

УДК 577.1 : 581.1

Мирзоева Б.Г., Мамедов З.М.

Бакинский государственный университет (Азербайджан)

**ВЛИЯНИЕ ИЗОКАТИОННЫХ СОЛЕЙ НАТРИЯ
НА ИНТЕНСИВНОСТЬ РОСТА И НА ДИНАМИКУ АКТИВНОСТИ
ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ И МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ
(ДЕКАРБОКСИЛИРУЮЩЕЙ) ПРОРОСТКОВ ФАСОЛИ**

B. Mirzoyeva, Z. Mammadov

Baku State University, Azerbaijan

**EFFECT OF ISOCATIONIC SODIUM SALTS ON THE GROWTH INTENSITY
AND THE KINETICS OF GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE
AND MALATE DEHYDROGENASE (DECARBOXYLATING)
ACTIVITY OF BEAN SEEDLINGS**

Аннотация. Исследовано влияние изокатионных солей натрия на интенсивность роста и на динамику активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ) и малатдегидрогеназы (декарбоксилирующей) (МДГД) проростков фасоли. Установлено, что растворы NaCl, Na₂SO₄, NaHCO₃ и Na₂CO₃ оказывают резко негативное действие как на рост корней, так и на рост стеблей проростков фасоли. Относительно низкие концентрации солей индуцируют, а высокие концентрации подавляют активность Г6ФДГ и МДГД. Индцирование активности этих ферментов в условиях солевого стресса, по-видимому, способствует выживаемости проростков фасоли.

Ключевые слова: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, малатдегидрогеназа (декарбоксилирующая), проростки фасоли, солевой стресс.

Abstract. Influence of isocationic sodium salts on the growth intensity and kinetics of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and malate dehydrogenase (decarboxylating) (MDHD) activity of bean seedlings is studied. It is found that NaCl, Na₂SO₄, NaHCO₃ and Na₂CO₃ solutions have a very negative effect both on the growth of roots and on the growth of bean seedling stems. Relatively low concentrations of salts induce and high concentrations inhibit the activity of G6PDH and MDHD. Inducing the activity of these enzymes under salt stress seems to contribute to survival of beans seedlings.

Key words: glucose-6-phosphatedehydrogenase, malate dehydrogenase (decarboxylating), bean seedlings, salt stress.

Одним из экстремальных факторов окружающей среды, оказывающих сильное влияние на рост и развитие растений, а следовательно, на их продуктивность, является стрессовое состояние, которое вызывается высокими концентрациями различных солей в почве [2; 11]. Во многих странах мира засоленность почвы создает серьезные проблемы в сельском хозяйстве, и она фактически превратилась в главное препятствие в получении продуктов высокого качества [3; 4]. Защитная реакция растений, направленная на преодоление экстремальных условий окружающей среды, в том числе и солевого стресса, требует потребления энергии и кофермента НАДФН [6; 10].

НАДФН имеет большое значение в формировании восстановительного потенциала клеток и используется в качестве универсального редуцирующего агента во многих биохимических реакциях. Он образуется под каталитическим действием ряда ферментов на свои соответствующие субстраты, среди которых особое место принадлежит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназе (Г6ФДГ, КФ 1.1.1.49) [9; 11] и малатдегидрогеназе (декарбоксилирующей) (МДГД, КФ 1.1.1.40) [1; 7]. Первый из них является ключевым и регуляторным ферментом окисления глюкозы

в пентозофосфатном цикле, а второй имеет первостепенное значение в обмене малата. Г6ФДГ и МДГД являются широко распространенными ферментами в растительных тканях. Они преимущественно локализованы в цитозоле [7]. Другим основным местом локализации этих ферментов в растениях являются пластиды [1]. Целью настоящей работы явилась исследование влияния различных концентраций изокатионных солей натрия, а именно, растворов NaCl, Na₂SO₄, NaHCO₃ и Na₂CO₃ на динамику активности цитоплазматических форм Г6ФДГ и МДГД в связи с изменениями в интенсивности роста проростков фасоли. Перечисленные соли натрия, как известно, играют важную роль в формировании засоленности почвы.

