

УДК 581.1; 634.8; 633.11

АКТИВНОСТЬ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ПРОРАСТАЮЩЕМ ЗЕРНЕ ТРИТИКАЛЕ

Л.В. ЧУМИКИНА¹, Л.И. АРАБОВА¹, В.В. КОЛПАКОВА², А.Ф. ТОПУНОВ¹

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук
119071 Москва, Ленинский просп., 33
e-mail: chumikina@mail.ru

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный университет пищевых производств»
125080 Москва, Волоколамское шоссе, 11

На ранних этапах прорастания зерна тритикале (0–72 ч) наблюдались три основных периода изменения активности фермента малатдегидрогеназы (МДГ): максимальная активность обнаружена в сухих зародышах и целом зерне, ко времени полного набухания зерна (6 ч) происходило быстрое снижение активности; далее следовало пятикратное снижение активности ко времени окончания лаг-фазы (24 ч, начало роста зародышевого корня), после чего наблюдалось незначительное снижение активности фермента до конца исследуемого периода (72 ч). Активность МДГ в сухом эндосперме была более чем в 3,5 раза ниже, чем в сухом зародыше и при набухании зерна плавно снижалась к 72 ч. Обнаружена зависимость активности МДГ от длительности набухания зерна и исследуемой его части.

Ключевые слова: *Triticosecale* Wittm. & A. Camus, зародыш, эндосперм, прорастание, малатдегидрогеназа.

Особенность метаболизма растительной клетки заключается в том, что в отличие от животных растения способны синтезировать большие запасы промежуточных метаболитов, которые играют важную роль в сопряжении метаболических процессов разных компартментов клетки. Одной из основных органических кислот, которую запасает большинство растений, является малат — субстрат малатдегидрогеназы (МДГ). В растительной клетке существует значительный пул малата, который может мобилизовываться для обеспечения метаболических потребностей. Известно, что малат в растительной клетке выполняет более 10 различных физиологических функций, непосредственно участвует в биосинтетических и дыхательных процессах [7]. Это свидетельствует об исключительно важной роли малатдегидрогеназной системы в регуляции растительного метаболизма, его адаптации к потребностям организма или к изменениям условий среды.

Наиболее изученным ферментом системы, участвующей в окислении малата, является НАД⁺-МДГ (КФ 1.1.1.37), катализирующая превращение малата в оксалоацетат (ОАА) и тем самым обеспечивающая энергетический обмен. Большое количество видов, у которых МДГ изучена и используется в экспериментах для описания и характеристики

различных процессов, свидетельствуют о высокой эффективности данного фермента как генетического и физиологического маркера [9].

Малатдегидрогеназа широко распространена в природе. Этот фермент встречается в клетках многих бактерий, а также в тканях всех животных и растительных организмов. Однако растительная малатдегидрогеназная система отличается полиморфизмом и мультифункциональностью, что связано с ее генезисом, субклеточной локализацией и активностью [13]. Кроме общих закономерностей, обуславливающих распределение МДГ в растительных тканях и связанных с особенностями метаболического обмена, характеристики этой ферментативной системы имеют видовую специфичность. Они определяют различия как в динамике активности МДГ в онтогенезе растений, так и в составе изоферментного спектра и локализации ее субклеточных форм.

Изменения в изоферментном спектре МДГ ряда растений (пшеница, кукуруза, клешевина, клевер) связаны либо с синтезом дополнительных молекулярных форм фермента, либо с их репрессией на начальных этапах развития организма [3, 7]. У некоторых растений возможна регуляция состава малатдегидрогеназной системы путем дифференциальной активации или инактивации отдельных молекулярных форм. Такое явление наблюдается при прорастании клешевины, клевера, арбуза. Это свидетельствует о динамичном характере равновесия между изоферментами малатдегидрогеназной системы клетки. Следовательно, генезис активности и изоферментный спектр МДГ внутри растительной клетки должны находиться под строгим контролем соответствующих механизмов регуляции метаболических процессов [4, 6]. Имеются свидетельства, что удельная активность МДГ в органах каждого растения определяется прежде всего его видовыми признаками, а не метаболическими особенностями [14].

