

**ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИНОТРАНСФЕРАЗ
И ФЕРМЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ
В НЕТРАНСГЕННЫХ И ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ
*NICOTIANA TABACUM***

К. В. Приступа, А. К. Сербенко, Д. А. Руткевич

*Белорусский государственный университет, г. Минск;
kristi.pristupa@mail.ru, ann-serbenko@mail.ru, rutkevichd@inbox.ru;
науч. рук. – Т. А. Кукулянская, канд. биол. наук, доц., Е. А. Храмова
канд. биол. наук, доц.*

Образование «стрессового» этилена в растениях возможно под воздействием множества факторов. Снижение количества этилена может осуществляться ферментом 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат-дезаминазой (АЦК-дезаминазой), который катализируют превращение предшественника этилена 1-аминоциклопропан-1-карбоксилата (АЦК) в аммиак и α -кетобутират. Получены трансгенные растения, устойчивые к этилену благодаря введению в их геном бактериальных генов, кодирующих АЦК-дезаминазу. Целью работы являлось изучение влияния различных концентраций меди (II) в почве на активность АЦК-дезаминазы, аминотрансфераз, ферментов антиоксидантной защиты, интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) в нетрансгенных и трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*, несущих *acdS*-ген бактерий *Pseudomonas putida B-37*.

Ключевые слова: АЦК-дезаминаза; аминотрансферазы растений; «стрессовый» этилен; *acdS*-ген; *Pseudomonas putida B-37*.

Введение. Синтез «стрессового» этилена индуцируется инфекциями, загрязнением почвы ксенобиотиками и т.д. Избыточное количество этилена подавляет развитие корней, стеблей, листьев. Снижение количества этилена возможно в трансгенных растениях, которые несут бактериальные гены, кодирующие АЦК-дезаминазу [1, 2].

Материалы и методы исследования. Семена растений высевали на фильтры и 2 суток выдерживали при 20 °С в темноте. Затем проростки помещали в климатокамеру с температурой 20 °С и 16-часовым световым днем. Через 14 дней растения пересаживали в стаканчики спочвой и выращивали при 20 °С, влажности 70–80 %, 16-часовом световом дне 8 недель. Внесение в почву Cu^{2+} проводили однократно с учетом их предельно допустимой концентрации – 3 мг/кг. Концентрация Cu^{2+} превышала ПДК в 3 и 10 раз.

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 с помощью дезинтегратора УЗДН-2Т (частота 11 кГц, время экспозиции 3×15 с), центрифугировали 15 мин при 10 000 об/мин. Определение содержания бел-

ка, активности АЦК-дезаминазы, аминотрансфераз, ферментов антиоксидантной защиты, интенсивности ПОЛ в экстрактах проводили согласно методическому пособию по спецпрактикуму [3]. Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью программы STATISTICA 6.0. Оценку достоверности различий средних арифметических проводили на основании коэффициента Стьюдента. Различия достоверны при двухстороннем уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. В данной работе был проведен сравнительный анализ ряда биохимических показателей в трансгенных и нетрансгенных растениях табака в условиях обработки почвы разными концентрациями Cu^{2+} . Нами была определена активность АЦК-дезаминазы, а также активность АСТ и АЛТ в экстрактах нетрансгенных и трансгенных растений (табл. 1).

Таблица 1

Активность АЦК-дезаминазы, АСТ и АЛТ в экстрактах нетрансгенных и трансгенных *Nicotiana tabacum*

Серия	Трансгенные растения			Нетрансгенные растения	
	Активность АЦК-дезаминазы, мкмоль/(мг белка*мин)	Активность АСТ, мкмоль/(мин *мг белка)	Активность АЛТ, мкмоль/(мин *мг белка)	Активность АСТ, мкмоль/(мин *мг белка)	Активность АЛТ, мкмоль/(мин *мг белка)
Без внесения Cu^{2+}	6,4 ± 0,4	23,36 ± 1,2	25,15 ± 0,9	20,95 ± 0,8	21,83 ± 0,6
[Cu^{2+}] = 9 мг/кг почвы	8,2 ± 0,2	25,84 ± 0,9	26,19 ± 0,7	22,70 ± 0,9	23,57 ± 0,7
[Cu^{2+}] = 30 мг/кг почвы	14,3 ± 0,3*	55,00 ± 1,7*	52,38 ± 1,4*	46,62 ± 1,5*	43,65 ± 1,2*

* - различия достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$

Как видно из табл. 1 в трансгенных растениях, в почву которых был внесен $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в концентрации 30 мг/кг почвы, наблюдалось увеличение активности АЦК-дезаминазы в 1,74 раза. Это, вероятно, свидетельствует об индукции экспрессии гена, кодирующего АЦК-дезаминазу. Максимальная активность АСТ выявлена при внесении Cu^{2+} в концентрации 30 мг/кг почвы. Активность фермента возросла в 2 раза во всех сериях растений. Активность АЛТ изменялась аналогичным образом.

