

УДК 581.19:577.156

ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ И СОДЕРЖАНИЯ α -КЕТОКИСЛОТ В ЗЕРНОВКАХ КУКУРУЗЫ ПРИ ИХ ПРОРАСТАНИИ В УСЛОВИЯХ ВОДНОГО ДЕФИЦИТА

О.В. РЫЩАКОВА¹, О.О. МОЛОДЧЕНКОВА¹, С.А. ПЕТРОВ²

¹Селекционно-генетический институт — Национальный центр семеноведения и сортоизучения Национальной академии аграрных наук Украины

65036 Одесса, Овидиопольская дорога, 3

e-mail: olyaspring@rambler.ru

²Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова

65026 Одесса, ул. Дворянская, 2

Изучено влияние водного дефицита на активность изоцитратдегидрогеназы (КФ 1.1.1.42) — фермента цикла трикарбоновых кислот, содержание пировиноградной и 2-оксоглутаровой кислот в прорастающих зерновках контрастных по признаку засухоустойчивости линий кукурузы. Показано, что в тканях проростков устойчивой линии под действием водного дефицита активность фермента, а также содержание пирувата и 2-оксоглутарата повышались либо оставались на уровне контрольных значений, тогда как в тканях восприимчивой линии вышеуказанные показатели снижались относительно контрольного уровня.

Ключевые слова: *Zea mays* L., изоцитратдегидрогеназа, пируват, 2-оксоглутарат, водный дефицит.

Нарастающий водный дефицит (ВД) (засуха), возникающий вследствие длительного отсутствия осадков, нередко становится фактором, лимитирующим продуктивность сельскохозяйственных культур. Способность растений быстро адаптироваться к изменяющимся условиям среды, а также соответствие условий возделывания физиологическим потребностям растений являются основными предпосылками проявления потенциальной продуктивности. Изучение биохимических механизмов, лежащих в основе устойчивости, а также поиск маркеров устойчивости имеет большое теоретическое и практическое значение для селекции засухоустойчивых линий.

Поскольку цикл Кребса является связующим звеном многих метаболических путей, обеспечивая организм растения не только восстановленными коферментами, но и утилизируя и поставляя метаболиты, то вопросы, связанные с регуляцией его функционирования, вызывают интерес. Главным лимитирующим ферментом цикла трикарбоновых кислот считается изоцитратдегидрогеназа (ИДГ), особо интересующая многих исследователей [1, 5, 8, 9]. Согласно литературным данным [2, 5], ее активность напрямую зависит от содержания 2-оксоглутарата (2-ОГ), избыток которого приводит к ингибированию фермента конкурентно по отношению к изоцитрату. В этих источниках указано также, что пируват не оказывает влияния на данный фермент.

Целью нашей работы было сравнение активности НАДФ⁺-зависимой ИДГ и содержания двух кислот цикла — пировиноградной и 2-оксоглутаровой — в прорастающих зерновках линий кукурузы, контрастных по признаку засухоустойчивости, при водном дефиците и в нормальных условиях.

Методика

Исследования проводили на зерновках линий кукурузы (*Zea mays* L.), контрастных по признаку засухоустойчивости (устойчивая линия — Од329зМ, неустойчивая — См7SLзМ). Материал предоставлен отделом селекции и семеноводства кукурузы Селекционно-генетического института — Национального центра семеноведения и сортоизучения НААН Украины. Используемые в работе линии кукурузы классифицированы по признаку засухоустойчивости на основании испытаний в полевых условиях.

