

УДК 581.19:577.156

**ДЛЯ ВОДНОГО І ТЕПЛОВОГО СТРЕС-ФАКТОРІВ
НА АКТИВНІСТЬ ІЗОЦИТРАТДЕГІДРОГЕНАЗИ (НАДФ⁺)
ТА ВМІСТ α -КЕТОКИСЛОТ У ПРОРОСТКАХ КУКУРУДЗИ**

О. Рищакова¹, О. Молодченкова², С. Петров¹

¹*Селекційно-генетичний інститут – Національний центр
насіннезнавства та сортовивчення НААН
Овідіопольська дор., 3, Одеса 65036, Україна
e-mail: olyaspring@rambler.ru*

²*Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
вул. Дворянська, 2, Одеса 65026, Україна*

Вивчено вплив водного дефіциту й теплового шоку на активність НАДФ⁺ ізоцитратдегідрогенази (КФ.1.1.1.42) – ферменту, що каталізує реакцію окиснювального декарбоксілювання ізоцитрату в 2-оксоглутарат, а також вміст пірувату і 2-оксоглутарату в проростаючих зернівках контрастних за ознакою посухостійкості ліній кукурудзи (*Zea mays* L.). Показано, що активність ферменту і вміст кетокислот залежить від стійкості лінії та діючого чинника.

Ключові слова: *Zea mays* L., ізоцитратдегідрогеназа, піруват, 2-оксоглутарат, водний дефіцит, тепловий шок.

Різні сорти рослин, як правило, характеризуються неоднаковою чутливістю до несприятливих факторів середовища. Такі відмінності часто називають генетичною або сортовою специфічністю. З отриманих до теперішнього часу даних можна зробити висновок, що механізм, який забезпечує сортову специфічність рослин, інтегрує багато фізіологічних і біохімічних процесів, а це відбивається на метаболічних змінах рослин. Дослідження в цьому напрямку цікаві з точки зору виявлення біохімічних ознак високої посухостійкості, що відображають адаптивний метаболізм клітини і забезпечують можливість протистояти зневодненню. Зразки, що володіють такою властивістю, можуть бути використані як вихідний матеріал у селекції на посухостійкість.

Відомо, що стійкість до несприятливих факторів середовища забезпечується в більшості випадків зміною питомої активності або вмісту ферментів. Вивчення окремих шляхів метаболізму, які забезпечують перебудову обмінних процесів при зміні умов, дає можливість намітити підходи до виявлення природи посухостійкості рослин.

Згідно з літературними даними [4], в умовах осмотичного стресу відбувається інтенсифікація процесів дихання, що призводить до окиснення не тільки вуглеводів – головних субстратів процесу, але й фізіологічно важливих оксикислот, які, як відомо, також можуть слугувати субстратом для процесів дихання. Так, **піровиноградна та 2-оксоглутарова кислоти** (одні з основних кислот циклу трикарбонових кислот) беруть активну участь у процесах детоксикації рослини за допомогою системи кетокислоти↔дикарбонові амінокислоти. Автори розглядають надмірне накопичення цих кислот і їх знижений вміст як свідчення порушення циклу трикарбонових кислот, а також активації подальших окиснювальних процесів.

Останнім часом дедалі більше з'являється робіт, присвячених дослідженню різних дегідрогеназ – ферментів, безпосередньо пов'язаних із рівнем окиснювально-віднов-

ного потенціалу клітини. До числа таких ферментів належать і ізоцитратдегідрогеназа (КФ.1.1.1.42), фермент циклу трикарбонових кислот, що каталізує реакцію окиснювального декарбоксілювання ізоцитрат в α -кетоглутарат. Також, згідно з літературними даними, ізоцитратдегідрогеназа виконує ключову роль у захисних механізмах клітини від окиснювального стресу, викликаного екстремальними умовами навколишнього середовища [8-10]. У даних роботах захисна функція ізоцитратдегідрогенази розглянута у виробництві НАДФН у мітохондріях, де і відбувається вироблення активних форм кисню при стресі. НАДФН – незамінний донор електронів численних біосинтетичних і детокс-реакцій, а також необхідний компонент антиоксидантних захисних механізмів клітини.

У зв'язку з цим метою даної роботи було порівняння активності НАДФ⁺-залежної ізоцитратдегідрогенази, а також визначення вмісту пірвіноградної і 2-оксоглутарової кислот у тканинах проростків ліній кукурудзи, контрастних за ознакою посухостійкості в умовах водного дефіциту і теплового шоку.

