

# АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ОКИСЛЕНИЯ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ *NICOTIANATABACUM*, ВЫРАЩЕННЫХ В УСЛОВИЯХ АБИОТИЧЕСКОГО СТРЕССА

К.В. Приступа, В.Д. Курган

Белорусский государственный университет, г. Минск;  
*kristina.pristupa@mail.ru; kvitella8@gmail.com*  
науч. рук. – Т.А. Кукулянская, канд. биол. наук., доц.

Повышение устойчивости растений к воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды является одной из задач, стоящих перед учеными. Растения, которые произрастают в неблагоприятных условиях, подвергаются абиотическому стрессовому воздействию, например, засолению, засухе и т.д. В таких условиях повышается содержание активных форм кислорода (АФК), усиливается интенсивность свободно радикальных окислительных процессов в растениях. Как правило, это приводит к активации ферментативных и неферментативных элементов антиоксидантной защитной системы растений (в том числе аскорбиновой кислоты (АК), фенольных соединений (ФС) и ферментов, участвующих в их метаболизме)[1].

Развитие абиотического стресса сопровождается образованием избыточного количества этилена в растениях. Одним из способов его снижения является создание трансгенных растений, которые несут в своем геноме бактериальный *acdS*-ген, который кодирует 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдезаминазу. Данный фермент катализирует превращение предшественника этилена 1-аминоциклопропан-1-карбоксилата до аммиака и  $\alpha$ -кетобутирата [2].

Целью данной работы являлось изучение влияния абиотического стресса на активность ряда ферментов окисления аскорбиновой кислоты и фенольных соединений в нетрансгенных и трансгенных растениях *Nicotianatabacum*, несущих *acdS*-ген бактерий *Pseudomonasputida*B-37.

**Ключевые слова:** антиоксидантная система; аскорбиновая кислота; фенольные соединения; этилен; *acdS*-ген; *Pseudomonasputida*B-37.

**Материалы и методы исследования.** В качестве объектов исследования выступали нетрансгенные и трансгенные растения *Nicotianatabacum*. Растения были разделены на следующие серии:

1. Контрольная серия (почва не обрабатывалась);
2. 1 серия (почва была обработана  $\text{CuSO}_4$  в концентрации 30 мг/кг почвы);
3. 2 серия (почва была обработана  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  в концентрации 15 мг/кг почвы);
4. 3 серия (почва была обработана  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  в концентрации 15 мг/кг почвы).
5. 4 серия (почва была обработана 200 мМ  $\text{NaCl}$ );

6. 5 серия (почва была подвержена засухе)

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 (частота 11 кГц, время экспозиции 3×15с), центрифугировали 15 мин при 10 000 об/мин. Определение содержания АК, ФС, активности ферментов антиоксидантной защиты в экстрактах проводили согласно методическому пособию по спецпрактикуму [3]. Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью программы STATISTICA 6.0. Оценку достоверности различий средних арифметических между контрольной и опытными сериями проводили на основании коэффициента Стьюдента.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Первоначально нами было определено содержание ФС и АК, что представлено в таблице 1.

Таблица 1

Содержание АК и ФС в экстрактах *Nicotianatabacum*

Серия	Содержание АК, мг/г растительного материала		Содержание ФС, мкг танина/г растительного материала	
	Нетрансгенные растения	Трансгенные растения	Нетрансгенные растения	Трансгенные растения
Без обработки	0,73 ± 0,015	0,78 ± 0,015	59 ± 0,3	69 ± 0,3
5хПДК [Cu <sup>2+</sup> ]	0,96 ± 0,018*	1,07 ± 0,019*	84 ± 0,4*	150 ± 0,7*
5хПДК [Cr <sup>6+</sup> ]	1,38 ± 0,027*	1,74 ± 0,037*	106 ± 0,6*	161 ± 0,8*
5хПДК [Pb <sup>2+</sup> ]	0,75 ± 0,016	0,88 ± 0,017	80 ± 0,4*	104 ± 0,5*
200 мМ NaCl	1,79 ± 0,040*	3,82 ± 0,063*	107 ± 0,5*	172 ± 0,9*
Засушливая почва	2,29 ± 0,047*	5,12 ± 0,081*	156 ± 0,9*	185 ± 1,0*

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

Как видно из табл.1, при внесении в почву ионов тяжелых металлов, засолении и засухе повышается содержание АК и ФС в нетрансгенных и трансгенных растениях. Показано, что трансгенные формы отличаются более высоким содержанием данных антиоксидантов по сравнению с нетрансгенными при абиотическом стрессе. Максимальное содержание АК

обнаружено в условиях засухи: для нетрансгенных растений оно составило 310%, для трансгенных – 450% по сравнению с контрольной серией.

Установлено, что в нетрансгенных растениях содержание ФС увеличилось в 1,4, 1,8 и 1,4 раз при обработке почвы ионами меди (II), хрома (VI) и свинца (II) по сравнению с контрольной серией, в трансгенных – в 2,2, 2,3 и 1,5 раза соответственно.