Опыты проводили с неповрежденными зерновками кукурузы в состоянии покоя и после их 12-часового набухания (условно 0 ч проращивания), которые в дальнейшем проращивали на фильтровальной бумаге в термостате при температуре 25 °С в чашках Петри ($d = 9$ см), по 20 зерен на чашку. Для создания ВД набухшие зерновки проращивали на фильтровальной бумаге, смоченной 10 мл 10 %-го ПЭГ-12000. Данная концентрация осмотически активного вещества используется для создания, согласно литературным данным, умеренного ВД [4, 10]. Зерновки контрольного варианта в течение эксперимента проращивали на фильтровальной бумаге, смоченной 10 мл дистиллированной воды. По окончании экспозиции отпрепарированные зерновки замораживали при -40 °С. Начиная с покоящегося зерна и до конца опыта зерно разделяли на две части: эндосперм и зародыш со щитком. Проклюнувшийся к 24—48 ч прорастания зародыш анализировали, не разделяя. Продолжительность хранения материала на протяжении эксперимента не превышала 1 мес. Повторность опыта трехкратная.

Активность ИДГ определяли спектрофотометрически при 340 нм по возрастанию оптической плотности в результате восстановления НАДФ⁺ в ходе реакции превращения изоцитрата в 2-оксоглутарат [5].

Для получения экстракта растительный материал гомогенизировали в ступке в среде выделения в соотношении 1 : 4 (0,5 г навески и 2 мл экстрагирующей среды). В качестве среды выделения применяли 22 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7,8), содержащий 1,5 мМ изоцитрат, 2 мМ $MnCl_2$. Смесь центрифугировали при 10 000 g в течение 10 мин. Экстракт использовали для дальнейшего определения активности фермента. Реакцию проводили в среде: 0,1 М *трис*-буфер (рН 7,8), содержащий 1,5 мМ изоцитрат, 2 мМ $MnCl_2$ и 1,5 мМ НАДФ⁺.

В качестве единицы ферментативной активности принимали количество фермента, образующее 1 нмоль продукта реакции за 1 мин при 25 °С. Содержание белка устанавливали по методу Лоури [11].

Для определения содержания пировиноградной и 2-оксоглутаровой кислот навеску растительного материала массой 1 г растирали в ступке с 2 мл дистиллированной воды, далее опыт проводили по стандартной методике [3]. Метод основан на том, что кетокислоты образуют с фенилгидразинами гидразоны, плохо растворимые в воде. Применяя избирательные растворители, такие как бензол и *n*-бутанол, и фотомет-

пируя гидразоны каждой кетокислоты при определенной длине волны, можно определить отдельно содержание пировиноградной и кетоглутаровой кислот.

Содержание кетокислот определяли в сыром веществе, однако в связи со спецификой опыта (изменение в ходе эксперимента обводненности тканей) параллельно измеряли содержание влаги в эндосперме и зародыше зерновок отдельно гравиметрическим методом.

Статистическую обработку данных проводили с использованием критерия Стьюдента [6]. На рисунках приведены среднеарифметические значения и их среднеквадратические погрешности ($M \pm m$).

Результаты и обсуждение

Определение засухоустойчивости растений основывается на изучении, с одной стороны, водного режима растений, с другой — изменения метаболитов клеток в период действия засухи. В ходе исследования определено влияние искусственно созданного ВД на обводненность тканей прорастающего зерна (табл. 1).

Концентрацию осмотического раствора 10 % ПЭГ-12000 применяли для создания условий умеренного ВД, поскольку, если действие стрессового фактора не достигает пороговых значений, могут возникать процессы, формирующие устойчивость организма (фаза адаптации). При превышении пороговых значений влияние стрессора приводит к повреждению организма и его гибели. Согласно полученным данным, обводненность тканей в ходе опыта постепенно снижалась относительно контроля. Обводненность тканей линий кукурузы как зародыша, так и эндосперма, достоверно уменьшалась лишь к 48 ч эксперимента. Можно предположить, что в первые часы опыта действие ВД не сказывалось на фоне высокого осмотического давления самого прорастающего зерна.