Матеріали та методи

Дослідження проводили на тридобових проростках ліній кукурудзи (*Zea mays* L.), контрастних за ознакою посухостійкості (стійка лінія – Од329зМ, нестійка – См7SL 3М). У дослідах використовували неушкоджені зернівки кукурудзи, які пророщували на фільтрувальному папері в термостаті при температурі 25°C при відносній вологості повітря (ввп) 60%. Водний дефіцит (вд) створювали, розміщуючи проростки в камері з відносною вологістю повітря 35–40%. Тепловий шок (тш) створювали шляхом розміщення проростків у термостаті при 37°C. Тривалість дії стресових факторів – 6 год. Рослини контрольного варіанта протягом досліду перебували в умовах оптимального зволоження при температурі 25°C. Після закінчення експозиції препаративні надземні частини проростків (нчп), ендосперм і корені заморозували при температурі –40°C.

Активність ізоцитратдегідрогенази (КФ.1.1.1.42) визначали спектрофотометрично при 340 нм за зростанням оптичної густини в результаті відновлення НАДФ⁺ під час реакції перетворення ізоцитрат у 2-оксоглутарат [3]. Отримання рослинного екстракту: матеріал гомогенізували у ступці в середовищі виділення в співвідношенні 1:4. Як середовище виділення використовували 22 мМ калій-фосфатний буфер, рН 7,8, що містив 1,5 мМ ізоцитрат, 2 мМ MnCl₂. Суміш центрифугували при 10 000 г протягом 10 хв. Надосадову рідину використовували для подальшого визначення активності ферменту. Реакцію проводили в середовищі: 0,1М трис-буфер, рН 7,8, що містив 1,5 мМ ізоцитрат, 2 мМ MnCl₂ і 1,5 мМ НАДФ⁺. За одиницю ферментативної активності приймали кількість ферменту, що утворює 1 нмоль продукту реакції за 1 хв при 25°C.

Вміст пірвіноградної та 2-оксоглутарової кислот визначали за стандартною методикою [2]. Метод заснований на тому, що кетокислоти утворюють із фенілгідразинном гідразони, важкорозчинні у воді. Використовуючи окремі розчинники, такі як бензол чи н-бутанол, і вимірюючи оптичну густину при визначеній для гідразону кожної кетокислоти довжині хвилі, можна визначити окрему кетокислоту.

Вміст білка визначали за методом Лоурі [11].

Статистичну обробку даних проводили з використанням критерію Стьюдента [5]. На рисунках наведені середні значення та їх похибки ($M \pm m$).

Результати і їхнє обговорення

Результати дослідження впливу водного і теплового стрес-факторів на вміст пірвіноградної та 2-оксоглутарової кислот і активність ізоцитратдегідрогенази представлені на рис. 1–3.

Аналіз вмісту пірвіноградної та 2-оксоглутарової кислот (рис. 1, 2) показав слідові кількості цих метаболітів у ендоспермі, що, ймовірно, пов'язано з відсутністю або незначним рівнем їх метаболізму у зазначеній частині проростка. Це припущення підтверджується результатами визначення активності ізоцитратдегідрогенази, згідно з якими дана активність була виявлена лише в надземній частині проростка і коренях. Слід зазначити, що вміст пірвіноградної кислоти значно перевищує вміст 2-оксоглутарової кислоти. Це, ймовірно, пояснюється, по-перше, набагато більшою інтенсивністю гліколізу порівняно з кислотним метаболізмом рослини, в тому числі і циклом трикарбонових кислот, по-друге, тим, що 2-оксоглутарат менш активно залучений в обмінних процесах і перетвореннях.

Дія водного дефіциту і його співдія з тепловим шоком призвела до достовірного зниження вмісту пірвіноградної кислоти у тканинах нчп і коренів нестійкої лінії на 30–40%. При тепловому шоку достовірних відмінностей у тканинах нестійкої лінії не виявлено. У тканинах стійкої лінії достовірних відмінностей виявлено не було, за винятком підвищення вмісту пірватату у тканинах коренів при тепловому шоку на 75% щодо контролю.

