

ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ *NICOTIANA TABACUM*, ВЫРАЩЕННЫХ В УСЛОВИЯХ БИОТИЧЕСКОГО СТРЕССА

К.В. Приступа

Белорусский государственный университет, г. Минск;

kristina.pristupa@mail.ru

науч. рук. – Т.А. Кукулянская, канд. биол. наук, доц.

В настоящее время одной из задач, стоящих перед учеными, является получение растений, которые характеризуются повышенной устойчивостью к заражению грибами. В таких условиях в растениях усиливается интенсивность свободно радикальных окислительных процессов, повышается содержание активных форм кислорода (АФК). В ответ на усиление генерации АФК, как правило, наблюдается активация ферментативных компонентов антиоксидантной защиты [1].

Развитие биотического стресса сопровождается образованием избыточного количества этилена в растениях. Накопление данного фитогормона приводит к изменению их параметров роста и развития. Одним из способов снижения этилена является создание трансгенных растений, которые несут в своем геноме бактериальный *acdS*-ген, который кодирует 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдезаминазу (АЦК-дезаминазу). Данный фермент катализирует разрушение предшественника этилена [2].

Целью исследования являлось изучение влияния биотического стресса на активность ряда ферментативных антиоксидантов в нетрансгенных и трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*, несущих *acdS*-ген бактерий *Pseudomonas putida* В-37.

Ключевые слова: АЦК-дезаминаза; антиоксидантная система; «стрессовый» этилен; ген *acdS*; *Pseudomonas putida* В-37.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования выступали нетрансгенные и трансгенные растения *Nicotiana tabacum*, которые несли в своем геноме ген *acdS* бактерий *Pseudomonas putida* В-37. Растения были выращены в нормальных условиях (контрольная серия) и при заражении растений грибом *Fusarium oxysporum* (опытная серия). Каждая серия включила себя по 10 нетрансгенных растений и 10 трансгенных растений.

Растительный материал (0,5 г) гомогенизировали в 0,1 М калий-фосфатном буфере (рН = 7,8), объем доводили до 10 мл. Полученные гомогенаты подвергали ультразвуковому воздействию (частота 11 кГц, время экспозиции 3×15с), центрифугировали 15 мин при 10 000 об/мин. Определение содержания белка, ферментов антиоксидантной защиты и других

биохимических показателей в экстрактах проводили согласно методическому пособию по спецпрактикуму [3]. Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью программы STATISTICA 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе нашей работы была определена активность АЦК-дезаминазы (табл. 1).

Таблица 1

Активность АЦК-дезаминазы в трансгенных растениях

Серия	Активность АЦК-дезаминазы, нмоль/(мг белка×мин)
Контрольная серия	0,072 ± 0,003
Опытная серия	1,04 ± 0,039*

Прим.: * – различия между контрольными и опытными сериями достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Как видно из представленных данных, воздействие на растения биотического стресса повышало активность АЦК-дезаминазы в 14 раз. Такое изменение активности фермента, наиболее вероятно, свидетельствует об индукции экспрессии гена, кодирующего АЦК-дезаминазу, под влиянием биотических факторов окружающей среды.

На следующем этапе нашей работы была определена общая антиоксидантная активность (ОАА) и активность глутатионредуктазы (ГР) в нетрансгенных и трансгенных растениях (табл. 2).

Таблица 2

Общая антиоксидантная активность и активность глутатионредуктазы в нетрансгенных и трансгенных растениях

Серия	Нетрансгенные растения		Трансгенные растения	
	ОАА, %	Активность ГР, мкМ НАДФН/ (мг белка × мин)	ОАА, %	Активность ГР, мкМ НАДФН/ (мг белка × мин)
Контрольная серия	60 ± 1,5	0,045 ± 0,003	54 ± 1,4	0,045 ± 0,003
Опытная серия	96 ± 2,9*	0,261 ± 0,010*	76 ± 2,5*	0,167 ± 0,006*

Прим.: ГР – глутатионредуктаза; ОАА – общая антиоксидантная активность; * – различия между контрольными и опытными сериями достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Согласно данным таблицы 2, нетрансгенные растения *Nicotiana tabacum* отличаются более высокой общей антиоксидантной активностью и активностью ГР по сравнению с трансгенными при заражении растений грибом *Fusarium oxysporum*. Показано, что при выращивании растений в условиях биотического стресса в нетрансгенных растениях ОАА увеличилась в 1,6 раз, в трансгенных – в 1,4 раз соответственно по сравнению с контрольной серией, активность ГР в нетрансгенных растениях возросла в 5,8 раз, в трансгенных – в 3,7 раз соответственно по сравнению с контрольной серией.

На заключительном этапе нашей работы была определена активность аскорбатпероксидазы (АПХ) и глутатионпероксидазы (ГПХ) во всех сериях растений (табл. 3).

Таблица 3

Активность глутатионпероксидазы и аскорбатпероксидазы в нетрансгенных и трансгенных растениях

Серия	Нетрансгенные растения		Трансгенные растения	
	Активность ГПХ, мкМ окисленного глутатиона/ (мин × мг белка)	Активность АПХ, отн.ед./ (мин×мг белка)	Активность ГПХ, мкМ окисленного глутатиона/ (мин × мг белка)	Активность АПХ, отн.ед./ (мин×мг белка)
Контрольная серия	0,03±0,00 1	0,03±0,002	0,03 ± 0,002	0,03 ± 0,002
Опытная серия	0,12±0,00 7*	0,19±0,01 0*	0,08 ± 0,004*	0,14 ± 0,008*

Прим.: АПХ – аскорбатпероксидаза; ГПХ – глутатионпероксидаза; * – различия между контрольными и опытными сериями достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Как видно из представленных данных, воздействие на растения биотического стресса повышало активность ГПХ в 4 раза для нетрансгенных растений и в 2,7 раз для трансгенных растений соответственно по сравнению с контрольной серией.

нию с контрольной серией. Активность АПХ в условиях заражения растений грибом *Fusarium oxysporum* увеличилась в 6,3 раз для нетрансгенных растений и в 4,7 раз для трансгенных растений соответственно по сравнению с контрольной серией.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе сравнивались некоторые биохимические показатели нетрансгенных и трансгенных растений *Nicotiana tabacum* в условиях биотического стресса. Полученные результаты свидетельствуют об индукции экспрессии гена *acdS* в трансгенных растениях при заражении их грибом *Fusarium oxysporum*. Вероятно, трансгенные формы растений отличаются более низкой интенсивностью процессов свободного окисления, в них в меньшем количестве образуются АФК и другие свободнорадикальные структуры, по сравнению с нетрансгенными. Следовательно, в трансгенных растениях в меньшей степени происходит активация ферментативных компонентов антиоксидантной защиты (АПХ, ГПХ, ГР), что, возможно, обуславливает более низкую ОАА и активность исследуемых ферментов.

Библиографические ссылки

1. *Mates J.M.* Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology // *Toxicology*. 2000. Vol. 153. P. 83-104. DOI: 10.1016/s0300-483x(00)00306-1.
2. *Gontia-Mishra I.* Recent developments in use of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase for conferring tolerance to biotic and abiotic stress// *Biotechnology Letters*. 2014. Vol. 36. P. 889–898. DOI: 10.1007/s10529-014-1458-9.
3. *Семак И.В.* Методическое пособие по спец. практикуму для студентов биологического факультета. Минск: БГУ, 2012.