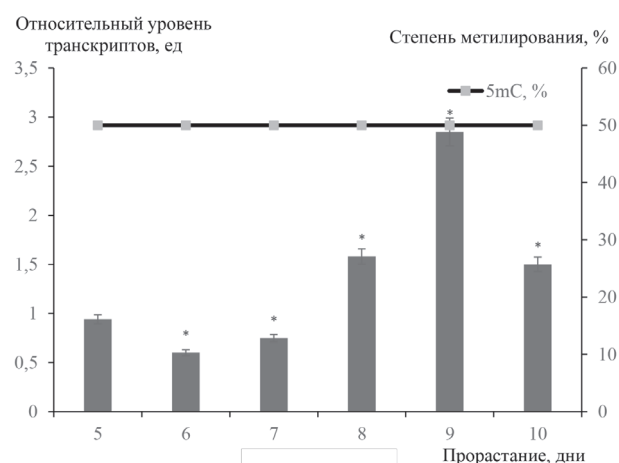


Рис. 8. Динамика изменения относительного уровня транскриптов гена *GDH2* от степени метилирования его промотора в проростках кукурузы при прорастании. Различия статистически значимы: * - ($p < 0.05$) по сравнению с 5 днем прорастания семени

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявленные изменения ферментативной активности глутаматдегидрогеназы в щитках семян кукурузы в течение первых дней прорастания и происходящие в этот период трансформации в транскрипционной активности генов *GDH1* и *GDH2* свидетельствуют о том, что, вероятно, ГДГ относится к ферментам, активирующимся сразу после набухания семян. Вероятно, высокая ферментативная активность ГДГ спустя сутки после набухания семян обусловлена наличием в семени неактивных форм ферментов ГДГ, которые постепенно активизируются после набухания семени, что говорит о важной роли ГДГ в развитии растительного организма.

Следует отметить, что для некоторых систем характерна активация в результате пост-трансляционной модификации без дополнительного процесса транскрипции (например, пероксидаза при прорастании семян кукурузы, пшеницы и риса) [20], в то время как другие энзимы нуждаются в активации работы соответствующих генов с последующим процессом транскрипции [21]. В последнем случае можно говорить о том, что белок синтезируется *de novo*, как, например, пероксидаза ячменя и пшеницы [22,23]. Активизация метаболических процессов при набухании и прорастании семян происходит по каскадному механизму. Семя еще до наступления момента набухания и последующего прорастания уже содержит набор ферментов, которые обеспечивают в первое время нормальное развитие растительного организма. Активация этого «минимального набора» происходит в момент набухания семени.

На ранних этапах развития, в связи с отсутствием фотосинтетической системы, ЦТК играет ключевую роль в обеспечении клетки энергией. Глутаматдегидрогеназа, вероятно, в данной ситуации выступает, в том числе, как поставщик 2-оксоглутарата в ЦТК, для дополнительного притока энергии. В последующие дни прорастания семян, с появлением фотосинтезирующей системы, функционирование ГДГ обеспечивается работой геномного аппарата, т.е. синтезом мРНК, что подтверждается результатами исследования относительного уровня транскриптов генов *GDH1* и *GDH2*.

Проведение МС-ПЦР позволило исследовать изменения степени метилирования отдельных CpG-динуклеотидов в составе промотора генов *GDH1* и *GDH2* в щитках и проростках кукурузы