Нами была изучена активность каталазы и пероксидазы в экстрактах трансгенных и нетрансгенных растений при внесении в почву Cu^{2+} , в концентрациях 9 и 30 мг на кг почвы, что показано в табл. 2.

Таблица 2

Активность пероксидазы и каталазы в экстрактах нетрансгенных и трансгенных растений *Nicotiana tabacum*

Серия	Трансгенные растения		Нетрансгенные растения	
	Активность пероксидазы, мкмоль/(мин* мг белка)	Активность каталазы, Е /мин*мг белка	Активность пероксидазы, мкмоль/(мин*мг белка)	Активность каталазы, Е/мин*мг белка
Без внесения Cu^{2+}	$3,6 \pm 0,1$	$15,63 \pm 0,47$	$2,5 \pm 0,08$	$9,72 \pm 0,40$
$[\text{Cu}^{2+}] = 9$ мг/кг почвы	$7,1 \pm 0,3^*$	$42,07 \pm 1,35^*$	$5,5 \pm 0,2^*$	$20,81 \pm 0,83^*$
$[\text{Cu}^{2+}] = 30$ мг/кг почвы	$4,1 \pm 0,2$	$73,47 \pm 2,20^*$	$4,6 \pm 0,1^*$	$38,04 \pm 1,44^*$

* - различия достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$

Как видно из табл. 2 активность пероксидазы в нетрансгенных растениях ниже, чем в трансгенных, однако характер изменения активности при внесении в почву Cu^{2+} аналогичный. После внесения в почву трёхкратной концентраций меди активность фермента возросла в 2–2,5 раза. При увеличении концентрации меди до 30 мг/кг почвы активность фермента снижалась. Возможно, это связано с ингибированием пероксидазы высокими концентрациями меди. Активность каталазы в нетрансгенных растениях без внесения в почву меди была на 60 % ниже, чем в трансгенных. Внесение в почву Cu^{2+} в концентрации 30 мг/кг почвы привело к увеличению активности фермента в 4-4,5 раза. Нами была определена активность СОД и количество ТБК-активных продуктов, образующихся в процессе ПОЛ (табл.3).

Таблица 3

Активность СОД и содержание ТБК-активных продуктов в экстрактах нетрансгенных и трансгенных растений *Nicotiana tabacum*

Серия	Трансгенные растения		Нетрансгенные растения	
	Активность СОД, у.е./мг белка	Содержание, нмоль/мг белка	Активность СОД, у.е./мг белка	Содержание, нмоль/мг белка
Без внесения Cu^{2+}	$0,60 \pm 0,054$	$0,160 \pm 0,005$	$0,18 \pm 0,006$	$0,140 \pm 0,004$
$[\text{Cu}^{2+}] = 9$ мг/кг почвы	$1,93 \pm 0,074^*$	$0,188 \pm 0,008$	$1,02 \pm 0,028^*$	$0,303 \pm 0,011^*$
$[\text{Cu}^{2+}] = 30$ мг/кг почвы	$1,42 \pm 0,057^*$	$0,333 \pm 0,012^*$	$1,68 \pm 0,069^*$	$0,246 \pm 0,010^*$

* - различия достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$

Как видно из табл. 3 активность СОД увеличилась и в трансгенных, и в нетрансгенных растениях при внесении в почву ионов меди в концентрации 9 мг/кг почвы. При увеличении концентрации Cu^{2+} в 10 раз в активность СОД в трансгенных растениях снизилась на 25 %, а в нетрансгенных увеличилась на 60 %. В нетрансгенных растениях максимальное содержание ТБК-активных продуктов наблюдалось при концентрации меди 9 мг/кг почвы, а при концентрации 30 мг/кг почвы оно снижается. В трансгенных растениях увеличение интенсивности ПОЛ в 2 раза происходит при концентрации Cu^{2+} 10хПДК.

Заключение. В работе сравнивались биохимические показатели нетрансгенных и трансгенных *Nicotiana tabacum*, в почву которых был внесен сульфат меди. Полученные результаты свидетельствуют об индукции экспрессии гена *acdS* под действием меди. Действие Cu^{2+} приводит к активации каталазы и СОД. Увеличение активности этих ферментов приводит к постепенному и менее интенсивному усилению ПОЛ по сравнению с нетрансгенными формами. Увеличение активности каталазы, возможно, способствует снижению активности пероксидазы.

Библиографические ссылки

1. Characterization of ACC deaminase-producing endophytic bacteria isolated from copper-tolerant plants and their potential in promoting the growth and copper accumulation of *Brassica napus* / Y.F. Zhang // Chemosphere. – 2011. – Vol. 83, № 1. – P. 57–62.
2. Jacobson, C.B. Partial purification and characterization of ACC deaminase from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 / C.B. Jacobson, J.J. Pasternak, B.R. Glick // Can. J. Microbiol. – 1994. – Vol. 40. – P. 1019–1025.
3. Семак И.В. Методическое пособие по спец. практикуму для студентов биологического факультета / И.В. Семак, Т.Н. Зырянова, О.И. Губич. – Минск: БГУ, 2012. – 123 с.