

**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  $\alpha$ -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  $\text{Cu}^{2+}$  проводили однократно с учетом их предельно допустимой концентрации – 3 мг/кг. Концентрация  $\text{Cu}^{2+}$  превышала ПДК в 3 и 10 раз.

Растительный материал (0,5 г) гомогенизировали в 0,1 М калий-фосфатном буфере (рН = 7,8), объем довели до 10 мл. Полученные гомогенаты подвергали ультразвуковому воздействию с помощью дезинтегратора УЗДН-2Т (частота 11 кГц, время экспозиции  $3 \times 15$ 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  $\text{Cu}^{2+}$ . 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 $\text{Cu}^{2+}$	6,4 ± 0,4	23,36 ± 1,2	25,15 ± 0,9	20,95 ± 0,8	21,83 ± 0,6
[ $\text{Cu}^{2+}$ ] = 9 мг/кг почвы	8,2 ± 0,2	25,84 ± 0,9	26,19 ± 0,7	22,70 ± 0,9	23,57 ± 0,7
[ $\text{Cu}^{2+}$ ] = 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  $\text{Cu}^{2+}$  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  $\text{Cu}^{2+}$ , 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 <sup>2+</sup>	3,6 ± 0,1	15,63 ± 0,47	2,5 ± 0,08	9,72 ± 0,40
[Cu <sup>2+</sup> ]=9 мг/кг почвы	7,1 ± 0,3*	42,07 ± 1,35*	5,5 ± 0,2*	20,81 ± 0,83*
[Cu <sup>2+</sup> ]= 30 мг/кг почвы	4,1 ± 0,2	73,47 ± 2,20*	4,6 ± 0,1*	38,04 ± 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<sup>2+</sup> 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<sup>2+</sup> 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 <sup>2+</sup>	0,60 ± 0,054	0,160 ± 0,005	0,18 ± 0,006	0,140 ± 0,004
[Cu <sup>2+</sup> ] = 9 мг/кг почвы	1,93 ± 0,074*	0,188 ± 0,008	1,02 ± 0,028*	0,303 ± 0,011*
[Cu <sup>2+</sup> ] = 30 мг/кг почвы	1,42 ± 0,057*	0,333 ± 0,012*	1,68 ± 0,069*	0,246 ± 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  $\text{Cu}^{2+}$  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  $\text{Cu}^{2+}$  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  $\text{Cu}^{2+}$  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.