

ВЛИЯНИЕ ЗАСОЛЕНИЯ НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ПИРУВАТКАРБОКСИЛАЗЫ В ЛИСТЬЯХ ЯЧМЕНЯ

Д.Н. Федорин¹, В.О. Чуйкова¹, А.Т. Епринцев¹

¹ Воронежский государственный университет, г. Воронеж, Россия

Аннотация. Засоление почв, вызванное урбанизацией, является одной из самых серьезных экологических проблем во многих частях мира. Защита с помощью растительности и озеленения является наиболее эффективным и осуществимым биологическим методом улучшения солончаковых земель. Для достижения этой цели необходимо выбирать и выводить сорта как декоративных, так и зерновых культур, устойчивых к солевому стрессу и обладающих высокой ценностью. Ячмень (*Hordeum vulgare* L.) является наиболее солеустойчивой культурой. В своем составе он содержит фермент-пируваткарбоксилазу, осуществляющий важнейшие биохимические процессы такие как: синтез оксалоацетата, участие в ЦТК, глюконеогенезе, синтезе аминокислот. Исследования показали, что воздействие 150 мМ хлорида натрия на клетки ячменя вызвало резкое повышение активности пируваткарбоксилазы после 6 часа эксперимента и, как следствие, увеличение концентрации оксалоацетата-важнейшего метаболита цикла трикарбоновых кислот.

Ключевые слова: ячмень, солевой стресс, пируваткарбоксилаза, оксалоацетат, урбанизация.

BIOCHEMICAL ADAPTATION OF BARLEY TO SALT STRESS CONDITIONS

D.N. Fedorin, V.O. Chuykova, A.T. Eprintsev

Voronezh State University, Voronezh, Russia

Abstract: Soilsalinization caused by urbanization is one of the most serious ecological problems in many parts of the world. Vegetation and landscaping protection is the most effective and feasible biological method for improving salt marsh lands. To achieve this goal, it is necessary to select and breed varieties of both ornamental and grain crops that are resistant to salt stress and have high value. Barley (*Hordeum vulgare* L.) is the most salt-tolerant crop. It contains an enzyme, pyruvate carboxylase, which performs important biochemical processes such as: oxaloacetate synthesis, participation in CTC, gluconeogenesis, and amino acid synthesis.

genesis, amino acid synthesis. Studies have shown that the effect of 150 mm of sodium chloride on barley cells caused a sharp increase in pyruvate carboxylase activity after 6 hours of the experiment and, as a result, an increase in the concentration of oxaloacetate, the most important metabolite of the tricarboxylic acid cycle.

Keywords: barley, salt stress, pyruvate carboxylase, oxaloacetate, urbanization.

Введение

По мере роста численности населения и увеличения уровня потребления естественные экосистемы вытесняются сельскохозяйственными, энергетическими и горнодобывающими объектами, а также населенными пунктами. Неэффективное управление земельными ресурсами в ходе увеличения населения приводит к повсеместной потере биологического разнообразия почв и отрицательно сказывается на системах производства продуктов питания во всем мире.

Урбанизация приводит к масштабным изменениям окружающей среды, одним из которых является засоление [2]. Засоление - это накопление солей (часто с преобладанием хлорида натрия (NaCl)) в почве и воде до уровня, который может оказать негативное воздействие на сельское хозяйство.

Например, это связано с попаданием в почвенный покров хлоридов кальция и натрия, которые входят в состав противоледных реагентов, используемых для посыпки тротуаров и дорог в зимний период года. Также хлориды могут попадать в почву с дренажными водами. Кроме того, в условиях города в почву может проникать кальций из различных обломков, кирпича, строительного мусора, цемента, которые имеют щелочную среду [1].

Засоление почвы оказывает неблагоприятное воздействие на растения несколькими способами. Наиболее важным из них является осмотический эффект, который ограничивает способность растений усваивать воду. Это приводит к увяданию, изменению окраски листьев, появлению некротических пятен, негативному влиянию на рост и вегетацию растения, а также к гибели не солеустойчивых видов, что способствует модификации состава флоры в целом.

Солёность является одним из важнейших неблагоприятных факторов, ограничивающих сельскохозяйственное производство. Выращивание злаковых, декоративных культур и цветов, устойчивых к соли, считается эффективным способом использования засоленных почв [3]. Солеустойчивость определяется как способность генотипа растения ограничивать вредное воздействие соли за счёт ослабления осмотического стресса, ионной токсичности и вызванного ими окислительного стресса, тем самым уменьшая потерю урожая [4].

