

ВНУТРИКЛЕТОЧНОЕ ПЕРЕРАСПРЕДЕЛЕНИЕ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ В ЛИСТЯХ КУКУРУЗЫ *ZEA MAYS L.* ПРИ СОЛЕВОМ СТРЕССЕ

З.Н. Шахов, П.П. Москвина, Г.Б. Анохина, А.Т. Епринцев

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 04.02.2025 г.

Аннотация. Солевой стресс - один из естественных факторов окружающей среды, негативно влияющий на продуктивность многих сельскохозяйственных культур. Увеличивающаяся тенденция пахотных земель к засолению требует исследования биохимической адаптации растений к токсическому воздействию ионов хлора и натрия, а также к возникающему впоследствии осмотическому и окислительному стрессу, который сопряжен с генерацией активных форм кислорода.

В ответ на солевой стресс происходит активация защитных механизмов, в частности, синтез осмопротекторов, таких как пролин, предшественником которого является глутамат. Также важную роль играет синтез γ -аминомасляной кислоты (ГАМК), что обусловлено активацией цитозольного фермента кальций/кальмодулин-зависимой глутаматдекарбоксилазы (КФ 4.1.1.15), который обеспечивает опосредованный запуск ГАМК-шунта, протекающего в митохондриях, для поддержания функционирования окислительного фосфорилирования и нейтрализации накапливающегося при окислительном стрессе интермедиата - янтарного полуальдегида.

Ранее нами были исследованы каталитическая активность и экспрессия генов ферментов анаплеротического пути цикла трикарбоновых кислот – ГАМК-шунта, который активируется при воздействии различных абиотических стрессов, в том числе при солевом стрессе. В рамках исследования мы проанализировали динамику изменения содержания кальция, который часто выполняет функцию вторичного посредника в передаче клеточного сигнала внутри клетки, в листьях кукурузы при засолении. Результаты исследования позволят нам углубить представления о первичном ответе метаболизма растений на повышение содержания хлорида натрия в среде и в дальнейшем разработать молекулярно-генетические методы для повышения устойчивости экономически важных сельскохозяйственных культур.

Установлено, что солевой стресс вызывает изменение содержания ионов кальция в листьях кукурузы, в том числе за счёт перераспределения кальция между митохондриальной и цитоплазматической фракциями. Выяснено, что на 6 час воздействия засоления на 2-недельные проростки кукурузы происходит значительный рост концентрации кальция в цитоплазме, тогда как уровень содержания ионов кальция в митохондриях изменяется незначительно на протяжении 24-часовой инкубации проростков кукурузы в солевом растворе.

Ключевые слова: солевой стресс, кальций, вторичный мессенджер, ГАМК-шунт.

При воздействии различных абиотических стрессов растительной клетке на первых этапах адаптации к изменяющимся условиям окружающей среды необходим резервный пул восстановленных эквивалентов для возможности осуществлять биосинтетические цитопротекторные реакции [1, 2]. Известно, что недостаток кислорода и засоление вызывают активацию ГАМК-шунта – адапционного метаболического пути, который активируется для поддержания непрерывной работы цикла

трикарбоновых кислот в связи с снижением активности 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса (КФ 1.2.1.105) при абиотических стрессах [3, 4]. ГАМК-шунт поддерживается работой 3 ферментов: глутаматдекарбоксилазой (ГДК, КФ 4.1.1.15), ГАМК-трансаминазой (ГАМК-Т, КФ 2.6.1.19), сукцинатсемальдегиддегидрогеназой (ССАДГ, КФ 1.2.1.24) [5].

Глутаматдекарбоксилаза является единственным ферментом ГАМК-шунта с цитозольной локализацией, что, предположительно, позволяет растительной клетке принять сигнал об абиотическом стрессе извне, благодаря наличию кальций-зависимой

мого кальмодулин-связывающего домена в молекуле белка [6, 7].

Известно, что дефицит кислорода и аноксия индуцируют повышение содержания ионов кальция в растениях, распространенной функцией которого является передача клеточного сигнала [8, 9]. Например, понижение содержания кислорода на 1/5 от нормального газового состава воздуха вызывает резкое изменение содержания кальция в цитозоле у *Arabidopsis thaliana*, что приводит к транскрипционным и метаболическим перестройкам для борьбы со стрессом [10]. Источником цитозольного кальция у кукурузы является внеклеточное пространство, куда при гипоксии поступает вторичный мессенджер, в ходе поглощения корнями [11].

