

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ И КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ»
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ

УДК 577.35: 57.045: 577.29

САВИНА
Светлана Михайловна

**ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ ПРИ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОМ
СТРЕССЕ И В ПОСТСТРЕССОВЫЙ ПЕРИОД В РАСТЕНИЯХ ТАБАКА,
ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ СМЫСЛОВЫМ ГЕНОМ
СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

по специальности 03.01.02 – Биофизика

Минск, 2018

Работа выполнена в ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»

Научный руководитель:

Шалыго Николай Владимирович
член-корреспондент НАН Беларуси,
доктор биологических наук, доцент,
заведующий лабораторией биофизики и
биохимии растительной клетки ГНУ
«Институт биофизики и клеточной
инженерии НАН Беларуси»

Официальные оппоненты:

Кабашникова Людмила Федоровна
член-корреспондент НАН Беларуси, доктор
биологических наук, доцент, заведующий
лабораторией прикладной биофизики и
биохимии ГНУ «Институт биофизики и
клеточной инженерии НАН Беларуси»

Соколик Анатолий Иосифович
кандидат биологических наук, доцент,
заведующий научно-исследовательской
лабораторией физиологии и биотехнологии
растений Белорусского государственного
университета

Оппонирующая организация:

ГНУ «Центральный ботанический сад НАН
Беларуси»

Защита состоится «2» ноября 2018 г. в 10:30 на заседании Совета по защите диссертаций Д 01.37.01 в ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси» по адресу: 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27.

Телефон ученого секретаря: 332-16-04; факс 284-23-59; e-mail: pshybytko@ibp.org.by

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ «Институт биофизики клеточной инженерии НАН Беларуси»

Автореферат разослан «01» октября 2018 г.

Ученый секретарь

Совета по защите диссертаций Д 01.37.01,
кандидат биологических наук



Пшибытко Н.Л.

ВВЕДЕНИЕ

Растения в процессе своего развития часто подвергаются действию различных неблагоприятных факторов внешней среды, в том числе и низкотемпературному (НТ) стрессу, что приводит к значительной потере урожайности сельскохозяйственных культур. Даже небольшое понижение температуры, не вызывающее видимых повреждений растений, может снижать их продуктивность до 50% [Бровка, 2009].

Воздействие на растение низкой температуры приводит к снижению скорости протекания метаболических реакций, а также к возникновению окислительного стресса, который характеризуется накоплением в клетках растений окислителей – активных форм кислорода (АФК) и продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [Choudhury et al., 2016]. Баланс окислителей в растительной клетке поддерживается антиоксидантной системой, компонентами которой являются низкомолекулярные соединения и специфические ферменты. Одним из ключевых ферментов антиоксидантной системы является супероксиддисмутаза (СОД), участвующая в детоксикации супероксидных анион-радикалов. СОД присутствует в растительных клетках в виде нескольких изоформ: Mn-СОД (митохондриальная), Cu/Zn-СОД (цитозольная и хлоропластная), Fe-СОД (хлоропластная и цитозольная) [Бараненко, 2006]. При НТ стрессе усиливается образование АФК во всех компартментах клетки [Колупаев, 2009]. Можно предположить, что дополнительное увеличение содержания СОД в митохондриях или хлоропластах приведет к усилению защиты растений от холодового воздействия. Показано, что растения табака и картофеля с повышенной экспрессией генов, кодирующих хлоропластную и цитозольную изоформы Cu/Zn-СОД, усиливают защиту растительной клетки от окислительного стресса, индуцированного паракватом, светом высокой интенсивности, метилвиологеном и озоном [Sen Gupta et al., 1993; Van Camp et al., 1996; Lee et al., 2007]. В то же время функционирование защитной системы в растениях с повышенным уровнем экспрессии СОД в условиях холодового стресса практически не исследовалось. Отсутствуют работы и по динамике окислительных процессов в СОД-трансформантах в постстрессовый (ПС) период, т. е. после прекращения действия стрессового фактора. В этой связи чрезвычайно актуальным представляется изучение влияния повышенного уровня СОД в хлоропластах или в митохондриях на динамику окислительных процессов, на состояние и функционирование антиоксидантной системы, а также на устойчивость трансформантов к НТ стрессу.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с научными программами (проектами) и темами. Диссертационная работа выполнена в рамках программ: ГКПНИ «Биологическая инженерия и биобезопасность» по заданию 10 «Изучение молекулярных механизмов функционирования защитных систем растительной клетки для разработки новых технологий мониторинга экологической устойчивости растений» (№ГР20064723, 2006–2010 гг.), ГПНИ «Фундаментальные основы биотехнологий» по заданию 1.03

«Исследование молекулярно-генетических механизмов комплексной и приобретенной устойчивости растений к действию абиотических и биотических факторов внешней среды с целью разработки новых биотехнологий повышения устойчивого развития сельскохозяйственных культур» (№ГР20114750, 2011–2013 гг.); гранта Президиума НАН Беларуси для аспирантов «Динамика окислительных процессов при НТ стрессе в растениях табака, трансформированных смысловым геном супероксиддисмутазы» (№ГР20104750, 2010–2011 гг.).