Например, ячмень (*Hordeum vulgare* L.) является наиболее солеустойчивым видом среди зерновых сельскохозяйственных культур. Это четвертая по значимости культура в мире после риса, пшеницы и кукурузы. Традиционно ячмень использовался для соложения, пивоварения или в качестве корма для животных. В настоящее время данное растение вызывает огромный интерес с точки зрения биохимических процессов и компонентов, находящихся в нем [5].

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 фермент, обнаруженный в митохондриях [8]. Этот фермент является поставщиком одного из очень важных промежуточных продуктов ЦТК – оксалоацетата, участвует в первом этапе глюконеогенеза, играет важную роль в регулировании функции митохондрий, синтезе аминокислот. Ответ на солевой стресс запускается повышенной активацией вышеперечисленных биохимических механизмов [6].

Целью данной работы являлось изучение влияния засоления на функционирование пируваткарбоксилазы в листьях ячменя.

Материал и методы исследования.

В качестве объекта исследования активности пируваткарбоксилазы использовались 7-дневные проростки ячменя (*Hordeum vulgare* L.), выращенные гидропонным методом при 12-часовом световом дне с интенсивностью света 100 Вт/м² при температуре окружающей среды 25°C.

Постановка эксперимента по действию солевого стресса осуществлялась путём помещения растений из опытной группы в 150 мМ водный раствор хлорида натрия и отбор образцов осуществляли через 1, 3, 6, 12, 24 часа от начала эксперимента. В качестве контрольной группы использовались растения, помещённые в воду на 24 часа.

Активность пируваткарбоксилазы измерялась спектрофотометрическим методом при длине волны 412 нм и скорости образования комплекса DTNB+Ацетил-СоА в реакционной смеси, содержащей следующие компоненты: 100 мМ Tris-HCl буфер, pH 7,3, 25 мМ NaHCO₃, 5 мМ MgCl₂, 3 мМ ПируватNa, 4 мМ АТФ, 1 мМ Ацетил-СоА, 5 мМ биотин, 1 мМ DTNB [10].

Содержание белка в образцах определяли по методу Лоури [12].

Концентрация оксалоацетата определяется с помощью ферментного анализа по реакции окисления НАДН в ходе малатдегидрогеназной реакции при длине волны 340 нм, что пропорционально присутствующему оксалоацетату в анализируемом образце.

Опыты проводили в 3-4-кратной повторности, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в трех повторностях. Предварительная оценка характера распределения проводилась по асимметрии и эксцессу (Excel, Microsoft Office), а также с помощью критерия Колмогорова-Смирнова [11].

Результаты исследования и их обсуждение.

В первые 3 часа эксперимента активность пируваткарбоксилазы в условиях солевого стресса незначительно повышалась (рис. 1). На 6 час инкубации ячменя в 150 мМ растворе хлорида натрия активность фермента резко увеличилась. Величина активности фермента составляла 4,961 Е/ мг белка, что в 2,23 раза больше контроля (0 часов). На 24 ч эксперимента активность выросла в 1,89 раза относительно контрольной группы.