При солевом стрессе у растений активируется экспрессия различных кальций-связывающих белков [12, 13]. У *Oryza sativa* имеется низкомолекулярный белок OsCCD1, локализованный в ядре и цитозоле, способный связывать кальций и активировать экспрессию генов, ассоциированных с устойчивостью к солевому и осмотическому стрессам [14].

Передача сигнала посредством кальций-кальмодулин зависимой системы помогает растению адаптировать свое развитие при неблагоприятных факторах окружающей среды [15]. Причем, пул кальция может высвобождаться как из вне-, так и внутриклеточного пространства (что индуцируется активацией фосфолипазы-С PLC1, которая гидролизует фосфатидилинозитолбисфосфат до инозитол-1, 4, 5-трифосфата, после следует высвобождение кальция из запасов внутри компарментов растительной клетки) [16].

Таким образом, целью нашего исследования являлось изучение динамики уровня кальция в листьях кукурузы и его перераспределение между цитоплазмой и митохондриями при солевом стрессе.

ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования являлись 14-дневные листья кукурузы (*Zea mays* L.) сорта «Воронежская 76», выращенные гидропонно в климатической камере («LabTech», Корея) при 10-часовом световом дне, с интенсивностью светового потока 25 Дж/(м²*с) при температуре 25°C.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Постановка эксперимента по созданию солевого стресса. Моделирование солевого стресса осуществляли, погружая проростки (без корневой системы) в раствор 0,15 М NaCl. Отбор опытных проб осуществляли через 1, 3, 6, 12 и 24 часа по-

сле начала инкубации. В качестве контроля выступали образцы, отобранные до начала эксперимента (0 часов). Контрольные и опытные проростки хранились при -80°C.

Получение общей клеточной фракции. Навеска зеленых листьев кукурузы была гомогенизирована путем механического измельчения с использованием керамических пестика и ступки. В качестве среды гомогенизации был использован 0,150 М калий-фосфатный буфер с pH 7,4 в соотношении 1:10. Гомогенат центрифугировали на центрифуге Eppendorf Centrifuge 5804 R (Eppendorf, Германия) для избавления от клеточных стенок в течение 3 минут при 5000 об/мин. Супернатант переносили в новый эппендорф и использовали для спектрофотометрического измерения концентрации кальция [17].

Выделение митохондрий. Навеску зеленых листьев кукурузы измельчали в среде, содержащей 0,4 М сахарозы, 4 мМ MgCl₂, 2,5 мМ ЭДТА, 1 мМ KCl, 0,15 М калий-фосфатный буфер (pH 7,4) и, используя керамические ступку и пестик (1:10). Гомогенат центрифугировали при температуре 4°C на центрифуге Eppendorf Centrifuge 5804 R (Eppendorf, Германия) в течение 3 минут при 5000 об/мин. Супернатант переносили в новую пробирку и центрифугировали при 12000 об/мин в течение 30 минут. После центрифугирования отбирали супернатант с цитоплазматической фракцией, а к осадку с митохондриями добавляли 0,15 М Tris-HCl буфер (pH 7,4) для их ресуспендирования [18]. Выделенные цитоплазматическая и митохондриальная фракции были использованы для определения концентрации кальция.

Определение концентрации ионов кальция. Определение концентрации кальция производилось колориметрическим методом. Общая реакционная смесь содержала 50 мМ буфера Tris-HCl (pH 6,0), 0,25 мМ арсеназо III, 100 мМ ацетата натрия. В холостые пробы добавляли 20 мкл деионизированной воды, в калибровочные – 20 мкл 2,5 мМ CaCO₃, в опытные – 20 мкл исследуемого образца. Оптическую плотность раствора измеряли при 613 нм на спектрофотометре Evolution 260 Bio (Thermo Fisher Scientific, США). Связывание магния реагентом арсеназо III исключалось проведением реакции в кислых условиях (pH 6,0). Расчет концентрации кальция на грамм сырой массы проводили по формуле:

$$C = (2,5 * (E_{\text{пробы}} / E_{\text{калибр.}})) / m_{\text{навеска}}$$

где, $E_{\text{пробы}}$ – изменение оптической плотности пробы при 613 нм, $E_{\text{калибр.}}$ – изменение оптической плотности калибратора при 613 нм, $m_{\text{навеска}}$ – масса навески зеленых листьев [19].