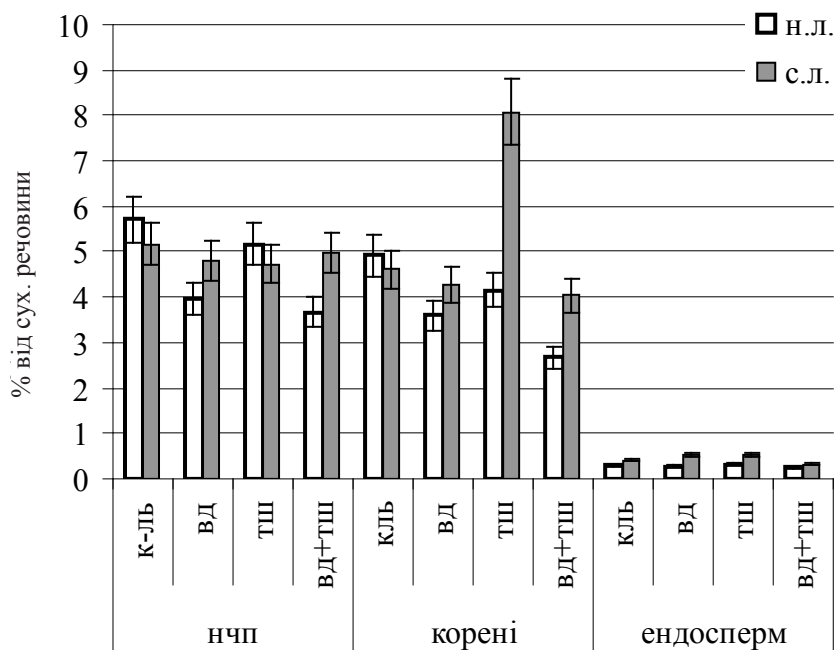


Рис. 1. Вміст пірвіноградної кислоти у 3-добових проростках ліній кукурудзи в умовах дії водного та теплового стрес-факторів упродовж 6 год: с.л. – стійка лінія Од329зМ, н.л. – нестійка лінія СМ7SLзМ, к-ль – контроль (t 25°C, ввп 60%), вд – водний дефіцит (t 25°C, ввп 35–40%), тш – тепловий шок (t 37°C, ввп 60%).

Зміст 2-оксоглутарової кислоти (рис. 2) у тканинах нестійкої лінії достовірно знижувався на 30–35% в умовах співдії водного дефіциту й теплового шоку. Дія зазначених стресорів окремо не призвела до достовірних відхилень вмісту 2-оксоглутарової кислоти. Щодо стійкої лінії була отримана схожа з результатами по визначенню вмісту пірвіноградної кислоти закономірність: до достовірного підвищення вмісту 2-оксоглутарової кислоти призвела дія теплового шоку в коренях. В інших варіантах дослідів достовірних відмінностей виявлено також не було.

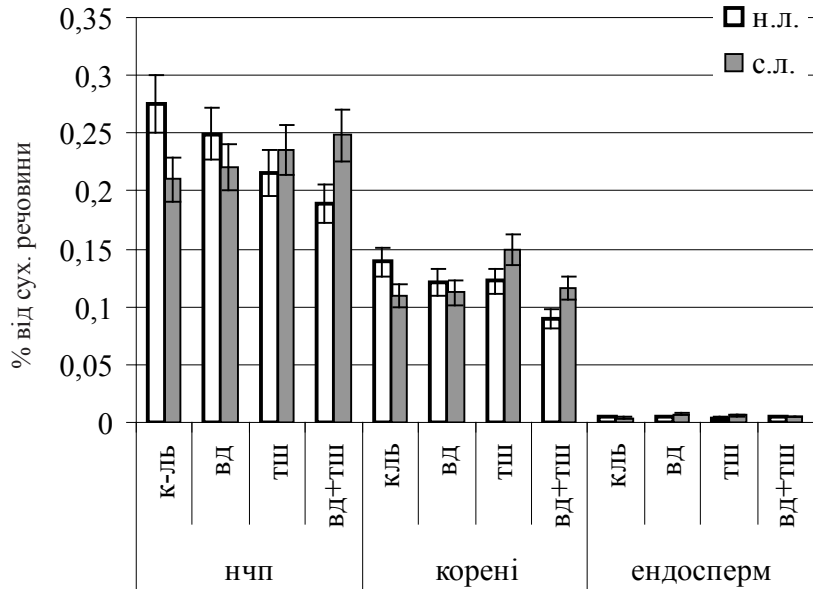


Рис. 2. Вміст 2-оксоглутарової кислоти в 3-добових проростках ліній кукурудзи в умовах дії водного і теплового стрес-факторів упродовж 6 год: с.л. – стійка лінія Од329зМ, н.л. – нестійка лінія См7SLзМ, к-ль – контроль (t 25°C, ввп 60%), вд – водний дефіцит (t 25°C, ввп 35–40%), тш – тепловий шок (t 37°C, ввп 60%).