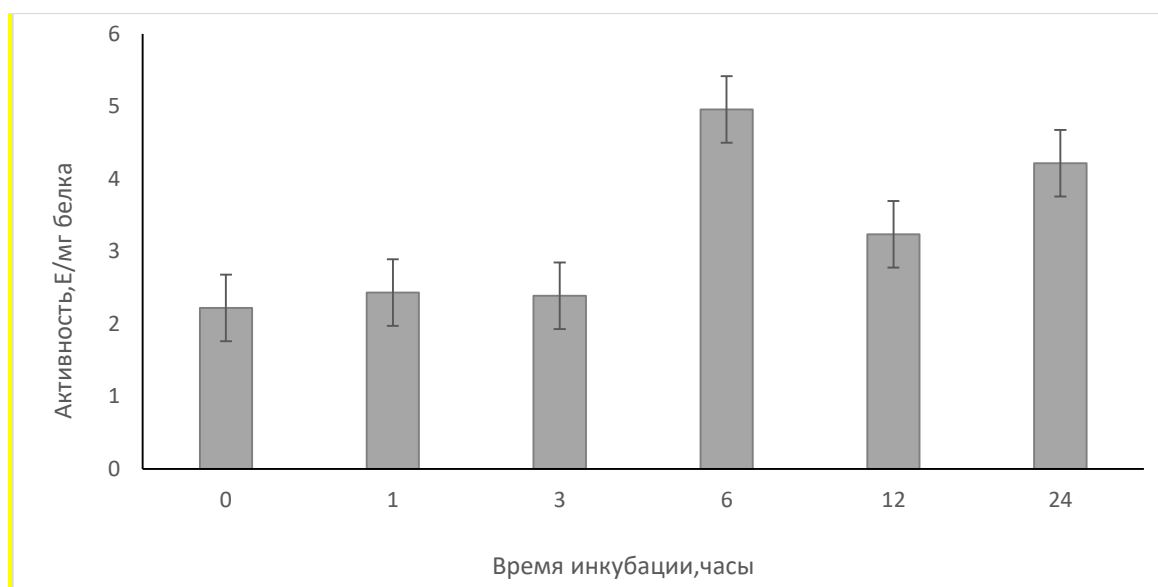


Рис. 1. Динамика активности пируваткарбоксилазы в условиях солевого стресса в листьях ячменя.

Результаты анализа содержания оксалоацетата в листьях ячменя при засолении представлены на рисунке 2. Исследования показали, что наблюдается прямая зависимость между увеличением активности пируваткарбоксилазы и ростом содержания оксалоацетата в клетках листьев ячменя спустя 6 часов воздействия соли. На 24 час инкубации растений концентрация анализируемого продукта пируваткарбоксилазной реакции оставалась на более высоком уровне по сравнению с контрольной группой.

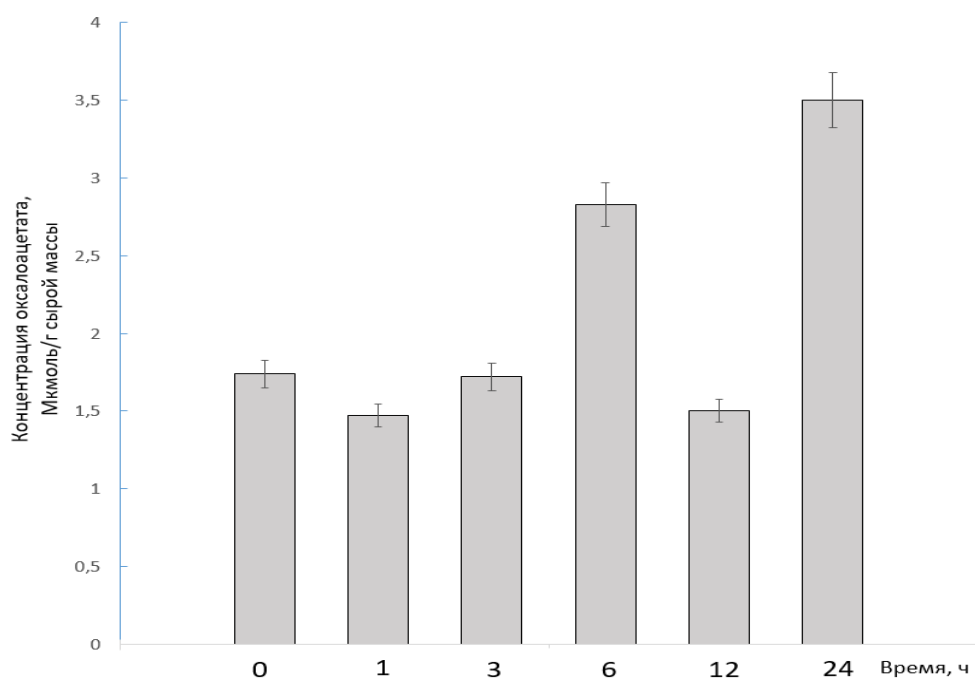


Рис. 2. Изменение содержания оксалоацетата в клетках листьев ячменя в условиях солевого стресса.

Заключение

Результаты проведенного исследования показывают зависимость между модификацией биохимических процессов в клетках ячменя и воздействием солевого стресса на растение. Это выражается в увеличении активности фермента. Высокий уровень активности пируваткарбоксилазы в ходе длительного влияния 150 мМ хлорида натрия особенно заметно достигает высоких значений спустя 6 ч воздействия соли. Параллельно с этим процессом растет концентрация оксалоацетата – продукта ферментативной реакции, который обеспечивает регуляцию цикла трикарбоновых кислот, синтез аминокислот, образование жирных кислот, участие в синтезе осмолитов.

Таким образом, культивирование солеустойчивого сорта ячменя является одним из эффективных способов борьбы с последствиями урбанизации. Как и у большинства растений в засоленной среде, реакции или адаптивные стратегии направлены на смягчение последствий осмотического, ионного и окислительного стресса, а также дисбаланса питательных веществ [3].