Статистическая обработка данных. Опыты были проведены в 3-кратных аналитических и биологических повторностях. Полученные данные проходили статистическую обработку программой STATISTICA 12,0. Критерий Стьюдента выступал в качестве оценки достоверности полученных результатов в связи с нормальным распределением данных. Представленные в работе различия статистически достоверны ($p < 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе исследования в зеленых листьях кукурузы (*Zea mays* L.) при воздействии солевого стресса были выявлены изменения в концентрации ионов кальция. Установлено, что инкубация проростков кукурузы в 150 мМ растворе хлорида натрия вызывает увеличение уровня свободного кальция в гомогенате уже на третий час эксперимента в 18,7 раз по сравнению с контролем и наблюдается дальнейшее увеличение концентрации кальция. Максимальное значение было зарегистрировано к 24 часу эксперимента и превышало первоначальные значения более чем в 21 раз (Рис. 1).

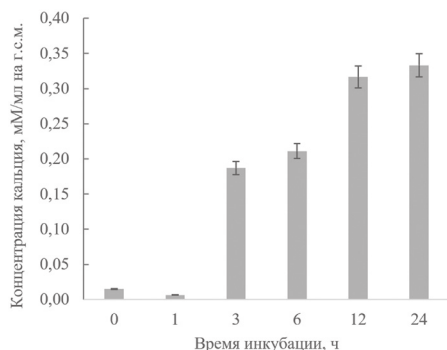


Рис. 1. Концентрация Ca^{2+} в гомогенате при солевом стрессе

Невысокие показатели концентрации кальция в первый час солевого воздействия обусловлены, вероятно, тем, что в этот период кальций в клетках листьев кукурузы находится в связанном состоянии [20]. Однако, солевой стресс приводит к активации механизмов, обеспечивающих высвобождение связанного кальция для, вероятно, участия в передаче клеточных сигналов.

При этом, интересно отметить, что воздействие солевого стресса на проростки кукурузы вызывает снижение концентрации кальция в цитоплазме с первого часа эксперимента, которая продолжает падать и в последующие часы. Начиная с 6 часа засоления наблюдается резкое увеличение концентрации Ca^{2+} в 2,4 раза, которое сохраняется на прежнем уровне вплоть до 24 часа солевого стресса (Рис. 2).

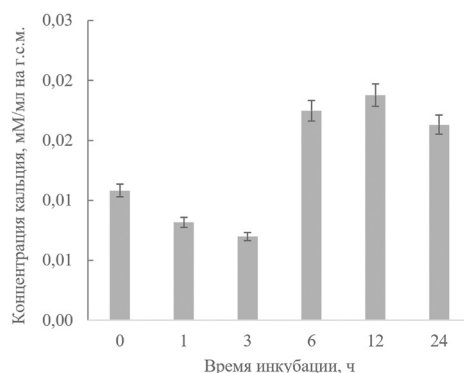


Рис. 2. Концентрация Ca^{2+} в цитоплазме при солевом стрессе

При этом, следует подчеркнуть, что содержание свободного кальция в митохондриях снижается после 1 часа засоления почти в 1,5 раза. К 3 часу засоления концентрация кальция в проростках кукурузы восстанавливается до первоначальных значений (Рис. 3).

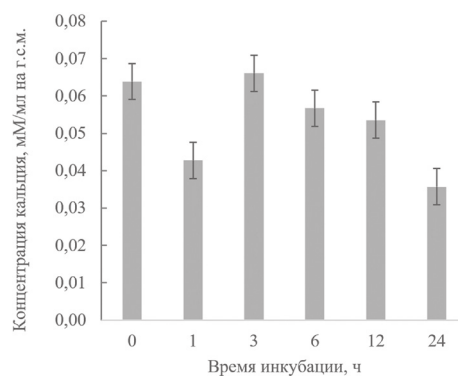


Рис. 3. Концентрация Ca^{2+} в митохондриях при солевом стрессе

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования показали, что при засолении происходит изменение концентрации кальция в листьях кукурузы. Воздействие солевого стресса на зеленые листья *Zea mays* L. приводит к повышению содержания ионов кальция в цитоплазме с 6 часа стрессового воздействия, вероятно, за счёт высвобождения связанного кальция из различных внутриклеточных комплексов.