при прорастании. Результаты исследования указывают на пассивную роль метилирования цитозинов, входящих в состав промоторов, как эпигенетического механизма в регуляции функционирования глутаматдегидрогеназы, поскольку метильный статус отдельных CpG-динуклеотидов в данной области не сопровождается изменением экспрессии этих генов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023-2025 годы, проект № FZGU-2023-0009.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Grabowska A., Nowicki M., Kwinta J. // Acta Physiol Plant. 2011. Vol. 33, pp. 1981-1990. DOI: 10.1007/s11738-011-0801-1
- Santero E., Hervás A.B., Canosa I., Govantes F. // InTech. 2012, pp. 289-318. DOI:10.5772/47767
- Епринцев А.Т., Анохина Г.Б. // Физиология растений. 2023. Т. 70. № 2. С. 192-201.
- Smith E.L., Austen B.M., Blumenthal K.M., Nyc J.F. // The Enzymes: Academic Press. 1975, pp. 293-367.
- Lehmann T., Ratajczak L. // J. Plant. Physiol. 2008. Vol.165. No .2, pp. 149-158. DOI:10.1016/j.jplph.2006.12.010
- Purnell M.P., Botella J.R. // Plant physiology. 2007. Vol.143. No. 1, pp. 530-539. DOI:10.1104/pp.106.091330
- Marchi L., Polverini E., Degola F., Baruffini E., Restivo F.M. // Plant Physiol Biochem. 2014. Vol. 83, pp. 225-231. DOI: 10.1016/j.plaphy.2014.08.003
- Епринцев А. Т., Анохина, Г. Б., Оя, П. С., Дедов, Я. И. // Прикладная биохимия и микробиология. 2021. Т. 57. №. 2. С. 163-171.
- Sarasketa A., Gonzalez-Moro M.B, Gonzalez-Murua C., Marino D // Front. Plant Sci. 2016. Vol. 7, pp. 1-12. DOI: 10.3389/fpls.2016.00029
- Yamaya T., Oaks A., Matumoto H. // Plant Physiology. 1984. Vol. 76, pp. 1009-1013.
- Анохина Г. Б., Оя П. С., Епринцев А. Т. // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2020. №. 3. С. 31-36
- Chomczynski P., Sacchi N. // Anal. Biochem. 1987. V. 162, pp. 156-159.
- Рябушкина Н.А., Омашева М.Е., Галиакпаров Н.Н. // Биотехнология. Теория и практика. 2012. №. 2. С. 9-26.
- Nicot N., Hausman J.F., Hoffmann L., Evers D. // J. Exp. Bot. 2005. V. 56, pp. 2907-2914.

15. Livak K.J., Schmittgen T.D. // *Methods*. 2001. Vol. 25, pp. 402-408. DOI:10.1006/meth.2001.1262
16. Hsieh C. L. // *Molecular and cellular biology*. 1999. Vol. 19. №. 1. pp. 46-56.
17. Епринцев, А. Т., Анохина Г.Б. // *Физиология растений*. 2023. Т. 70, № 2. С. 192-201. DOI 10.31857/S0015330322600425. – EDN GKJXTQ.
18. Лакин Г.Ф. *Биометрия*. М.: Высш. шк., 1990. 351 с.
19. Страпко А.М., Касаткин М.Ю., Степанов С.А. // *Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология*. 2016. Т. 16. С. 411-414.
20. Kruger J.E., La Berge D.E. // *Cereal Chem*. 1974. Vol. 51, pp. 578-585.
21. Майер А.И. *Метаболическая регуляция прорастания* // В кн.: *Физиология и биохимия покоя и прорастания семян*. М.: Колос. 1982. С. 397-424.
22. Anstine W., Jacobsen J.V., Scandalios J.G., Varner J.E. // *Plant Physiol. Lancaster*. 1970. Vol. 45, pp. 148-152.
23. Tao K.L., Khan A.A. // *Plant Physiology*, 1975. Vol. 56, pp. 797-800.

Воронежский государственный университет
Епринцев А. Т., доктор биологических наук,
профессор, заведующий кафедрой биохимии и физиологии клетки

E-mail: bc366@bio.vsu.ru

Анохина Г. Б., кандидат биологических наук,
ассистент кафедры биохимии и физиологии клетки

E-mail: dowi2009@mail.ru

Оя П.С., аспирант кафедры биохимии и физиологии клетки

Voronezh State University
Eprintsev A. T., PhD., DSci., Full Professor,
head of the Department of the Biochemistry and Cell Physiology

E-mail: bc366@bio.vsu.ru

Anokhina G. B., PhD., Assistant of the Department
of Biochemistry and Cell Physiology

E-mail: dowi2009@mail.ru

Oya P.S., Postgraduate student of the Department
of Biochemistry and Cell Physiology.

REGULATION OF THE FUNCTIONING OF GLUTAMATE DEHYDROGENASE IN GERMINATING CORN DURING THE TRANSITION FROM HETEROTROPHIC TO AUTOTROPHIC TYPE OF NUTRITION

P.S. Oya, G.B. Anokhina, A.T. Eprintsev

Voronezh State University

Abstract. Seed biology is attracting more and more attention from plant biologists. Seed germination is considered one of the earliest and most fundamental stages of plant life, so success in growth and harvest also depends on this stage. The formation of photosynthetic seedlings is also a crucial stage in the ontogenesis process of the plant organism, at the moment when the germinating heterotrophic "embryo" switches to autotrophic growth and development.