Список литературы

1. Забелина О.Н. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ПОЧВЫ УРБАНИЗИРОВАННЫХ ТЕРРИТОРИЙ / О.Н. Забелина, И.Д. Феоктистова // Фундаментальные исследования. — 2014. — № 9-11. — С. 2456 — 2459. — URL: <https://fundamental-research.ru/ru/article/view?id=35379>
2. Stavi I. Soil Salinity and Sodicity in Drylands : A Review of Causes, Effects, Monitoring, and Restoration Measures / I. Stavi, N. Thevs, S. Priori // Front. Environ. Sci. — 2021. — Doi: 10.3389/fenvs.2021.712831.
3. Mechanisms of Salt Tolerance and Molecular Breeding of Salt-Tolerant Ornamental Plants / J. Guo [et al.] // Front. Plant Sci. — 2022. — Doi: 10.3389/fpls.2022.854116.
4. Physiological and Transcriptome Indicators of Salt Tolerance in Wild and Cultivated Barley / N. Gharaghanipour [et al.] // Front. Plant Sci. — 2022. — Doi: 10.3389/fpls.2022.819282.
5. In vitro Biochemical Characterization of All Barley Endosperm Starch Synthases / J. A. Cuesta-Seijo [et al.] // Front. Plant Sci. — 2016. — Doi: 10.3389/fpls.2015.01265.
6. CryoEM structural exploration of catalytically active enzyme pyruvate carboxylase / J.P. López-Alonso [et al.] // Nat Commun. — 2022. — Doi: 10.1038/s41467-022-34543-8.
7. Overexpression of a Stress-Responsive NAC Transcription Factor Gene ONAC022 Improves Drought and Salt Tolerance in Rice / Y. Hong [et al.] // Front. Plant Sci. — 2016. — Doi: 10.3389/fpls.2016.00004.
8. 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.
9. 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, 302.

10. Payne J. Pyruvate carboxylase in *Rhodopseudomonasspheroides* /J.Payne, J.G. Morris // J. Gen. Microbiol. — 1969. Vol. 59, 97 — 101.
- 11.Lakin G.F. Biometriya. Moskva, Vysshayashkola. 1990, 351 s.
12. Lowry O.H. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents / O.H. Lowry [et al.] // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265-275.

References

- 1.ZabelinaO.N.COMPARATIVEANALYSIS OF THE ECOLOGICALSTATE OF THE SOIL OF URBANIZEDTERRITORIES/O.N.Zabelina,I.D.Feoktistova//Fundamentalresearch.— 2014.—№9-11.—pp.2456-2459.—URL:<https://fundamental-research.ru/ru/article/view?id=35379>
- 2.Stavi I. Soil Salinity and Sodicity in Drylands : A Review of Causes, Effects, Monitoring, and Restoration Measures / I. Stavi, N. Thevs, S. Priori // Front.Environ. Sci. — 2021. — Doi: 10.3389/fenvs.2021.712831.
- 3.Mechanisms of Salt Tolerance and Molecular Breeding of Salt-Tolerant Ornamental Plants / J. Guo [et al.] // Front.Plant Sci. — 2022. — Doi: 10.3389/fpls.2022.854116.
- 4.Physiological and Transcriptome Indicators of Salt Tolerance in Wild and Cultivated Barley / N. Gharaghanipor [et al.] // Front.Plant Sci. — 2022. — Doi: 10.3389/fpls.2022.819282.
- 5.In vitro Biochemical Characterization of All Barley Endosperm Starch Synthases / J. A. Cuesta-Seijo [et al.] // Front.Plant Sci. — 2016. — Doi: 10.3389/fpls.2015.01265.
- 6.CryoEM structural exploration of catalytically active enzyme pyruvate carboxylase / J.P. López-Alonso [et al.] // Nat Commun.— 2022. —Doi: 10.1038/s41467-022-34543-8.
- 7.Overexpression of a Stress-Responsive NAC Transcription Factor Gene ONAC022 Improves Drought and Salt Tolerance in Rice / Y. Hong [et al.] // Front.Plant Sci. — 2016. — Doi: 10.3389/fpls.2016.00004.
- 8.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.
9. 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, 302.
10. Payne J. Pyruvate carboxylase in *Rhodopseudomonasspheroides* /J.Payne, J.G. Morris // J. Gen.Microbiol.— 1969. Vol. 59, 97 — 101.
- 11.Lakin G.F. Biometriya.Moskva, Vysshayashkola.1990, 351 s.
12. Lowry O.H. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents / O.H. Lowry [et al.] // J. Biol.Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265-275.