В митохондриях уровень кальция изменяется незначительно, первично снижаясь на первый час эксперимента. Индуцированное хлоридом натрия увеличение свободного кальция на 3 час засоления сменяется незначительным постепенным спадом. Вероятно, повышение уровня кальция в цитоплазме, сопряженное с его переходом из связанного состояния в свободное, выступает в качестве сигнала о развитии стрессового воздействия в ответ на засоление. Повышенный уровень кальция в цитоплазме активи-

вирует кальций/кальмодулин-зависимую глутаматдекарбоксилазу, которая в свою очередь, превращает глутамат в ГАМК, который затем транспортируется в митохондрии [6]. Увеличение уровня ГАМК в митохондриях приводит к активации ГАМК-шунта, запуская реакцию стрессового ответа в митохондриях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Hashida S. The role of NAD biosynthesis in plant development and stress responses / Hashida S., Takahashi H., Uchimiya H. //Annals of botany. – 2009. – Vol. 103. – № 6. – P. 819-824.
2. Che-Othman M.H. Wheat mitochondrial respiration shifts from the tricarboxylic acid cycle to the GABA shunt under salt stress / Che-Othman M.H., Jacoby R.P., Millar A.H., Taylor N.L. //New Phytol. – 2020. – Vol. 225. – P. 1166–1180.
3. Haak D. C. et al. Multilevel regulation of abiotic stress responses in plants //Frontiers in plant science. – 2017. – Т. 8. – С. 1564.
4. Yuan D. GABA metabolism, transport and their roles and mechanisms in the regulation of abiotic stress (hypoxia, salt, drought) resistance in plants / Yuan D., et al. //Metabolites. – 2023. – Vol. 13. – № 3. – P. 347.
5. Michaeli S. et al. A mitochondrial GABA permease connects the GABA shunt and the TCA cycle, and is essential for normal carbon metabolism //The Plant Journal. – 2011. – Т. 67. – № 3. – С. 485-498.
6. Baum G. A plant glutamate decarboxylase containing a calmodulin binding domain. Cloning, sequence, and functional analysis / Baum G., et al. //Journal of Biological Chemistry. – 1993. – Vol. 268. – № 26. – P. 19610-19617.
7. Snedden W. A. et al. Calcium/calmodulin activation of soybean glutamate decarboxylase //Plant physiology. – 1995. – Т. 108. – № 2. – С. 543-549.
8. Subbaiah C. C. Elevation of cytosolic calcium precedes anoxic gene expression in maize suspension-cultured cells / Subbaiah C. C., Bush D. S., Sachs M. M. //The Plant Cell. – 1994. – Vol. 6. – № 12. – P. 1747-1762.
9. Bakshi A., Gilroy S. Calcium signaling in hypoxic response //Plant Physiology. – 2025. – Т. 197. – № 1. – С. kiae654.
10. Bakshi A. The vacuolar Ca²⁺ transporter CATION EXCHANGER 2 regulates cytosolic calcium homeostasis, hypoxic signaling, and response to flooding in Arabidopsis thaliana / Bakshi A., et al. //New Phytologist. – 2023. – Vol. 240. – № 5. – P. 1830-1847.
11. Subbaiah C. C. Involvement of intracellular calcium in anaerobic gene expression and survival of maize seedlings / Subbaiah C. C., Zhang J., Sachs M. M. //Plant Physiology. – 1994. – Vol. 105. – № 1. – P. 369-376.
12. Yang Z. et al. Calcium-activated 14-3-3 proteins as a molecular switch in salt stress tolerance //Nature Communications. – 2019. – Т. 10. – № 1. – С. 1199.
13. Wei S. et al. OsCaM1-1 Is Responsible for Salt Tolerance by Regulating Na⁺/K⁺ Homeostasis in Rice //Plant, Cell & Environment. – 2025. – Т. 48. – № 2. – С. 1393-1408.
14. Jing P. et al. OsCCD1, a novel small calcium-binding protein with one EF-hand motif, positively regulates osmotic and salt tolerance in rice //Plant Science. – 2016. – Т. 247. – С. 104-114.
15. Mahajan, S. Calcium- and salt-stress signaling in plants: Shedding light on SOS pathway / Mahajan, S., G. K. Pandey, and N. Tuteja. //Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2008. – Vol. 471. – P. 146-158.
16. White, P. J. Calcium in plants / White, P. J., and M. R. Broadley. //Annals of Botany. – 2003. – Vol. 92. – № 4. – P. 487-511.
17. Дедов Я. И., Анохина Г. Б., Епринцев А. Т. Выделение и очистка глутаматдегидрогеназы из зеленых листьев кукурузы Zea mays L. //Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов. – 2020. – Т. 22. – С. 46-52. // Dedov Ya. I., Anokhina G. B., Eprintsev A. T. Vydelenie i ochistka glutamatdegidrogenazy iz zelenykh list'ev kukuruzy Zea mays L. //Organizatsiya i regulyatsiya fiziologo-biokhimicheskikh protsessov. – 2020. – Vol. 22. – P. 46-52.
18. Шахов З. Н., Анохина Г.Б., Киеу Т.Х.Т. Изменение активности ГАМК-трансаминазы в листьях кукурузы (Zea mays L.) при солевом стрессе //Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов. – 2023. – Т. 25. – С. 329-333. // Shakhov Z. N., Anokhina G. B., Киеу Т.Х.Т. Izmenenie aktivnosti GAMK-transaminazy v list'yah kukuruzy (Zea mays L.) pri solevom stresse //Organizatsiya i regulyatsiya fiziologo-biokhimicheskikh protsessov. – 2023. – Vol. 25. – P. 329-333.
19. Attin T. Method to detect minimal amounts of calcium dissolved in acidic solutions / Becker K., Hannig C., Buchalla W., Hilgers R. //Caries research. – 2005. – Vol. 39. – № 5. – P. 432-436.
20. Yáñez M. Calcium binding proteins / Yáñez M., Gil-Longo J., Campos-Toimil M. //Calcium signaling. – 2012. – P. 461-482.