Материалы и методы исследования

Эксперименты проводились над проростками фасоли (*Phaseolus vulgaris*, сорт пияда). Семена фасоли смачивались в дистиллированной воде в течение 24 часов, и после появления первых признаков прорастания их выращивали в кюветах, заполненных дистиллированной водой, в течение 7 суток при температуре 25° С. Для создания солевого стресса в экспериментальные варианты добавляли необходимое количество солей NaCl, Na₂SO₄, NaHCO₃ и Na₂CO₃. Замеры роста и определение активности ферментов проводились на 3-и, 5-ые и 7-ые сутки прорастания.

Приготовление препарата и определение активности Г6ФДГ осуществляли по Эспозито и др. [8]. Для получения ферментного препарата МДГД в качестве экстрагирующего раствора использовали 100 мМ трис- HCl с pH-7.5, содержащий 5 мМ MgCl₂, 2 мМ ЭДТА, 10 % (v/v) глицерол, 10 мМ 2-меркаптоэтанол и 1 мМ фенилметилсульфонилхлорид. После приготовления гомогената и центрифугирования его при 12.000 g, фракция супернатанта применялась как неочищенный ферментный препарат МДГД. Для определения активности фермента использовалась инкубационная среда, приготовленная на основе 50 мМ трис- HCl буфера с pH-7.5, содержащая 10

мМ MgCl₂, 0.5 мМ НАДФ и 4 мМ L-малат, который предварительно был нейтрализован с Na₂CO₃. Активность обоих ферментов выражали в нм НАДФН/мин/мг белок. Содержание белка определяли по Бредфорду [5]. Полученные данные обработаны статистически и показатель погрешности не превышал 5%.

Результаты и их обсуждения

Результаты исследований по влиянию различных концентраций солей NaCl, Na₂SO₄, NaHCO₃ и Na₂CO₃ на интенсивность роста, а также на динамику активности цитоплазматических форм Г6ФДГ и МДГД проростков фасоли представлены в табл. 1. Как видно из представленных данных, негативное влияние растворов изокатионных солей натрия на интенсивность роста проростков фасоли начало проявляться во всех экспериментальных вариантах с самой ранней стадии развития проростков. Причем по мере увеличения концентрации солей их ингибирующее действие на этот процесс увеличивалось. Среди испытанных солей натрия наиболее ингибирующим действием на рост проростков оказывал Na₂CO₃. При его концентрации 100 мМ, в отличие от других вариантов, рост корней вовсе прекратился.

Если не вдаваться в более тонкие подробности, то можно сказать, что характер ингибирующего действия различных растворов NaCl, Na₂SO₄ и NaHCO₃ на рост корневой системы проростков гороха приблизительно одинаков. Тормозящее влияние растворов всех этих солей на рост корней измеряется кратными цифрами (как минимум, более чем в 2 раза) и по мере увеличения концентрации солей существенно усиливается. Добавление NaCl в среду сопровождалось усилением активности как Г6ФДГ, так и МДГД. Наиболее высокое индицирование активности ферментов наблюдалось при концентрации NaCl 50 мМ. На третий день экспериментов в варианте с 50 мМ NaCl активность Г6ФДГ по сравнению с контрольным вариантом увеличивалась на 49.2 %, а МДГД – на 29.4 %. В последующие дни экспериментов тенденция

Таблица 1

Влияние различных концентраций растворов изокатионных солей натрия на динамику роста корней (корни 10 проростков в граммах) и активности Г6ФДГ и МДГД на ранних стадиях развития проростков фасоли

Варианты	3 дня			5 дня			7 дня		
	Корень	Г6ФДГ	МДГД	Корень	Г6ФДГ	МДГД	корень	Г6ФДГ	МДГД
Контроль	1.2	242	102	2.1	191	133	4.1	176	154
NaCl									
25mM	0.5	328	122	0,8	294	163	1.2	281	201
50mM	0.3	361	132	0,5	308	182	0.8	290	212
100mM	0.1	310	130	0,3	208	95	0.6	160	103
Na ₂ SO ₄									
25mM	0.6	347	120	0,8	302	188	1.2	261	248
50mM	0.4	373	133	0,7	322	225	1.0	270	266
100mM	0.1	101	67	0,2	88	78	0.7	90	80
NaHCO ₃									
25mM	0.7	389	132	0,8	276	206	0.8	180	230
50mM	0.4	370	130	0,3	210	200	0.4	170	222
100mM	0.2	252	76	0,2	90	93	0.4	62	73
Na ₂ CO ₃									
25mM	1.4	280	101	0,4	230	121	0.4	160	103
50mM	1.3	220	92	0,4	180	112	0.6	101	94
100mM	-	-	-	-	-	-	-	-	-