Анализ содержания пировиноградной кислоты — продукта окисления углеводов по гликолитическому пути, вступающего в дальнейшем в цикл трикарбоновых кислот [12] — показал (рис. 1), что в процессе прорастания зерновок содержание пирувата в зародыше к 2 ч снижалось в

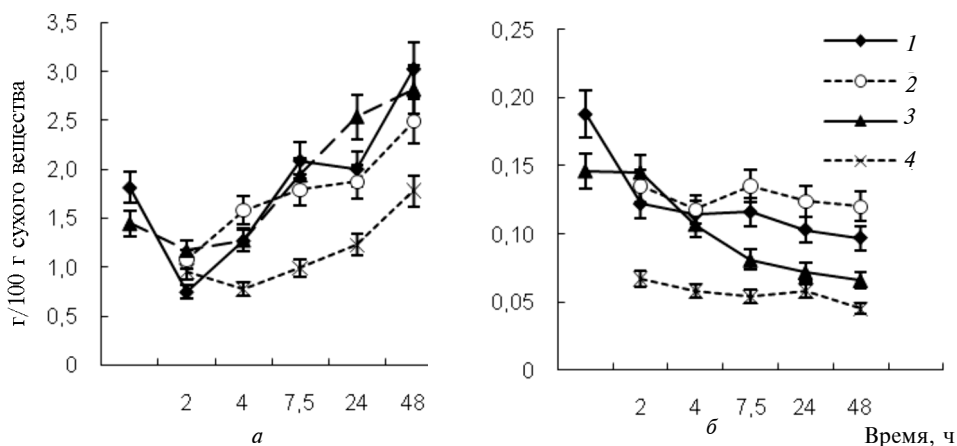


Рис. 1. Содержание пирувата в зерновках контрастных по признаку засухоустойчивости линий кукурузы при прорастании. Здесь и на рис. 3:

a — зародыш; *b* — эндосперм; 1 — контроль, устойчивая линия; 2 — водный дефицит, устойчивая линия; 3 — контроль, восприимчивая линия; 4 — водный дефицит, восприимчивая линия

ТАБЛИЦА 1. Содержание влаги в зерновках контрастных по признаку засухоустойчивости линий кукурузы при прорастании в условиях водного дефицита

Линия	Условия опыта	Содержание влаги, % исходного вещества									
		Покой		Время, ч							
		0	2	4	7,5	24	48				
Од329эм	Контроль	9,5±0,2	24,42±0,32	24,41±0,26	25,67±0,25	26,89±0,28	28,07±0,25	29,88±0,31			
	ВД			24,84±0,28	24,68±0,24	24,76±0,25	25,78±0,24*	26,43±0,30*			
См7SLэм	Контроль	10,9±0,2	25,81±0,30	26,74±0,26	26,68±0,25	27,51±0,25	29,54±0,26	32,04±0,32			
	ВД			26,06±0,24	26,15±0,25	26,40±0,25	26,81±0,26*	27,78±0,29*			
Од329эм	Контроль	14,4±0,2	45,92±0,30	48,25±0,35	49,28±0,33	52,76±0,35	58,82±0,36	76,46±0,35			
	ВД			47,95±0,33	48,43±0,34	49,77±0,34	56,27±0,36	69,42±0,36*			
См7SLэм	Контроль	12,8±0,2	47,67±0,29	49,39±0,34	50,44±0,35	51,21±0,35	62,63±0,36	78,51±0,39			
	ВД			48,52±0,35	49,2±0,36	50,69±0,36	56,71±0,35*	70,99±0,36*			

*Здесь и в табл. 2: достоверно по отношению к контролю, $p < 0,05$.

1,5—2 раза. Это, вероятно, связано с активацией ферментативных процессов и интенсивным включением в процессы обмена.

