

ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ *NICOTIANA TABACUM* В УСЛОВИЯХ НАРУШЕНИЯ ВОДНОГО РЕЖИМА

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 нарушению водного режима. 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 компонентов антиоксидантной защиты [1].

Развитие абиотического 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 нарушения водного режима почвы на состояние антиоксидантной системы 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 нарушении водного режима почвы в течение 3 суток, 6 суток и 9 суток (опытные серии). Каждая серия включила себя по 10 нетрансгенных растений, а также 10 трансгенных растений.

Растительный материал массой 0,5 г гомогенизировали в 0,1 М калий-фосфатном буфере (рН = 7,8), объем довели до 10 мл. Полученные гомогенаты подвергали ультразвуковому воздействию (частота 11 кГц, время экспозиции 3×15 с), центрифугировали 15 мин при 10 000 об/мин. Определение содержания белка, низкомолекулярных и высокомолекулярных антиоксидантов 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)
Нормальные условия	0,072 ± 0,003
Нарушение водного режима (3 суток)	0,286 ± 0,017*
Нарушение водного режима (6 суток)	0,545 ± 0,023*
Нарушение водного режима (9 суток)	0,851 ± 0,032*

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

Как видно из представленных данных, воздействие на растения абиотического стресса повышало активность АЦК-дезаминазы в 4 раза на 3 сутки, в 7,8 раз на 6 сутки и в 12,3 раз на 9 сутки эксперимента соответственно. Такое изменение активности фермента, вероятно, свидетельствует об индукции экспрессии гена, кодирующего АЦК-дезаминазу, под влиянием абиотических факторов окружающей среды.

На следующем этапе нашей работы было определено содержание аскорбиновой кислоты (АК) и фенольных соединений (ФС) в нетрансгенных и трансгенных растениях в пересчете на г растительного материала (табл. 2).

Таблица 2

Содержание аскорбиновой кислоты и фенольных соединений в нетрансгенных и трансгенных растениях

Серия	Нетрансгенные растения		Трансгенные растения	
	Содержание АК, мг/г раст. мат.	Содержание ФС, мкг танина/г раст. мат.	Содержание АК, мг/г раст. мат.	Содержание ФС, мкг танина/г раст. мат.
Нормальные условия	0,73 ± 0,02	59 ± 0,3	0,78 ± 0,02	69 ± 0,3

Серия	Нетрансгенные растения		Трансгенные растения	
	Содержание АК, мг/г раст. мат.	Содержание ФС, мкг танина/г раст. мат.	Содержание АК, мг/г раст. мат.	Содержание ФС, мкг танина/г раст. мат.
Нарушение водного режима (3 суток)	0,99 ± 0,02*	82 ± 0,4*	1,07 ± 0,02*	106 ± 0,7*
Нарушение водного режима (6 суток)	1,58 ± 0,03*	120 ± 0,6*	1,74 ± 0,04*	141 ± 0,8*
Нарушение водного режима (9 суток)	2,49 ± 0,05*	156 ± 0,9*	2,88 ± 0,08*	185 ± 1,0*

Прим.: АК – аскорбиновая кислота, ФС – фенольные соединения; * – различия между контрольными и опытными сериями достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Согласно данным таблицы 2, в нетрансгенных растениях содержание АК увеличилось в 1,4 раз, 2,2 раз и 3,4 раз соответственно на 3, 6 и 9 сутки эксперимента по сравнению с серией растений, выращенных в нормальных условиях, а в трансгенных растениях – в 1,4 раз, 2,2 раз и 3,7 раз соответственно. Показано, что исходное содержание фенольных соединений в трансгенных растениях было выше на 15-25% по сравнению с нетрансгенными формами. Для нетрансгенных растений содержание фенольных соединений увеличилось в 1,4 раз, 2 раза и 2,6 раз соответственно на 3, 6 и 9 сутки эксперимента по сравнению с серией растений, выращенных в нормальных условиях, а для трансгенных форм растений – в 1,5 раза, 1,9 раз и 2,5 раза соответственно.

На заключительном этапе нашей работы была определена активность аскорбатоксидазы (АО) и полифенолоксидазы (ПФО) во всех сериях растений (табл. 3).

Таблица 3

Активность аскорбатоксидазы и полифенолоксидазы в нетрансгенных и трансгенных растениях

Серия	Нетрансгенные растения		Трансгенные растения	
	Активность АО, мкмоль/(мин×мг белка)	Активность ПФО, Е/(мин×мг белка)	Активность АО, мкмоль/(мин×мг белка)	Активность ПФО, Е/(мин×мг белка)
Нормальные условия	0,04 ± 0,002	0,85 ± 0,02	0,04 ± 0,002	0,85 ± 0,02

Серия	Нетрансгенные растения		Трансгенные растения	
	Активность АО, мкмоль/(мин×мг г белка)	Активность ПФО, Е/(мин×мг белка)	Активность АО, мкмоль/(мин×мг г белка)	Активность ПФО, Е/(мин×мг белка)
Нарушение водного режима (3 суток)	0,09 ± 0,006*	1,25 ± 0,04*	0,06 ± 0,003*	1,00 ± 0,02*
Нарушение водного режима (6 суток)	0,17 ± 0,007*	2,04 ± 0,05*	0,10 ± 0,003*	1,54 ± 0,03*
Нарушение водного режима (9 суток)	0,16 ± 0,005*	1,96 ± 0,04*	0,09 ± 0,001*	1,43 ± 0,03*

Прим.: АО – аскорбатоксидаза; ПФО – полифенолоксидаза; * – различия между контрольной и опытными сериями достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Как видно из представленных данных, в нетрансгенных растениях активность АО возросла в 2,3 раз, 4,3 раз и 4 раза соответственно на 3, 6 и 9 сутки эксперимента по сравнению с серией растений, выращенных в нормальных условиях, а в трансгенных растениях – в 1,5 раза, 2,5 раза и 2,3 раз соответственно. Для нетрансгенных растений активность ПФО увеличилась в 1,5 раза, 2,4 раз и 2,3 раз соответственно на 3, 6 и 9 сутки эксперимента по сравнению с серией растений, выращенных в нормальных условиях, для трансгенных растений – в 1,2 раз, 1,8 раз и 1,7 раз соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют об индукции экспрессии гена *acdS* в трансгенных растениях при нарушении водного режима почвы. Вероятно, трансгенные растения отличаются более низкой интенсивностью процессов свободного окисления, в них в меньшем количестве образуются АФК и другие свободнорадикальные структуры. Поэтому в трансгенных растениях в меньшей степени происходит активация АО и ПФО. Этому, в свою очередь, может способствовать более высокое содержание ФС и АК.

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.