

**РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ПИРУВАТКАРБОКСИЛАЗЫ
В ЛИСТЬЯХ ЯЧМЕНЯ В УСЛОВИЯХ СОЛЕВОГО СТРЕССА****С. Д. Гомрани, В.О. Чуйкова, Д.Н. Федорин, А.Т. Епринцев***ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»*

Поступила в редакцию 12.10.2024 г.

Аннотация. Солевой стресс представляет собой фактор, оказывающий негативное влияние на сельскохозяйственные культуры. Увеличение засоленности почв приводит к снижению биологической продуктивности и урожайности в том числе за счет развития в растительном организме осмотического стресса и токсического действия катионов и анионов солей. Показателем развития NaCl-зависимого солевого стресса в клетках растений является индукция специфических транскрипционных факторов семейства NAC. Результаты исследования уровня транскриптов гена *HvNAC1* в клетках листьев ячменя при засолении показало, что по мере увеличения времени воздействия хлорида натрия на исследуемые растения наблюдалось увеличение содержания мРНК данного гена, что является маркером развития стрессового состояния.

Установлено, что солевой стресс при кратковременном влиянии оказывает стимулирующее влияние на активность пируваткарбоксилазы в листьях ячменя. Воздействие 150 мМ хлорида натрия приводит к увеличению скорости функционирования исследуемого фермента и максимальное значение каталитической активности показано после 6 часа эксперимента, что, вероятно, обусловлено интенсификацией энергетического и синтетического метаболизма клетки. При этом, каталитическая активность пируваткарбоксилазы до 3 часа практически не изменялась. Следовательно, активация метаболизма пирувата, в котором участвует данный изофермент, на способствует синтезу органических кислот, в частности оксалоацетата. Данный интермедиат клетки посредством реакций переаминирования используются для синтеза аминокислот и некоторых осмолитов. Результаты оценки содержания оксалоацетата в листьях ячменя в условия солевого стресса показали, что достоверные изменения в количестве оксалоацетата обнаруживаются на 3 час эксперимента. На 6 час воздействия солевого стресса количество оксалоацетата выросло в 3,26 раза, что соотносится с резким увеличением каталитической активности пируваткарбоксилазы в этот период. Формируемые биосинтетические субстраты необходимы клетке для осуществления приспособительных механизмов, с помощью которых растение противостоит воздействию неблагоприятного фактора, тесно связаны с синтезом протекторных веществ, обеспечивающих устойчивость в действия засоления.

Ключевые слова: *Hordeum vulgare*, пируваткарбоксилаза, солевой стресс, активность фермента, транскрипционный фактор

Засоление почвы является основным экологическим стрессом, который сильно снижает продуктивность сельскохозяйственных культур и качество урожая в мире и затрагивает значительные площади обрабатываемых земель более чем в 100 странах [1]. Высокие концентрации соли вызывают ионный дисбаланс, осмотический стресс и окислительные повреждения [2]. Осмотический стресс приводит к снижению поглощения воды, что, в свою очередь, подавляет рост клеток и

синтез клеточной стенки, проводимость устьиц, синтез белка, фотосинтетическую активность и развитие боковых почек. Соль также переносится от корней к листьям, что приводит к ионспецифическому стрессу и увеличению отмирания листьев с хлорозом и некрозом, а также к уменьшению активности основных клеточных метаболических путей, включая фотосинтез [3].

Понимание механизмов солеустойчивости является важным условием для улучшения урожая в районах, подверженных воздействию соли. Чтобы выжить в условиях стресса, растения реагируют

и адаптируются с помощью сложных механизмов координации метаболических процессов. Гликофитные растения в условиях солевого стресса демонстрируют замедленный рост, увядание и, в конечном итоге, гибель [4]. Ячмень (*Hordeum vulgare* L.) является наиболее солеустойчивым видом среди зерновых сельскохозяйственных культур [5, 6].

Было доказано, что ячмень имеет в своем составе такой фермент, как пируваткарбоксилаза (КФ 6.4.1.1). Это биотинсодержащий фермент, который катализирует карбоксилирование пирувата с образованием оксалоацетата. Пируваткарбоксилаза - аллостерический энзим, обнаруженный в митохондриях [7, 8]. Этот фермент является поставщиком одного из очень важных промежуточных продуктов ЦТК - оксалоацетата, а также участвует в первом этапе глюконеогенеза.