снижения активности Г6ФДГ сохранялась, но в пределах концентрации NaCl 25-50 мМ она всегда находилась на более высоком уровне, чем в контроле. Высокая концентрация раствора NaCl (100 мМ) на ранних этапах роста корней стимулировала, а на поздних этапах существенно ингибировала активность обоих НАДФН-образующих ферментов.

Влияние различных концентраций растворов Na₂SO₄ и NaHCO₃ по характеру своего действия на динамику активности Г6ФДГ и МДГД сравнимо с таковой растворами NaCl. Тем не менее, можно выделить некоторые отличительные особенности действия растворов Na₂SO₄ и NaHCO₃ на этот процесс. Во-первых, на ранних стадиях развития проростков при низкой концентрации они индуцируют увеличение активности Г6ФДГ в заметно большей степени, чем раствор NaCl при той же концентрации в аналогичный период. Во-вторых, на более поздних стадиях развития корней относительно низкие кон-

центрации Na₂SO₄ и NaHCO₃ (25-50 мМ) индуцируют активность МДГД в большей степени, чем аналогичные концентрации NaCl. И, наконец, в-третьих, высокие концентрации (100 мМ) Na₂SO₄ и NaHCO₃ подавляют активность как Г6ФДГ, так и МДГД в большей степени, чем раствор NaCl. Следует также отметить, что под действием раствора NaHCO₃ активность Г6ФДГ индуцируется заметно больше, чем под влиянием раствора Na₂SO₄. Возможно, по этой причине рост корней при концентрации NaHCO₃ в 25 мМ происходит лучше, чем в той же концентрации NaCl. А разница между активностями в этих вариантах относительно МДГД менее заметно.

Влияние растворов Na₂CO₃ на динамику активности Г6ФДГ и МДГД существенно отличалось от аналогичного действия других растворов солей Na. Низкая концентрация Na₂CO₃ вызвала слабую индукцию активности Г6ФДГ в течение первых пяти дней инкубации. Во всех остальных случаях уро-

вень активности фермента был ниже, чем в контрольном варианте. А в случае МДГД индукция активности фермента вообще не наблюдалась. Наоборот, в течение всего инкубационного периода Na_2CO_3 заметно ингибировал активность МДГД. Возможно, отсутствие должной индукции активности в обоих НАДФН-образующих ферментах является основной причиной плохого роста корней проростков фасоли. Защитная система, требующая потребления определенного количества НАДФН, из-за отсутствия его необходимого количества не может преодолеть негативное действие Na_2CO_3 , которое отражается на задержке нормального роста корней.

На ранних стадиях развития проростков фасоли ингибирующее действие солей еще в большей степени отразилось на росте стебля, чем на росте корней (табл. 2). На пятый день экспериментов, кроме контрольного вариан-

та стволовая система появилась только в вариантах с NaCl и Na_2SO_4 , причем только при их концентрации 25 мМ. В этот период развития проростков фасоли масса стволовой системы в контрольном варианте превосходил аналогичный показатель в опытных вариантах в 3 раза. Во всех остальных случаях рост стебля подавлялся полностью. С течением времени (на седьмой день инкубации), стволовая система появляется и в других опытных вариантах (кроме концентраций Na_2CO_3 50 и 100 мМ), но разница между массами стеблей в контрольном и опытными вариантами достигает шести и более раз.