Далее в процессе прорастания содержание пирувата повышалось, тогда как в эндосперме оно было на порядок ниже уже в начале опыта и постепенно уменьшалось в процессе прорастания зерновок. По-видимому, это обусловлено интенсивным использованием запасов эндосперма и передвижением пировиноградной кислоты в зародыш. В условиях ВД наблюдали значительное (в 2 раза) снижение концентрации пирувата у восприимчивой линии, что на начальных этапах прорастания было более выражено в эндосперме (2—4 ч), затем проявлялось в зародыше (4—48 ч). В эндосперме устойчивой линии при прорастании зерновок в условиях ВД, содержание пировиноградной кислоты достоверно повышалось, начиная с 7,5 ч прорастания и до 48 ч в пределах 10 % контрольных значений.

Следует отметить, что, согласно полученным ранее данным [7], изменение активности гексокиназы в эндосперме в условиях ВД в целом коррелировало с изменением содержания пирувата в этой же части зерновки у обеих линий, что подтверждает наше предположение о снижении интенсивности гликолитического пути под влиянием стресса в тканях восприимчивой линии.

Активность ИДГ в зародышах оказалась на порядок выше по сравнению с ее активностью в эндосперме. Содержание белка (табл. 2) также было более высоким в зародышах. Удельная активность (в расчете на белок) изоцитратдегидрогеназы в первые часы прорастания была сосредоточена в эндосперме и в 3 раза превышала таковую в зародышах (рис. 2). К 7,5 ч она в 1,5 раза снижалась и продолжала уменьшаться, тогда как в зародыше постепенно нарастала, достигая максимума к 24 ч прорастания. Как уже предполагалось, это, вероятно, объясняется повышением интенсивности протекания основных метаболических процессов в зародыше и ее снижением в эндосперме. Данная закономерность наблюдалась у обеих линий.

В условиях ВД в эндосперме устойчивой линии зафиксировано достоверное повышение активности фермента на 25—30 % в период 7,5—24 ч прорастания относительно контроля. Этот показатель следует за повышением содержания пирувата в аналогичном варианте опыта (см. рис. 1, б) и коррелирует с повышением активности гексокиназы к 7,5 ч, согласно полученным ранее результатам [7]. В эндосперме восприимчивой линии под влиянием ВД активность ИДГ снижалась на протяжении всего опыта, что согласуется как с данными по пировиноградной кислоте, так и с полученными результатами по анализу активности гексокиназы и транскетолазы [7].

Анализ влияния ВД на активность ИДГ в зародышах исследуемых линий (см. рис. 2, в, г) показал значительное повышение активности фермента в тканях устойчивой линии в первые часы опыта (на 50—70 %). В дальнейшем ВД приводил к снижению активности фермента на 30 % к 24 ч опыта и восстановлению ее контрольного значения к 48 ч.

В тканях восприимчивой линии активность фермента первоначально также повышалась (на 20—40 %) к 2—4 ч прорастания в условиях ВД, после чего снижалась в 2 раза к 24—48 ч опыта.

Данные анализа содержания 2-ОГ — продукта реакции, катализируемой ИДГ (рис. 3), аналогично содержанию пирувата показали, что основная часть 2-ОГ приходится на долю зародышей, а в эндосперме об-