Эта очень важная реакция синтезирует оксалоацетат, выведенный из цикла трикарбоновых кислот для различных ключевых биохимических путей [9]. Данный метаболит при высоком энергетическом заряде превращается в глюкозу, при низком энергетическом заряде оксалоацетат восполняет цикл лимонной кислоты. Помимо этого, играет важную роль в регулировании функции митохондрий, глюконеогенезе, цикле мочевины и синтезе аминокислот [10]. В ответ на солевой стресс запускается повышенная активация вышеперечисленных биохимических механизмов, как один из механизмов адаптивной реакции клеточного метаболизма.

Целью данной работы являлось исследование воздействия засоления на изменение активности пируваткарбоксилазы в листьях ячменя.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектами в работе выступали 14-дневные листья ячменя (*Hordeum vulgare* L.). Применяли 12-часовой световой период с интенсивностью света 90 мкмоль квантов \cdot м⁻² \cdot с⁻¹. Выращивание растений осуществляли гидропонно при температуре окружающей среды 25°C.

Для развития солевого стресса экспериментальные растения инкубировали в 150 мМ растворе хлорида натрия. Анализируемые показатели определяли на 1, 3, 6, 12, 24 часа эксперимента. В качестве контрольной группы использовались растения, экспонируемые в воде.

Активность пируваткарбоксилазы измерялась спектрофотометрически при 412 нм, поглощающей комплексом DTNB и ацетил-СоА [11]. Реакционная смесь имела следующий состав: 100 мМ Трис-НСl буфер, pH 7,3, 25 мМ NaHCO₃, 5 мМ

MgCl₂, 3 мМ пируват натрия, 4 мМ АТФ, 1 мМ ацетил-СоА, 5 мМ биотин, 1 мМ DTNB.

Концентрация оксалоацетата определяли малатдегидрогеназной реакцией при 340 нм по окислению НАДН, что пропорционально присутствующему оксалоацетату в анализируемом образце.

Выделение суммарной РНК из растительных образцов осуществляли методом гуанидинтиоцианат-фенол-хлороформной экстракции. В качестве осадителя использовали LiCl [12]. Для получения кДНК проводили обратную транскрипцию с набором MMLV (Евроген, Россия) согласно рекомендациям производителя.

Оценку относительного уровня транскриптов гена *NAC* (LOC123395549) проводили методом количественной ПЦР. Для нормализации образцов использовался ген фактора элонгации *EF-1A* [13]. Параметры амплификации: первичная денатурация 95°C – 5 мин, затем цикл: 95°C – 20 с, 54-59°C – 30с, 72°C – 40 с, финальная элонгация – 72°C – 10 мин.

При помощи программного обеспечения Opticon Monitor™ Software (Bio-Rad, США) с применением 2^{-ΔΔCt}-метода были определены относительные уровни экспрессии [14].

Опыты проводили в 3-4-кратной повторности, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в трех повторностях. Результаты представлены в виде средних значений и стандартных отклонений (SD). Обсуждаются статистически значимые различия при P < 0.05 [15].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

У ячменя, как у многих растений, имеется группа факторов транскрипции *NAC*, которые представляют элементы контроля стресс-зависимых факторов клеточного ответа, в том числе и на засоление [16]. Увеличение экспрессии или индукция данного типа факторов является показателем развития стрессового состояния клетки. Результаты исследования уровня транскриптов гена *HvNAC1* в клетках листьев ячменя при засолении показали, что по мере увеличения времени воздействия хлорида натрия на изучаемые растения наблюдалось увеличение содержания мРНК данного гена (рис. 1). Активация гена солезависимого фактора *NAC* при засолении в листьях ячменя свидетельствует о развитии стрессового состояния клеточного метаболизма, вызванного воздействием 150 мМ хлорида натрия.

Измерение активности фермента пируваткарбоксилазы в условиях действия солевого стресса показало незначительное повышение величины

анализируемого показателя в первые 3 часа эксперимента (рис. 2). На шестой час экспозиции растений в растворе хлорида натрия выявлена резкая активация фермента. Величина каталитической активности составляла 2,82 Е/г сырой массы, что в 1,96 раза больше контрольных значений (0 часов). В дальнейшем время, эксперимента вплоть до 24 часов, активность пируваткарбоксилазы в листьях ячменя находилась выше контрольных значений.