Также нами была определена активность аскорбатоксидазы (АО) и аскорбатпероксидазы (АП) во всех сериях растений (таблица 2).

Таблица 2

**Активность АО и АП в экстрактах *Nicotianatabacum***

Серия	Активность АО, отн. ед. / (мин×мг белка)		Активность АП, отн. ед. / (мин×мг белка)	
	Нетранс- ген-ные рас- тения	Трансгенные растения	Нетранс- ген-ные рас- тения	Трансген- ные растения
Без обработки	0,04 ± 0,002	0,04 ± 0,002	0,03 ± 0,002	0,03 ± 0,002
5хПДК [Cu <sup>2+</sup> ]	0,11 ± 0,006*	0,06 ± 0,002*	0,10 ± 0,004*	0,07 ± 0,003*
5хПДК [Cr <sup>6+</sup> ]	0,13 ± 0,007*	0,09 ± 0,004*	0,15 ± 0,007*	0,11 ± 0,005*
5хПДК [Pb <sup>2+</sup> ]	0,10 ± 0,005*	0,05 ± 0,002*	0,09 ± 0,004*	0,06 ± 0,003*
200 мМ NaCl	0,14 ± 0,008*	0,1 ± 0,005*	0,17 ± 0,008*	0,12 ± 0,005*
Засушл и-вая почва	0,16 ± 0,007*	0,11 ± 0,005*	0,18 ± 0,008*	0,14 ± 0,006*

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

Как видно из представленных данных, активность АО и АП увеличились в условиях абиотического стресса. Для нетрансгенных растений активность АО составила 280%, 330%, 250%, 350% и 400% при обработке почвы ионами меди (II), хрома (VI), свинца (II), NaCl, а также после засухи соответственно по сравнению с контрольной серией, для трансгенных растений – 150%, 250%, 130%, 250% и 280% соответственно.

В нетрансгенных растениях активность АП возросла в 3,3; 5; 3; 5,7 и 6 раз после внесения в почву меди (II), хрома (VI), свинца (II), NaCl, а

также после засухи соответственно по сравнению с контрольной серией, в трансгенных растениях – в 2,3; 3,7; 2; 4 и 4,7 раза соответственно.

Кроме того, нами была изучена активность полифенолоксидазы(ПФО) и интенсивность процессов пероксидазного окисления в экстрактах *Nicotianatabacum*, что представлено в таблице 3.

Таблица 3

Активность ПФО и пероксидаз в *Nicotianatabacum*

Серия	Активность ПФО, Е/(мин×мг белка)		Пероксидазная активность, мкмоль/(мин×мг белка)	
	Нетранс- ген-ные рас- тения	Трансген- ные растения	Нетранс- ген-ные рас- тения	Трансген- ные растения
Без обработки	0,85 ± 0,019	0,86 ± 0,020	2,32 ± 0,06	2,44 ± 0,06
5хПДК [Cu <sup>2+</sup> ]	1,73 ± 0,042*	1,44 ± 0,028*	6,53 ± 0,08*	3,37 ± 0,08*
5хПДК [Cr <sup>6+</sup> ]	1,42 ± 0,038*	1,25 ± 0,033*	7,96 ± 0,06*	3,96 ± 0,08*
5хПДК [Pb <sup>2+</sup> ]	1,06 ± 0,029*	0,96 ± 0,028*	6,88 ± 0,05*	3,65 ± 0,07*
200 мМ NaCl	1,82 ± 0,045*	1,56 ± 0,032*	7,04 ± 0,07*	3,85 ± 0,07*
Засушл и-вая почва	1,93 ± 0,047*	1,62 ± 0,034*	8,46 ± 0,11*	4,24 ± 0,08*

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

Как видно из табл. 3, активность ПФО и пероксидазная активность увеличились в растениях при абиотическом стрессе. Показано, что нетрансгенные образцы отличаются более высокой активностью данных ферментов по сравнению с трансгенными. Максимальная пероксидазная активность и активность ПФО обнаружена в условиях засухи: для нетрансгенных форм они составили 230% и 370% по сравнению с контрольной серией, для трансгенных – 180% и 170% соответственно.

**Заключение.** В данной работе сравнивали ряд биохимических показателей нетрансгенных и трансгенных растений в условиях абиотического стресса. Вероятно, трансгенные формы отличаются более низким уровнем образования АФК в условиях абиотического стресса, поэтому в них в меньшей степени происходит активация ферментативных элемен-

тов антиоксидантной защиты (АП, АО, ПФО). Этому, в свою очередь, может способствовать более высокое содержание низкомолекулярных компонентов антиоксидантной системы (ФС, АК).

#### **Библиографические ссылки.**

1. *Mates, J.M.* Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology / J.M. Mates // *Toxicology*. – 2000. – Vol. 153. – P. 83–104.
2. *Glick, B.R.* Bacterial ACC deaminase and the alleviation of plant stress / B.R. Glick // *Advances in applied microbiology*. – 2004. – Vol. 56. – P. 291–312.
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.