Известно, что активность растительной малатдегидрогеназной системы зависит от функционального состояния, интенсивности роста и дифференциации тканей [7]. Однако в литературе отсутствуют данные о динамике активности МДГ на ранних этапах прорастания, когда семя из сухого состояния переходит в набухшее.

Целью данной работы было изучение изменения активности МДГ, катализирующей окисление яблочной кислоты (*L*-малата) до щавелевоуксусной (ОАА), в процессе прорастания зерна тритикале.

Методика

Объектом исследований служили семена тритикале (*Triticosecale* Wittm. & A. Samus) сорта Гермес отечественной селекции, созданного в Московском НИИ сельского хозяйства «Немчиновка» Россельхозакадемии. Семена хранились при 10–12 °С в течение года после сбора урожая. Для проведения анализа отбирали как целые зерна, так и зародыши и эндосперм, которые разделяли вручную. Одинаковые по размеру зерна проращивали при оптимальной температуре (21 °С) в термостате в течение 72 ч, пробы для анализа отбирали через 12, 18, 24, 48 и 72 ч [1].

Бесклеточный экстракт получали по схеме, описанной в работах [8, 11]. Содержание белка определяли по методу Бремхолла [10].

Активность МДГ регистрировали спектрофотометрически при длине волны 340 нм. Реакцию проводили при 25 °С в 0,1 М *трис*-НСI-буфере, рН 8,0. О скорости реакции, катализируемой МДГ, судили по возрастанию оптической плотности в результате восстановления НАД.

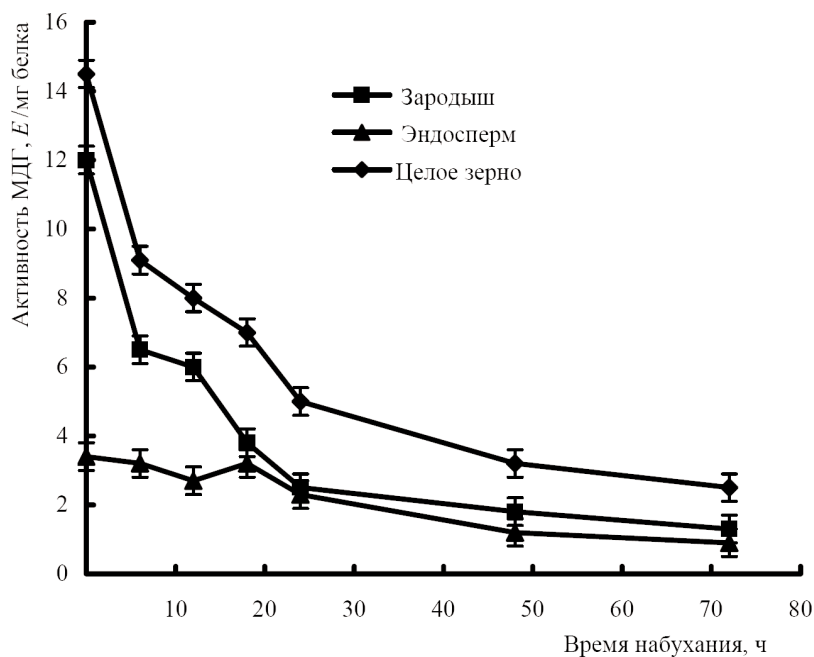
Реакционная смесь объемом 3 мл содержала 2 мМ НАД и 50 мМ *L*-малата [12]. В качестве единицы активности (*E*) принимали активность фермента, катализирующего восстановление 1 мкмоль кофермента (НАД) за 1 мин.

Все опыты проведены в трех повторностях, среднеквадратичные погрешности составили 5 %.

Результаты и обсуждение

Мы изучили активность МДГ из разных частей зерна тритикале. Тканевая и видовая специфичность изменения активности МДГ в органах растений в онтогенезе имеет не только количественные, но и качественные основы. Ткань каждого растения обладает специфичным, присущим только ей составом изоферментов. Это указывает на существование широкого белкового полиморфизма МДГ в растительных клетках, который определяется генетической информацией и проявляется в зависимости от метаболических потребностей организма, условий его развития. При этом наблюдается корреляция между интенсивностью метаболических процессов и ферментативным спектром МДГ в органах растений. Наибольшее число молекулярных форм МДГ выявлено в органах, где протекают интенсивные метаболические процессы. Максимальная активность фермента наблюдается в запасящих органах и молодых быстрорастущих тканях растений.