Тема работы соответствует приоритетным направлениям научных исследований Республики Беларусь на 2006–2010 гг. (п. 3.8 – геномика растений и животных, исследование генетических, физиологических и биохимических механизмов формирования их продуктивности и устойчивости, п. 3.10 – молекулярная биология, биофизика регуляторных процессов и протеомика, п. 3.16 – биотехнология для промышленности, сельского хозяйства, медицины и охраны окружающей среды) и на 2016–2020 гг. (п. 3 – биологические системы и технологии, п. 6 – био- и nanoиндустрия: биотехнологии в сельскохозяйственном производстве и пищевой промышленности).

Цель и задачи исследования. *Цель работы* – выявить механизмы функционирования защитной системы и состояние фотосинтетического аппарата в трансгенных по *MSD1* и *FSD2* растениях табака при НТ стрессе и в ПС период. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие *задачи*:

1) Провести скрининг растений табака, трансформированных генами митохондриальной и хлоропластной изоформ СОД – Mn-СОД и Fe-СОД соответственно, по активности СОД;

2) Оценить исходный антиоксидантный статус трансформантов;

3) Изучить накопление АФК, продуктов ПОЛ и изменение проницаемости клеточных мембран в трансформантах в условиях НТ стресса и в ПС период;

4) Определить содержание низкомолекулярных антиоксидантов (аскорбата, глутатиона, токоферола, фенолов и каротиноидов), а также активность антиоксидантных ферментов (СОД, аскорбатпероксидазы (АПР), глутатионредуктазы (ГР), каталазы (КАТ) и специфической к фенолам пероксидазы (ФПР)) в трансгенных по *MSD1* и *FSD2* растениях табака в условиях НТ стресса и в ПС период;

5) Изучить содержание фотосинтетических пигментов и активность фотосистемы 2 (ФС2) в трансгенных растениях при НТ стрессе и в ПС период;

6) Выявить особенности экспрессии генов, кодирующих защитные белки митохондрий (альтернативную цианидрезистентную оксидазу и АТФ/АДФ-антипортер), в трансформантах в условиях НТ и в ПС период.

Объектами исследования служили выращенные в лабораторных условиях 45-дневные растения табака (*Nicotiana tabacum* L.), трансформированные смысловым геном митохондриальной СОД (*MSD1*) и хлоропластной СОД (*FSD2*) арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* L.). *Предметом* исследования являлись окислительные процессы, защитная система и фотосинтетический аппарат растений.

Научная новизна. Показано, что растения табака, трансформированные смысловым геном *FSD2*, обладают более высоким антиоксидантным потенциалом по сравнению с растениями дикого типа (ДТ) за счет повышенной активности Fe-СОД и антиоксидантных ферментов – АПР и ГР, а в случае трансформации геном *MSD1* за счет более высокой активности Mn-СОД и высокого содержания низкомолекулярных антиоксидантов – аскорбата и фенольных соединений. Установлено, что активация антиоксидантной системы в трансгенных по *FSD2* растениях происходит в 2-х клеточных компартментах (цитозоле и хлоропластах), в то время как в трансгенных по *MSD1* растениях – в 3-х компартментах растительной клетки (хлоропластах, цитозоле и митохондриях). Установлено, что воздействие НТ стресса на свету не приводит к существенному изменению активности ФС2 и пигментного состава в листьях трансгенных по *MSD1* и *FSD2* растений табака по сравнению с ДТ, а также по сравнению с исходным уровнем, зарегистрированным в трансформантах до начала действия стрессового фактора. Показано, что формирование устойчивости трансгенных растений табака к НТ стрессу обеспечивается как высокой эффективностью функционирования антиоксидантной системы, так и повышенным уровнем экспрессии *AOX1* и *ANT*, кодирующих альтернативную цианидрезистентную оксидазу и АТФ/АДФ-антипортер митохондрий соответственно.

Положения, выносимые на защиту:

1. Трансформация растений табака (*Nicotiana tabacum* L.) генами митохондриальной Mn-СОД и хлоропластной Fe-СОД арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* L.) (*MSD1* и *FSD2* соответственно) приводит к активации антиоксидантной системы в клеточных компартментах, что выражается в возрастании не только активности СОД, но и в увеличении активности компонентов защитной системы, участвующих в детоксикации пероксида водорода.

2. Трансформация генами *MSD1* и *FSD2* приводит к повышению устойчивости растений табака к окислительному стрессу, индуцированному низкой положительной температурой. В стрессовых условиях в трансгенных по генам *MSD1* и *FSD2* растениях табака накапливается меньшее количество АФК и продуктов ПОЛ, снижается проницаемость клеточных мембран в сравнении с растениями ДТ. В ПС период окислительные процессы в трансгенных растениях быстрее нормализуются.