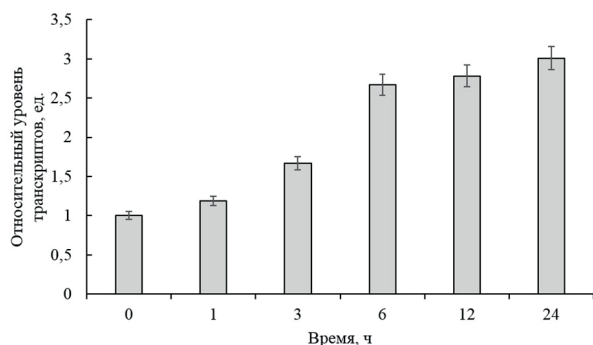


Рис. 1. Изменение содержания транскриптов гена *HvNAC1* в листьях ячменя в условиях солевого стресса.

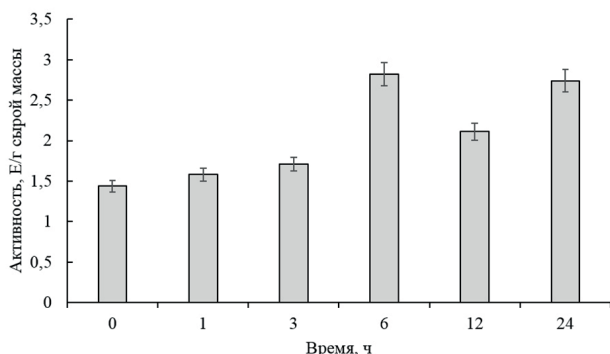


Рис. 2. Динамика активности пируваткарбоксилазы в условиях солевого стресса в листьях ячменя.

Результаты исследования показали, что воздействие на проростки ячменя 150мМ раствором хлорида натрия вызывает стимуляцию активности пируваткарбоксилазы, наиболее ярко это выражается на 24 час эксперимента.

Исходя из этого можно предположить, что в первые 3 часа под действием солевого стресса энзим незначительно реагирует на солевой стресс, затем, начиная с 6 часа, резко инактивируется. Наибольшая активность пируваткарбоксилазы наблюдалась на 24 час воздействия NaCl, что способствует реорганизации метаболизма клетки для обеспечения синтеза осмолитов и адаптации к солевому стрессу.

Результаты оценки содержания оксалоацетата в листьях ячменя в условиях солевого стресса представлены на рисунке 3. Показано, что достоверные изменения в количестве оксалоацетата обнаруживаются на 3 час эксперимента. На 6 час воздействия солевого стресса количество оксалоацетата выросло в 3,26 раза, что соотносится с резким увеличением каталитической активности пируваткарбоксилазы в этот период. На 12 и 24 час эксперимента концентрация анализируемого интермедиата клеточного метаболизма еще значительно увеличивается и достигает максимальных величин.

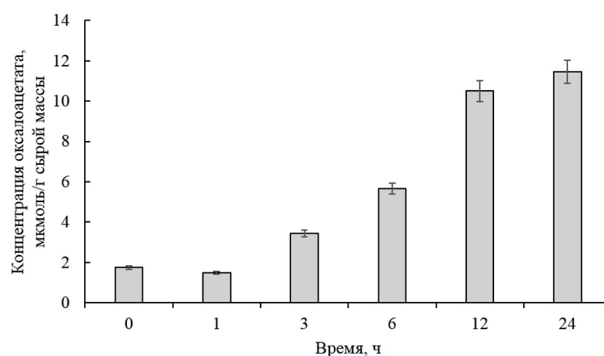


Рис. 3. Изменение содержания оксалоацетата в клетках листьев ячменя в условиях солевого стресса.

Синтез оксалоацетата в ходе пируваткарбоксилазной реакции способствует запуску важнейших биохимических путей, таких как цикл трикарбоновых кислот, глюконеогенез, синтез жирных кислот и аминокислот [10]. Ряд аминокислот представляют собой важные осмолиты, накопление которых в клетке способствует снижению дефицита воды при солевом стрессе [17, 18].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Определение изменения содержания транскриптов гена *HvNAC1*, кодирующего слезависимый транскрипционный фактор, в листьях ячменя при воздействии на растения 150 мМ хлорида натрия свидетельствует о развитии солевого стресса. В данных условиях наблюдались изменения каталитической активности пируваткарбоксилазы в течение всего эксперимента. Максимальный уровень показателя активности исследуемого энзима установлен на 24 час эксперимента. Наиболее существенные изменения величины каталитической активности пируваткарбоксилазы в экспериментальных растениях выявлены после 6 часов засоления, что может быть обусловлено реализацией стрессового сигнального пути, индуцируемого фактором NAC.