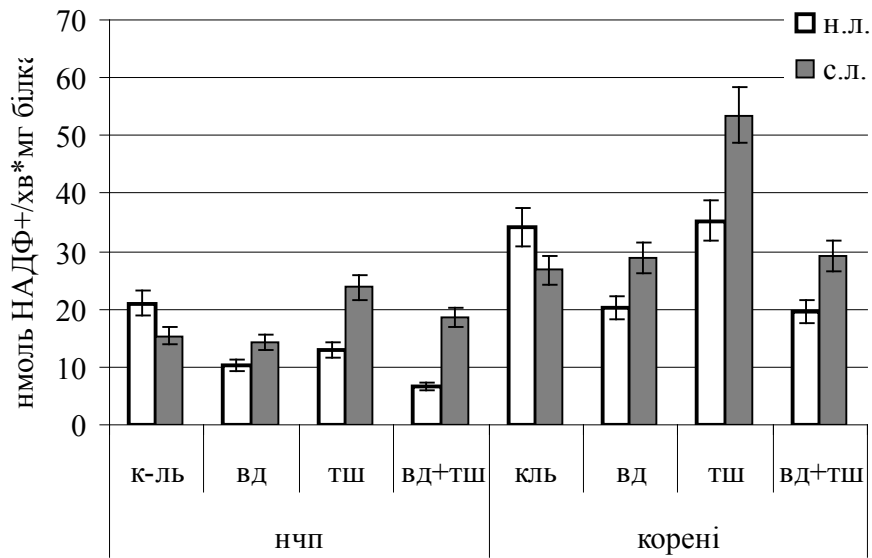


Рис. 3. Активність ізоцитратдегідрогенази в 3-добових проростках ліній кукурудзи в умовах дії водного та теплового стрес-факторів упродовж 6 год: с.л. – стійка лінія Од329зМ, н.л. – нестійка лінія См7SLзМ, к-ль – контроль (t 25°C, ввп 60%), вд – водний дефіцит (t 25°C, ввп 35–40%), тш – тепловий шок (t 37°C, ввп 60%).

Аналіз активності ізоцитратдегідрогенази показав, що дія водного дефіциту і спільна його дія з тепловим шоком призвела до достовірного зниження активності ферменту у тканинах надземної частини проростків (на 50 і 70% від контролю) і коренів (40 і 43% від контролю) нестійкої лінії. Так само було відзначено зниження активності при тепловому шоку в надземній частині проростків на 40%.

У тканинах стійкої лінії достовірні відмінності щодо контролю були виявлені лише в умовах теплового шоку, де активність ізоцитратдегідрогенази підвищувалася на 55% у надземній частині проростків і на 100% у коренях.