Уровень активности как Г6ФДГ, так и МДГД в стеблях проростков фасоли обнаруживался в значительно меньшей степени, чем в корнях. Так, например, в семидневных проростках контрольных вариантов соотношение активности ферментов в корнях к активности в стеблях для Г6ФДГ составля-

Таблица 2

Влияние различных концентраций растворов изокатионных солей натрия на динамику роста (стебли 10 проростков в граммах) стеблей и активности Г6ФДГ и МДГД на ранних стадиях развития проростков фасоли

Варианты	5 дней			7 дней		
	Ствол	Г6ФДГ	МДГД	Ствол	Г6ФДГ	МДГД
Контроль	0,6	102	48	12,6	108	60
NaCl						
25mM	0.2	121	57	2.1	130	73
50mM	-	-	-	1.4	125	65
100mM	-	-	-	1.0	83	52
Na₂SO₄						
25mM	0.2	114	55	0.9	118	72
50mM	-	-	-	0.5	101	61
100mM	-	-	-	0.4	77	50
NaHCO₃						
25mM	-	-	-	1.2	126	70
50mM	-	-	-	0.5	99	59
100mM	-	-	-	0.3	65	45
Na₂CO₃						
25mM	-	-	-	0.6	91	46
50mM	-	-	-	-	-	-
100mM	-	-	-	-	-	-

ло 2.1, а для МДГД – 2.1. Более того, степень индигирования активности этих НАДФН-образующих ферментов под действием растворов солей в стеблях проявлялась в меньшей степени, чем в корнях проростков фасоли. Видимо, эти два фактора (низкий уровень и слабая степень индигирования активности ферментов) делают стебли проростков фасоли более уязвимыми к действию солевого стресса. Таким образом, растворы NaCl, Na₂SO₄, NaHCO₃ и Na₂CO₃ оказывают резко негативное действие на рост корней, и еще в большей степени – на рост стеблей проростков фасоли. Относительно низкие концентрации солей индуцируют, а высокие концентрации подавляют активность Г6ФДГ и МДГД. Индигирование активности ферментов, по-видимому, способствуют выживаемости проростков фасоли.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Мамедов З.М. Физиологические функции малик-фермента у растений // Вест. Бакинского гос. универ. (Сер. естест. наук). – 2008. – № 4. – С. 60–70.
2. Bohnert, H.J., Jensen, R.G. Metabolic engineering for increased salt tolerance: the next step // Aust. J. Plant Physiol. – 1996. – № 23. – P. 661–667.
3. Bohert H.J., Nelson D.E., Jensen R.J. Adaptation to environmental stress // Plant Cell. – 1995. – V. 7. – P. 1099–1111.
4. Boyer J.S. Plant Productivity and environment // Science. – 1982. – V. 218. – P. 443–448.
5. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – V. 72. – P. 248–251.
6. Corpas F.J. A dehydrogenase-mediated recycling system of NADPH in plant peroxisomes / F.J. Corpas, J.B. Barroso, L.M. Sandalio et al. // Biochem. J. – 1998. – V. 330. – P. 777–784.
7. Drincovich M., Casati P., Andreo C. NADP-malic enzyme from plants: A ubiquitous enzyme involved in different metabolic pathways // FEBS Lett. – 2001. – V. 490. – P. 1–6.
8. Esposito S. Glucose-6-phosphate dehydrogenase in barley roots : kinetic properties and localization of isoforms / S. Esposito, S. Carfagna, G. Massaro et al. // Planta. – 2001. – V. 212. – P. 627–634.
9. Heerden P. Dark chilling increases glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in soybean leaves / P. Heerden, M. Villiers, J. Staden et al. // Physiologia Plantarum. – 2003. – V. 119. – P. 221–230.
10. Liu S. Expression of an NADP-malic enzyme gene in rice (*Oryza sativa* L.) is induced by environmental stress; over expression of the gene in *Arabidopsis* confers salt and osmotic stress tolerance / S. Liu, Y. Cheng, X. Zhang et al. // Plant Mol. Biol. – 2007. – V. 32. – P. 258–267.
11. Liu Y. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Plays a Pivotal Role in Nitric Oxide-Involved Defense Against Oxidative Stress Under Salt Stress in Red Kidney Bean Roots / Y. Liu, R. Wu, Q. Wan et al. // Plant Cell Physiol. – 2007. – V. 48 (№ 3). – P. 511–522.