Сравнением динамики активности МДГ в разных частях зерна тритикале (зародыш, эндосперм, целое зерно) (рисунок) в онтогенезе выявлен ее сходный характер у целых семян и зародышей. Максимальная активность фермента наблюдалась в сухих зародышах — 12 *E*/мг белка и в сухом целом зерне — 14,5 *E*/мг белка. После завершения полного набухания семян (6 ч) активность МДГ в зародышах уменьшилась



Изменение активности малатдегидрогеназы в зародыше, эндосперме и целом зерне тритикале при прорастании

почти в 2 раза и составила 6,5 Е/мг белка, а в целом зерне — примерно на 40 %. После завершения лаг-фазы (24 ч) активность фермента в зародышах уменьшилась приблизительно в 5 раз по сравнению с исходной и при дальнейшем прорастании практически не изменялась. В сухом эндосперме зерна тритикале активность фермента была более чем в 3,5 раза ниже, чем в зародыше и плавно снижалась к 72 ч прорастания без четких перегибов.

Таким образом, сравнением динамики активности МДГ в разных частях зерна тритикале в онтогенезе выявлен ее сходный характер у целых семян и зародышей. По мере прорастания семян активность МДГ в них непрерывно падала со снижением интенсивности метаболических процессов, связанных с ростом и дифференциацией тканей.

Известно, что полное созревание семян и пребывание их в состоянии покоя не сопровождается деградацией клеточных структур. Переключение клеточной активности с программы эмбриогенеза на программу прорастания происходит не в ходе самого прорастания, а на поздних стадиях созревания семян. В роли переключателя, по-видимому, может выступать процесс дегидратации. Раннее прорастание семян обеспечивается клеточными структурами и ферментными системами, существующими в сухих семенах [2]. Это означает, что в созревающем семени образуются все компоненты, необходимые для прорастания зародыша. Отсюда следует, что МДГ накапливается в зародышевой части при созревании семени и интенсивно расходуется в процессе прорастания. В эндосперме активность фермента гораздо ниже, что можно объяснить низкой интенсивностью метаболических процессов. Зависимость активности растительной МДГ от функционального состояния, интенсивности роста и дифференциации тканей подтверждена экспериментальными данными, полученными при исследовании закономерностей развития сои [5], кукурузы [14].

На основании полученных результатов можно сделать заключение, что при набухании и на ранних стадиях прорастания зерна тритикале как активность ферментов обмена глутамина, так и активность МДГ сосредоточена главным образом в зародыше зерна. Удельная активность ферментов зависит от длительности набухания зерна и различается между его частями.

Выражаем благодарность кандидату биологических наук, старшему научному сотруднику А. В. Софьину за полезные советы при написании данной статьи.

1. Арапова Л.И., Чумикина Л.В., Топунов А.Ф. Действие теплового шока на прорастание и мобилизацию запасных белков зерна тритикале, ржи и пшеницы // Вестн. МичГАУ. — 2011. — № 2, ч. 1. — С. 81—87.
2. Гумилевская Н.А., Чумикина Л.В., Шатилов В.Р. Синтез белка и РНК в прорастающих семенах // Биохимия. — 1995. — 60, № 1. — С. 35—45.
3. Ережеев А. Изучение активности и изоферментного состава пероксидазы, малат- и глутаматдегидрогеназы в процессе развития пшеницы: Дис. ... канд. биол. наук. — Алма-Ата, 1984. — 132 с.
4. Землянухин А.А., Землянухин Л.А., Епринцев А.Т., Игамбердиев А.У. Глиоксилатный цикл растений. — Воронеж: 1986. — 131 с.
5. Келети Т. Основы ферментативной кинетики. — М.: 1990. — 350 с.
6. Кретович В.Л., Северная Т.А., Бутенко Р.Г. Характеристика МДГ и ГДГ культуры ткани табака // Докл. АН СССР. — 1969. — 188, № 3. — С. 89—92.
7. Пинейру де Карвалью М.А.А., Землянухин А.Т. Малатдегидрогеназа высших растений. — Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та, 1991. — 216 с.