Molecular and biochemical mechanisms of regulation of glutamate dehydrogenase (GDH, EC 1.4.1.3) activity in maize (*Zea mays* L.) were studied during the transition from heterotrophic to autotrophic nutrition. During the study, the dynamics of glutamate dehydrogenase activity were examined in the scutellum and seedlings of maize during the first ten days of germination. It was found that the studied enzyme demonstrates maximum values of enzymatic activity in scutellum on the second day of seed germination. Changes in activity over ten days have a fluctuating character. It is shown that the appearance of the photosynthetic system and its further development leads to the fact that the role of glutamate dehydrogenase as a supplier of glutamate for the synthesis of amino acids is gradually decreasing. At the same time, this enzyme begins to act as a supplier of 2-oxoglutarate for the tricarboxylic acid cycle, which contributes to an increase in energy inflow. Using the Real-time PCR method, the transcriptional activity of genes encoding subunits of maize glutamate dehydrogenase was studied. The role of CpG-dinucleotide promoter methylation in the

regulation of the transcription of GDH1 and GDH2 genes during the transition of the plant organism from heterotrophy to autotrophy was revealed.

Keywords: *Zea mays* L., glutamate dehydrogenase, transcription, germination, methylation.

REFERENCES

1. Grabowska A., Nowicki M., Kwinta J. *Acta Physiol Plant.*, 2011, Vol. 33, pp. 1981-1990. DOI: 10.1007/s11738-011-0801-1
2. Santero E., Hervás A.B., Canosa I., Govantes F., *InTech.*, 2012, pp. 289-318. DOI:10.5772/47767
3. Eprintsev A.T., Anokhina G.B., *Plant Physiology*, 2023, V. 70, No. 2, pp. 192-201.
4. Smith E.L., Austen B.M., Blumenthal K.M., Nyc J.F., *The Enzymes: Academic Press*, 1975, pp. 293-367.
5. Lehmann T., Ratajczak L. J. *Plant. Physiol.*, 2008, Vol. 165, No. 2, pp. 149-158.
6. Purnell M.P., Botella J.R., *Plant physiology*, 2007, Vol. 143, No. 1, pp. 530-539.
7. Marchi L., Polverini E., Degola F., Baruffini E., Restivo F.M., *Plant Physiol Biochem.*, 2014, Vol. 83, pp. 225-231. DOI: 10.1016/j.plaphy.2014.08.003
8. Eprintsev A. T., Anokhina, G. B., Oya, P. S., Dedov, Ya. I., *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2021, V. 57, No. 2, pp. 163-171. DOI: 10.31857/S0555109921020021
9. Sarasketa A., Gonzalez-Moro M.B, Gonzalez-Murua C., Marino D. *Front. Plant Sci.*, 2016, Vol. 7, pp. 1-12. DOI: 10.3389/fpls.2016.00029
10. Yamaya T., Oaks A., Matumoto H., *Plant Physiology*, 1984, Vol. 76, pp. 1009-1013.
11. Anokhina G. B., Oya P. S., Eprintsev A. T., *Bulletin of the Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*, 2020, No. 3, pp. 31-36.
12. Chomczynski P., Sacchi N. *Anal. Biochem.*, 1987, V. 162, pp. 156-159.
13. Ryabushkina N.A., Omasheva M.E., Galiakparov N.N., *Biotechnology. Theory and practice*, 2012, No. 2, pp. 9-26.
14. Nicot N., Hausman J.F., Hoffmann L., Evers D. J. *Exp. Bot.*, 2005, V. 56, pp. 2907-2914.
15. Livak K.J., Schmittgen T.D. *Methods*, 2001, Vol. 25, pp. 402-408. DOI:10.1006/meth.2001.1262
16. Hsieh C. L. *Molecular and cellular biology*, 1999, Vol. 19, No. 1, pp. 46-56.
17. Eprintsev, A. T., Anokhina G. B. *Plant Physiology*, 2023, V. 70, No. 2, pp. 192-201. DOI 10.31857/S0015330322600425. – EDN GKJXTQ.
18. Lakin G.F. *Biometrics. M.: Higher. school*, 1990. 351 p.
19. Strapko A.M., Kasatkin M.Yu., Stepanov S.A. *Izv. Sarat. university New ser. Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2016, V. 16, pp. 411-414.
20. Kruger J.E., La Berge D.E. *Cereal Chem.*, 1974, Vol. 51, pp. 578-585.
21. Mayer A.I. *Metabolic regulation of germination // In the book: Physiology and biochemistry of seed dormancy and germination. M.: Kolos. 1982. S. 397-424.*
22. Anstine W., Jacobsen J.V., Scandalios J.G., Varner J.E. *Plant Physiol. Lancaster*, 1970, Vol. 45, pp. 148-152.
23. Tao K.L., Khan A.A. *Plant Physiology*, 1975, Vol. 56, pp. 797-800.