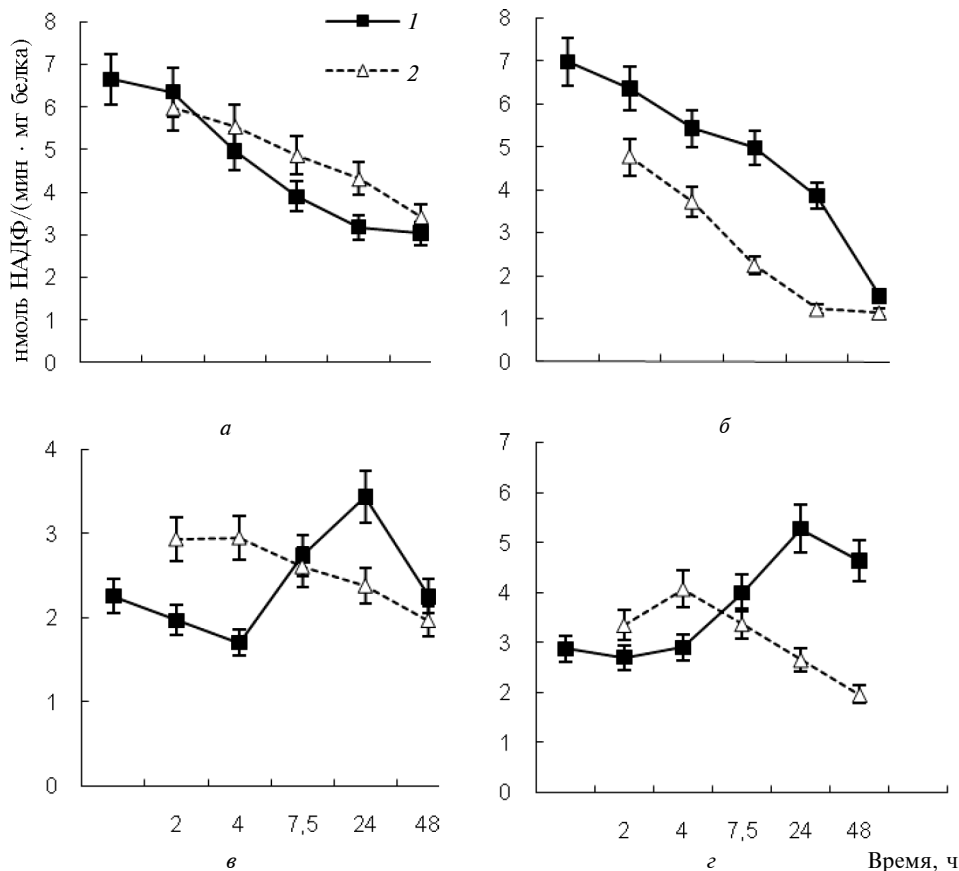


Рис. 2. Активность изоцитратдегидрогеназы в эндосперме (а, б) и зародышах (в, г) контрастных по признаку засухоустойчивости линий кукурузы при прорастании:

а, в — устойчивая линия; б, г — восприимчивая линия; 1 — контроль; 2 — водный дефицит

наружены практически следы 2-ОГ. При этом следует отметить, что в процессе прорастания зародышей у обеих линий содержание пировиноградной кислоты было значительно выше (до 3 г/100 г сухого ве-

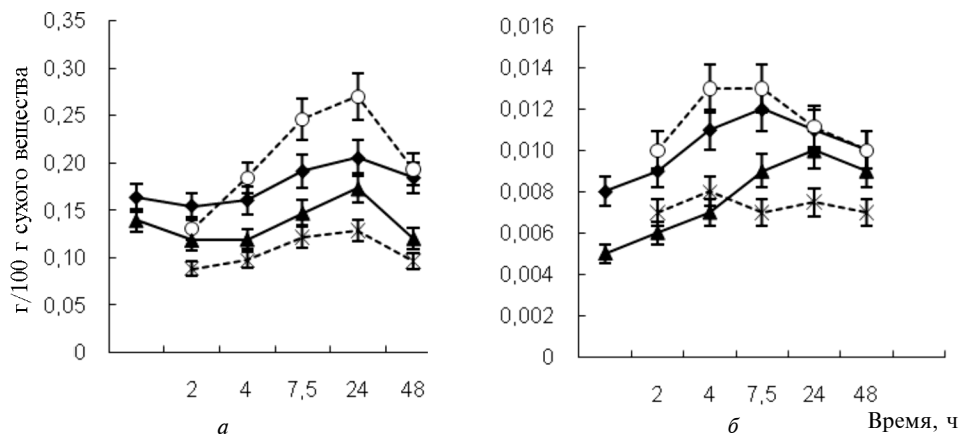


Рис. 3. Содержание 2-оксоглутарата в зерновках контрастных по признаку засухоустойчивости линий кукурузы при прорастании