Активация пируваткарбоксилазы в условиях солевого стресса способствовала накоплению продукта реакции, катализируемой данной ферментной системой. На 24 час эксперимента показано более чем трех кратное увеличение количества оксалоацетата в клетках листьев ячменя. Данный результат можно объяснить изменением метаболизма органических кислот клеток, когда активация пируваткарбоксилазы способствует продукции оксалоацетата в условиях стресса. Увеличение уровня оксалоацетата, вызванное солевым стрессом, может быть связано с усилением трансаминирования в аспарат, который является предшественником синтеза аспарагина, лизина и метионина, количество которых также увеличивается при солевом стрессе [19, 20].

Таким образом, повышение активности пируваткарбоксилазы в листьях ячменя связано с перестройкой метаболических путей для поддержания энергетического статуса клетки и синтетических процессов, регуляция которой может осуществляться на генетическом уровне, в том числе факторами семейства NAC.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Rengasamy P. World salinization with emphasis on Australia / P. Rengasamy // *J. Exp. Bot.* – 2006. – Vol. 57. – P. 1017–1023.
2. Hossain M.S., Dietz K-J. Tuning of Redox Regulatory Mechanisms, Reactive Oxygen Species and Redox Homeostasis under Salinity Stress / M.S. Hossain, K-J. Dietz // *Front. Plant Sci.* – 2016. – Vol. 7, –P. 548.
3. Sairam R.K., Tyagi A. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants / R.K. Sairam, A. Tyagi // *Curr. Sci.* – 2004. – Vol. 86. – P. 407–421.
4. Nefissi Ouertani R. Effects of Salt Stress on Transcriptional and Physiological Responses in Barley Leaves with Contrasting Salt Tolerance / R. Nefissi Ouertani, D. Arasappan, T.A. Ruhlman, M. Ben Chikha, G. Abid, S. Mejri, A. Ghorbel, R.K. Jansen // *Int J Mol Sci.* – 2022. – Vol. 23, № 9, 5006.
5. Cuesta-Seijo J.A. In vitro Biochemical Characterization of All Barley Endosperm Starch Synthases / J.A. Cuesta-Seijo, M.M. Nielsen, C. Ruzanski, K. Kruciewicz, S.R. Beeren, M.G. Rydhal, Y. Yoshimura, A. Striebeck, M.S. Motawia, W.G.T. Willats, M.M. Palcic // *Front. Plant Sci.* – 2016. – Vol. 6, 1265.
6. Jitrapakdee S. Anaplerotic roles of pyruvate carboxylase in mammalian tissues / S. Jitrapakdee, A. Vidal-Puig, J.C. Wallace // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2006. – Vol. 63. – P. 843–854.
7. Yu L.P. A symmetrical tetramer for *S. aureus* pyruvate carboxylase in complex with coenzyme A / L.P. Yu, S. Xiang, G. Lasso, D. Gil, M. Valle, L. Tong // *Structure.* – 2009. – Vol. 17, № 6. – P. 823–832.
8. Jitrapakdee S. Structure, mechanism and regulation of pyruvate carboxylase / S. Jitrapakdee, M. St Maurice, I. Rayment, W.W. Cleland, J.C. Wallace, P.V. Attwood // *Biochem J.* – 2008. – Vol. 413, № 3. – P. 369–387.
9. Lopez-Alonso J.P. Author Correction: CryoEM structural exploration of catalytically active enzyme pyruvate carboxylase / J.P. Lopez-Alonso, M. Lazaro, D. Gil-Carton, P.H. Choi, A. Dodu, L. Tong, M. Valle // *Nat Commun.* – 2022. – Vol. 13, № 1, 7009.
10. Munns R. Mechanisms of salinity tolerance / R. Munns, M. Tester // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2008. – Vol. 59. – P. 651–681.
11. Yakunin A.F. Regulation of synthesis of pyruvate carboxylase in the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus* / A.F. Yakunin, P.C. Hallenbeck // *J Bacteriol.* – 1997. – Vol. 179, № 5. – P. 1460–1468.
12. Chomczynski P. Singlestep-method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction / P. Chomczynski, N. Sacchi // *Anal. Biochem.* – 1987. – Vol. 162. – P. 156–159.
13. Nicot N. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress / N. Nicot, J.F. Hausman, L. Hoffmann, D. Evers // *J. of Exp. Bot.* – 2005. – Vol. 56. – P. 2907–2914.
14. Livak K.J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ method / K.J. Livak, T.D. Schmittgen // *Methods.* – 2001. – Vol. 25. – P. 402–408.
15. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. - М.: Высш. шк., 1990. - 351с. // Lakin G.F. Biometriya. Moskva, Vysshaya shkola. 1990, 351 s.
16. Christiansen M.W. Characterization of barley (*Hordeum vulgare* L.) NAC transcription factors suggests conserved functions compared to both monocots and dicots / M.W. Christiansen, P.B. Holm, P.L. Gregersen // *BMC Res Notes.* – 2011. – Vol. 4, – P. 302.
17. Nahar K. “Roles of Osmolytes in plant adaptation to drought and salinity” in *Osmolytes and Plants Acclimation to Changing Environment: Emerging Omics Technologies.* eds. N. Iqbal, R. Nazar, and N.A. Khan. – 2016. – P. 37–68.
18. Niazian M. Betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) vs. Flavodoxin (Fld): two important genes