*Воронежский государственный университет
Шахов Захар Николаевич, Магистр кафедры
биохимии и физиологии клетки*

*Voronezh State University
Shakhov Zakhar N., Master of the Department of
Biochemistry and Cell Physiology*

*Москвина Полина Павловна, магистр кафе-
дры биохимии и физиологии клетки*

*Moskvina Polina P., Master of the Department of
Biochemistry and Cell Physiology*

*Анохина Галина Борисовна, кандидат биоло-
гических наук, старший преподаватель кафедры
биохимии и физиологии клетки, младший научный
сотрудник*

*Anokhina Galina B., PhD., Senior Lecturer at
the Department of Biochemistry and Cell Physiology,
Junior Research Fellow, 77,
E-mail: dowi2009@mail.ru*

E-mail: dowi2009@mail.ru

*Епринцев Александр Трофимович, доктор био-
логических наук, заведующий кафедрой биохимии
и физиологии клетки*

*Eprintsev Alexander T., PhD., DSci., Full
Professor, Head of the Biochemistry and Cell
Physiology Department,*

E-mail: bc366@bio.vsu.ru

E-mail: bc366@bio.vsu.ru

INTRACELLULAR REDISTRIBUTION OF CALCIUM IONS IN ZEA MAYS L. LEAVES UNDER SALT STRESS

Z.N. Shakhov, P.P. Moskvina, G.B. Anokhina, A.T. Eprintsev

Voronezh State University

Abstract. Salinity stress is a prominent environmental factor that adversely affects the productivity of numerous agricultural crops. The increasing salinization of arable land necessitates investigation into the biochemical adaptations of plants to the toxic effects of chloride and sodium ions, as well as the subsequent osmotic and oxidative stress, which is associated with the generation of reactive oxygen species (ROS).

In response to salinity stress, plants activate protective mechanisms, including the synthesis of osmoprotectants such as proline, which is derived from glutamate. The synthesis of γ -aminobutyric acid (GABA) also plays a crucial role, driven by the activation of the cytosolic calcium/calmodulin-dependent glutamate decarboxylase (GAD, EC 4.1.1.15). GAD facilitates the indirect engagement of the GABA shunt, which occurs in mitochondria, to maintain the functionality of oxidative phosphorylation and neutralize the succinic semialdehyde intermediate that accumulates under oxidative stress conditions.

Previously, we investigated the catalytic activity and gene expression of enzymes involved in the anaplerotic pathway of the tricarboxylic acid cycle – the GABA shunt, which is activated under various abiotic stresses, including salinity. In the present study, we analyzed the dynamics of calcium content alterations, a ubiquitous second messenger in intracellular signaling, in maize leaves under saline conditions. The findings will enhance our understanding of the primary metabolic responses of plants to elevated sodium chloride levels and facilitate the development of molecular-genetic approaches for improving the stress tolerance of economically important crops.

It was established that salinity stress induces alterations in calcium ion content in maize leaves, including the redistribution of calcium between the mitochondrial and cytoplasmic fractions. It was found that a significant increase in cytosolic calcium concentration occurs after 6 hours of salt exposure in two-week-old maize seedlings, whereas mitochondrial calcium levels remain relatively unchanged during a 24-hour incubation of maize seedlings in saline solution.

Keywords: salt stress, calcium, secondary messenger, GABA shunt.