ТАБЛИЦА 2. Содержание белка в зерновках контрастных по признаку засухоустойчивости линий кукурузы при прорастании в условиях водного дефицита

Линия	Условия опыта	Содержание белка, мг/г сырого вещества							
		Покой	Время, ч						
			0	2	4	7,5	24	48	
Од329зМ	Контроль	6,29±0,13	4,88±0,12	5,01±0,13	5,05±0,15	5,78±0,16	5,26±0,14	4,62±0,13	
	ВД			4,89±0,14	5,23±0,14	6,17±0,15	5,82±0,14	5,9±0,12*	
См7SLзМ	Контроль	7,19±0,15	6,12±0,11	6,16±0,12	6,26±0,14	6,52±0,16	6,72±0,13	5,48±0,11	
	ВД			6,02±0,12	7,1±0,12	7,44±0,15	6,8±0,14	6,78±0,12*	
Од329зМ	Контроль	207,3±5,2	56,1±1,6	98,5±2,2	109,8±2,5	112,7±2,6	64,5±1,8	55,7±1,9	
	ВД			91,9±2,1	106,1±2,3	100,2±2,3	90,4±2,2*	72,9±2,1*	
См7SLзМ	Контроль	193,1±4,8	66,4±1,8	106,1±2,4	115,0±2,5	107,9±2,3	60,8±1,9	49,1±1,6	
	ВД			84,2±1,9	88,7±2,1	94,6±1,8	57,5±2,0	48,4±1,7	

Эндосперм

Зародыш и шпигок

шества), чем 2-оксоглутаровой (0,1—0,2 г/100 г). Это предположительно объясняется, во-первых, гораздо большей (по сравнению с ПФП интенсивностью гликолиза, в результате которого образуется пируват, а во-вторых, тем, что 2-ОГ более активно участвует в обменных процессах и превращениях.

Под действием ВД в зародышах устойчивой линии вслед за повышением активности изоцитратдегидрогеназы через 2—4 ч (см. рис. 2, в, г) значительно возросло содержание 2-ОГ, начиная с 4 ч прорастания (на 10 % контроля) и до 24 ч (на 30 % контроля) с последующим его снижением к 48 ч опыта до контрольного значения. В тканях восприимчивой линии обнаружено достоверное снижение содержания 2-ОГ в эндосперме с 7,5 и до 48 ч (на 20 % контроля) и стабильно пониженное его содержание в зародыше с достоверным снижением до 72 % контрольного значения к 24 ч.

Таким образом, доказано, что у устойчивой к засухе линии кукурузы в условиях ВД интенсивность ЦТК (на основании изученных показателей) значительно повышалась и к концу эксперимента оставалась близкой к контрольному уровню, тогда как в зерновках неустойчивой к засухе линии кукурузы активность ИДГ в зародыше к 4 ч прорастания в условиях ВД повышалась незначительно с последующим достоверным и стабильным снижением изученных показателей ЦТК к концу опыта. В связи с этим можно предположить, что ИДГ и α -кетокислоты ЦТК представляют собой генетически детерминированные адаптивные показатели, зависят от устойчивости линии и времени действия стресса, а значит, могут быть диагностическими для семян, характер устойчивости которых необходимо определить.