for enhancing plants stress tolerance and productivity / M. Niazian, S.A. Sadat-Noori, M. Tohidfar, S.M.M. Mortazavian, P. Sabbatini // Front. Plant Sci.- 2021. – Vol. 12, 695110.

19. Petrov V. ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants / V. Petrov,

J. Hille, B. Mueller-Roeber, T.S. Gechev // Front. Plant Sci. – 2015.- Vol. 6, 69.

20. Che-Othman M.H. Wheat mitochondrial respiration shifts from the tricarboxylic acid cycle to the GABA shunt under salt stress / M.H. Che-Othman, R.P. Jacoby, A.H. Millar, N.L. Taylor // New Phytol. – 2020. – Vol. 225. – P. 1166–1180.

*Воронежский государственный университет
Гомрани Саид Джамел-эддине, аспирант кафедры биохимии и физиологии клетки,*

*Voronezh State University
Ghomrani Said Djamel-eddine, Post-graduate student, Dept. of biochemistry and cell physiology*

*Чуйкова Виктория Олеговна, бакалавр кафедры биохимии и физиологии клетки,
E-mail: v.chuykova2020@mail.ru*

*Chuykova Vitoria O., Bachelor of the Department of Biochemistry and Cell Physiology
E-mail: v.chuykova2020@mail.ru*

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

*Fedorin Dmitry N., assistant professor of the Department of biochemistry and cell physiology,
E-mail: rybolov@mail.ru*

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

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

REGULATION OF PYRUVATE CARBOXYLASE ACTIVITY IN BARLEY LEAVES UNDER SALT STRESS

S.J. Ghomrani, V.O. Chuikova, D.N. Fedorin, A.T. Eprintsev

Voronezh State University

Abstract. Salt stress is a factor that has a negative impact on agricultural crops. Increased soil salinity leads to a decrease in biological productivity and crop yields, including due to the development of osmotic stress in the plant organism and the toxic effect of salt cations and anions. An indicator of the development of NaCl-dependent salt stress in plant cells is the induction of specific transcription factors of the NAC family. The results of a study of the level of HvNAC1 gene transcripts in barley leaf cells under salinity showed that as the time of exposure to sodium chloride on the studied plants increased, an increase in the mRNA content of this gene was observed, which is a marker for the development of a stress condition. It was found that salt stress with short-term exposure has a stimulating effect on the activity of pyruvate carboxylase in barley leaves. The effect of 150 mM sodium chloride leads to an increase in the rate of functioning of the studied enzyme and the maximum value of catalytic activity is shown after 6 hours of the experiment, which is probably due to the intensification of energy and synthetic metabolism of the cell. At the same time, the catalytic activity of pyruvate carboxylase up to 3 hours practically did not change. Consequently, activation of pyruvate metabolism, in which this isoenzyme participates, does not promote the synthesis of organic acids, in particular oxaloacetate. This intermediate of the cell is used for the synthesis of amino acids and some osmolytes by transamination reactions. The results of assessing the oxaloacetate content in barley leaves under salt stress conditions showed that reliable changes in the amount of oxaloacetate are detected at 3 hours of the experiment. At 6 hours of exposure to salt stress, the amount of oxaloacetate increased by 3.26 times, which correlates with a sharp increase in the catalytic activity of pyruvate carboxylase during this period. The formed biosynthetic substrates are necessary for the cell to implement adaptive mechanisms by which the plant resists the effects of an unfavorable factor, and are closely linked to the synthesis of protective substances that ensure resistance to the effects of salinity.

Keywords: *Hordeum vulgare*, pyruvate carboxylase, salt stress, enzyme activity, transcription factor