8. Соловьева Н.А., Сидельникова Л.И., Шапошников Г.Л. и др. Активность ферментов, ответственных за метаболизм азота и углерода в прорастающих семенах пшеницы // Прикл. биохимия и микробиология. — 1998. — **34**, № 2. — С. 189—192.
9. Юдина Р.С. Генетика и феногенетика малатдегидрогеназы растений // Вестн. ВОГиС. — 2010. — **14**, № 2. — С. 243—254.
10. Bramhall S., Noack N., Wu M., Loewenberg J.R. A simple colorimetric method for determination of protein // Anal. Biochem. — 1969. — **31**, N 1—3. — P. 146—148.
11. Cabello P., Haba P., Maldonado J.M. Isoforms of glutamine synthetase in cotyledons, leaves and roots of sunflower plants // J. Plant Physiol. — 1991. — **137**, N 3. — P. 378—380.
12. Hayes M.K., Luethy M.H., Elthon T.E. Mitochondrial malate dehydrogenase from corn: purification of multiple forms // Plant Physiol. — 1991. — **97**, N 4. — P. 1381—1387.
13. Lance S.I., Rustin P. The central role of malate in plant metabolism // Physiol. Veg. — 1984. — **22**, N 5. — P. 625—641.
14. Yang Ning-Sun, Scandalios J.G. De novo synthesis and developmental control of the multiple gene-controlled malate dehydrogenase isoenzymes in maize scutella // Biochim. biophys. acta. — 1975. — **384**, N 2. — P. 114—119.

Получено 14.01.2013

АКТИВНІСТЬ МАЛАТДЕГІДРОГЕНАЗИ В ЗЕРНІ ТРИТИКАЛЕ, ЩО ПРОРОСТАЄ

Л.В. Чумикіна¹, Л.І. Арабова¹, В.В. Колпакова², О.Ф. Топунов¹

¹Інститут біохімії ім. О.М. Баха Російської академії наук, Москва

²Федеральний державний бюджетний освітній заклад вищої професійної освіти «Московський державний університет харчових виробництв»

На ранніх етапах проростання зерна тритикале (0—72 год) спостерігали три основні періоди зміни активності ферменту малатдегідрогенази (МДГ): максимальну активність виявлено у сухих зародках і цілому зерні, до часу повного набухання зерна (6 год) відбувалось швидке зниження активності; далі відмічено п'ятиразове зниження активності до часу закінчення лаг-фази (24 год, початок росту зародкового кореня), після чого спостерігалось незначне зниження активності ферменту до кінця досліджуваного періоду (72 год). Активність МДГ у сухому ендоспермі була більш як у 3,5 раза нижчою, ніж у сухому зародку й під час набухання зерна плавно знижувалась до 72 год. Виявлено залежність активності МДГ від тривалості набухання зерна та від досліджуваної його частини.

ACTIVITY OF THE MALATE DEHYDROGENASE IN GERMINATING TRITICALE GRAIN

L.V. Chumikina¹, L.I. Arabova¹, V.V. Kolpakova², A.F. Topunov¹

¹A.N. Bach Institute of Biochemistry Russian Academy of Sciences
33 Leninskii pr., Moscow, 119071, Russian Federation

²Moscow State University of Food Production
11 Volokolamskoye road, Moscow, 125080, Russian Federation

Three main period of malate dehydrogenase (MDH) activity changes were observed at the early stages of germination of triticale grain (0—72 h): the maximal activity observed in dry embryo and intact grain, then followed rapid decrease in activity at the time of full imbibition of grain (6 h); a five-fold decrease in activity towards the end of the lag-phase (24 h, when the embryo root starts to grow); slight decrease of enzyme activity until the end of the study period (72 h). MDH activity in the dry endosperm was more than 3.5 times lower than in dry embryo and gradually reduced to 72 hours during imbibition of grain. Thus it was revealed dependence of MDH activity on the time of grain imbibition and differences between it parts.

Key words: *Triticosecale* Wittm. & A. Camus, embryo, endosperm, germination, malate dehydrogenase.