1. Даффус К.М., Даффус Дж.Г. Углеводный обмен растений. — М.: Агропромиздат, 1987. — 176 с.
2. Епринцев А.Т., Попова В.Н. Ферментативная регуляция метаболизма ди- и трикарбоновых кислот в растениях. — Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та, 1999. — 192 с.
3. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П. и др. Методы биохимического исследования растений / Под ред. А.И. Ермакова. — Л.: Агропромиздат, 1987. — 430 с.
4. Ли М., Ван Г., Лин Ц. Кальций способствует адаптации культивируемых клеток солодки к водному стрессу, индуцированному полиэтиленгликолем // Физиология растений. — 2004. — 51, № 4. — С. 575—581.
5. Попова Т.Н., Землянухин Л.А., Епринцев А.Т. и др. Регуляция активности и каталитические свойства гомогенной изоцитратдегидрогеназы из гороха // Биохимия. — 1986. — 51, № 6. — С. 952—957.
6. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. — Минск: Высш. шк., 1967. — 326 с.
7. Тихонова О.В., Молодченкова О.О., Петров С.А. Активность гексокиназы и транскетолазы в зерне кукурузы при его прорастании в условиях водного дефицита // Вісн. Харків. ун-ту ім. В.Н. Каразіна. — 2007. — 5, № 768. — С. 182—186.
8. Cecilia A.M., David J.O. NAD⁺-linked isocitrate dehydrogenase: isolation, purification, and characterization of the protein from pea mitochondria // Plant Physiol. — 1992. — 100. — P. 69—75.
9. Francisco J.C., Juan B.B., Luisa M.S. Peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase. Characterization and activity regulation during natural senescence // Ibid. — 1999. — 121. — P. 921—928.
10. Handa A.K., Bressan R.A., Handa S. et al. Clonal variation for tolerance to polyethylene glycol-induced water stress in cultured tomato cells // Ibid. — 1983. — 72. — P. 645—653.
11. Lowry O.H., Rosenbrough N.I., Fan A.Z., Randol R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — 193. — P. 265—275.
12. Philippe G., Joshua L.H., Ute R.T. Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in arabidopsis cells // Plant Cell. — 2003. — 15. — P. 2140—2151.

Получено 10.07.2012

ВИВЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ІЗОЦИТРАТДЕГІДРОГЕНАЗИ ТА α -КЕТОКИСЛОТ У
ЗЕРНІВКАХ КУКУРУДЗИ ПРИ ЇХ ПРОРОСТАННІ В УМОВАХ ВОДНОГО
ДЕФІЦИТУ

О.В. Рищакова¹, О.О. Молодченкова¹, С.А. Петров²

¹Селекційно-генетичний інститут — Національний центр насіннезнавства та сортовивчення Національної академії аграрних наук України, Одеса

²Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова

Вивчено вплив водного дефіциту на активність ізоцитратдегідрогенази (КФ 1.1.1.42) — ферменту циклу трикарбонових кислот, вміст піровиноградної і 2-оксоглутарової кислот у проростаючих зернівках контрастних за ознакою посухостійкості ліній кукурудзи. Показано, що в тканинах проростків стійкої лінії за дії водного дефіциту активність ферменту, а також вміст пірувату і 2-оксоглутарату підвищувались або залишались на рівні контрольних значень, у той час як у тканинах чутливої лінії вищезазначені показники знижувались відносно контрольного рівня.

STUDY OF ISOCITRATE DEHYDROGENASE ACTIVITY AND THE CONTENT
OF α -KETO ACIDS IN GERMINATION SEEDS OF MAIZE IN THE CONDITIONS OF
WATER DEFICIT

O.V. Rischakova¹, O.O. Molodchenkova¹, S.A. Petrov²

¹Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivars Investigation, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine
3 Ovidiopol'ska road, Odesa, 65036, Ukraine

²I.I. Mechnikov Odesa National University
2 Dvoryanska St., Odesa, 65026, Ukraine

The influence of water deficit on activity of isocitrate dehydrogenase — enzyme of thricarbonic acid cycle and the content of α -keto acids in seeds of maize lines contrasting by the trait of drought-resistance has been studied. It is shown that in the tissues of germ of resistant line under the action of the water deficit activity of the enzyme, as well as the content of pyruvate and 2-oxoglutarate were risen or remained at the level of control values, whereas in the tissues of the susceptible line these indices decreased relative to the control level.

Key words: *Zea mays* L., isocitrate dehydrogenase, pyruvate, 2-oxoglutarate, water deficit.