Показано, що у стійкої лінії визначені показники інтенсивності функціонування метаболізму трикарбонних кислот залишалися на контрольному рівні, що свідчить про відносну стабільність метаболізму стійкої до засухи лінії за дії водного дефіциту. Водночас у проростках нестійкої лінії відбувалося достовірне зниження показників функціонування циклу трикарбонних кислот. Отримані дані, ймовірно, свідчать про можливість тимчасової підтримки загального кислотного метаболізму рослин стійкої лінії, у тому числі й циклу трикарбонних кислот, в активному стані для збереження рівнів обмінних процесів в умовах дії стрес-фактора до можливої адаптації. Отже, встановлені особливості функціонування метаболізму трикарбонних кислот у проростках різних за посухостійкістю ліній кукурудзи можуть слугувати показником життєздатності й адаптації до несприятливих факторів середовища. Ці відмінності, мабуть, позначаються на рослинах і в період вегетації, обумовлюючи їх подальший ріст, розвиток і стійкість до посухи.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Даффус К., Даффус Дж.* Углеводный обмен растений / пер. с англ. и предисл. Э.Е. Хавкина. М.: Агропромиздат, 1987. С. 150.
2. *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., ил. С. 54–57.
3. *Попова Т. Н., Землянухин Л. А., Епринцев А. Т.* и др. Регуляция активности и каталитические свойства гомогенной изоцитратдегидрогеназы из гороха // Биохимия. 1986. Т. 51. № 6. С. 952–957.
4. *Приходько Л. С.* Обмен окси- и кетокислот у проростков гороха и кукурузы в условиях засоления субстрата // Физиология растений. 1986. Т. 15. № 5. С. 806–812.
5. *Рокицкий П. Ф.* Биологическая статистика. Минск: Вышш. школа, 1967. 326 с.
6. *Cecilia A. M., David J. O.* NAD⁺-Linked Isocitrate Dehydrogenase: Isolation, Purification, and Characterization of the Protein from Pea Mitochondria // Plant Physiol. 1992. Vol. 100. P. 69–75.
7. *Francisco J. C., Juan B. B., Luisa M. S.* Peroxisomal NADP-Dependent Isocitrate Dehydrogenase. Characterization and Activity Regulation during Natural Senescence // Plant Physiol. 1999. Vol. 121. P. 921–928.
8. *Jo S. H., Son M. K., Koh H. J.* Control of mitochondrial redox balance and cellular defence against oxidative damage by mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276. P. 16168–16176.
9. *Kim H. J., Kang B. S., Park J. W.* Cellular defence against heat shock-induced oxidative damage by mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase // Free Radic Res. 2005. Vol. 39. P. 441–448.
10. *Kim S. Y., Park J. W.* Cellular defence against singlet oxygen-induced oxidative damage by cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase // Free Radic Res. 2003. Vol. 37. P. 309–316.

11. Lowry O. H., Rosenbrough N. I., Fan A. Z., Randol R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193. P. 265–275.

Стаття: надійшла до редакції 11.07.12

доопрацьована 27.09.12

прийнята до друку 08.10.12

ISOCITRATE DEHYDROGENASE(NADP⁺) ACTIVITY AND THE CONTENT OF α -KETO ACIDS IN GERMINATION SEEDS OF MAIZE IN THE CONDITIONS OF WATER AND HEAT STRESS-FACTORS

O. Rischakova¹, O. Molodchencova², S. Petrov¹

¹Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigation, National Academy of Agricultural Sciences
3, Ovidiopol'ska Road, Odessa 65036, Ukraine
e-mail: olyaspring@rambler.ru

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

The influence of water deficit and heat shock on activity of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase (EC 1.1.1.42) – enzyme that catalyzes the oxidative decarboxylation of isocitrate to 2-oxoglutarate, and the content and pyruvic and 2-oxoglutaric acids in seeds of maize lines (*Zea mays* L.) contrasting by the trait of drought-resistance has been studied. It was shown that enzyme activity, and the content of pyruvate and 2-oxoglutarate dependent on drought resistance lines and impacting factor.

Keywords: *Zea mays* L, isocitrate dehydrogenase, pyruvate, 2-oxoglutarate, water deficit, heat shock.

ДЕЙСТВИЕ ВОДНОГО И ТЕПЛООВОГО СТРЕСС-ФАКТОРОВ НА АКТИВНОСТЬ ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ (НАДФ⁺) И СОДЕРЖАНИЕ α -КЕТОКИСЛОТ В ПРОРОСТКАХ КУКУРУЗЫ

О. Рыщакова¹, О. Молодченкова², С. Петров¹

¹Селекционно-генетический институт – Национальный центр семеноведения и сортоизучения НААН
Овидиопольская дор., 3, Одесса 65036, Украина
e-mail: olyaspring@rambler.ru

²Одесский национальный университет имени И.И.Мечникова
ул. Дворянская, 2, Одесса 65026, Украина

Изучено влияние водного дефицита и теплового шока на активность НАДФ⁺ изоцитратдегидрогеназы (КФ.1.1.1.42) – фермента, катализирующего реакцию окислительного декарбоксилирования изоцитрата в 2-оксоглутарат, а также содержание пировиноградной и 2-оксоглутаровой кислот в прорастающих зерновках контрастных по признаку засухоустойчивости линий кукурузы (*Zea mays* L.). Показано, что активность фермента, а также содержание пирувата и 2-оксоглутарата зависит от устойчивости линии и воздействующего фактора.

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