3. При действии низкой положительной температуры активность СОД, АПР, КАТ и ГР в трансгенных растениях увеличивается, а уровни низкомолекулярных антиоксидантов возрастают по сравнению с ДТ. В ПС период активность антиоксидантных ферментов и количество низкомолекулярных антиоксидантов снижаются. При этом в клеточных компартментах трансгенных растений (хлоропластах, митохондриях и цитозоле) наблюдается синхронизация активностей СОД, включая активность дополнительной изоформы Mn-СОД или Fe-СОД, и ферментов, участвующих в детоксикации пероксида водорода.

4. Трансформация растений табака генами *MSD1* и *FSD2* арабидопсиса не изменяет активность фотосинтетического аппарата, однако приводит к возрастанию уровней экспрессии генов защитных белков митохондрий – альтернативной цианидрезистентной оксидазы и АТФ/АДФ-антипортера. В целом Mn-СОД-трансформанты обладают более высокой устойчивостью к действию НТ стресса, чем Fe-СОД-трансформанты.

Личный вклад соискателя ученой степени. Представленные в диссертационной работе экспериментальные данные были получены лично соискателем. Статистическая обработка экспериментальных результатов, их обобщение и анализ проведены автором диссертации. Постановка целей и задач исследования, интерпретация результатов, подготовка к публикации печатных работ осуществлялись совместно с научным руководителем д.б.н., чл.-корр. НАН Беларуси Н.В. Шалыго при решающем участии автора.

Апробация результатов диссертации. Результаты исследований были представлены на VI и VII Международной научной конференции «Регуляция роста, развития и продуктивности растений» (Минск, 2009, 2011), Международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» IX, X, XI съездах Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков (Минск, 2010, 2012, 2014), на VIII Международной научной конференции «Биоантиоксидант» (Россия, Москва, 2010), на Всероссийском симпозиуме «Растение и стресс» (Россия, Москва, 2010), на XII конференции молодых ученых «Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів» (Украина, Киев, 2012), на Ежегодном съезде общества экспериментальных биологов (SEB) (Австрия, Зальцбург, 2012), на Международном симпозиуме «Окислительный стресс и программируемая клеточная смерть в растениях: механизмы и следствия» (Италия, Флоренция, 2013), на Всероссийской научной конференции «Факторы устойчивости растений в экстремальных природных условиях и техногенной среде» (Россия, Иркутск, 2013), на Всероссийской научной конференции с международным участием «Инновационные направления современной физиологии растений» (Россия, Москва, 2013), на научной конференции «Фундаментальные и прикладные проблемы современной экспериментальной биологии растений» (Россия, Москва, 2015), на конференции молодых ученых биохимиков «Современные проблемы биохимии» (Беларусь, Гродно, 2015).

Опубликованность результатов. По материалам диссертации опубликовано 23 печатные работы, в том числе 5 статей в рецензируемых журналах, 8 статей в сборниках научных трудов и 10 тезисов докладов. Общее количество опубликованных авторских листов в изданиях, включенных в Перечень научных изданий Республики Беларусь для опубликования результатов диссертационных исследований, – 2,7; других публикаций – 1,9 авторских листа.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения,

перечня сокращений, общей характеристики, аналитического обзора литературы (глава 1), описания объектов и методов исследования (глава 2), изложения полученных результатов и их обсуждения (главы 3–6), заключения, библиографического списка, включающего 251 источник литературы (66 – на русском, 185 – на английском языке), списка публикаций соискателя – 23 работы (20 – на русском, 3 – на английском языке) и приложения. Работа изложена на 175 страницах печатного текста, содержит 51 рисунок, 10 таблиц и 2 приложения.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

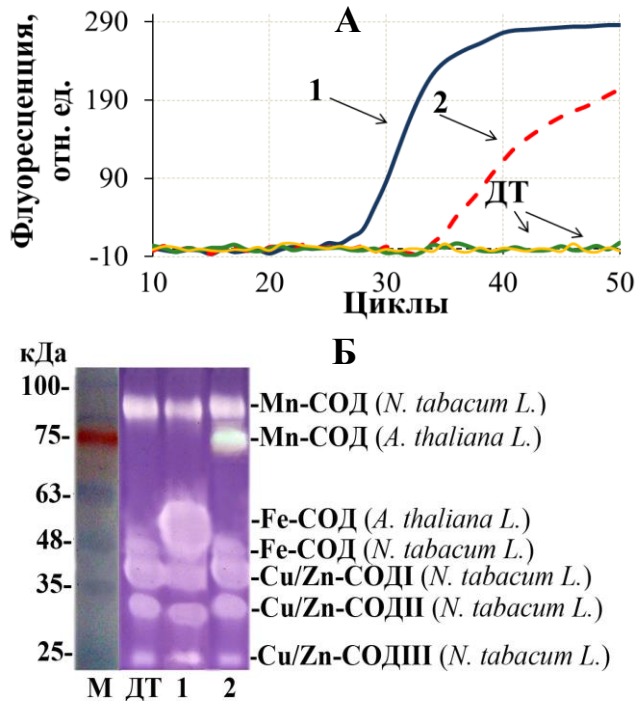
Объекты и методы исследования. В экспериментах использовали листья и корни 45-дневных растений табака (*Nicotiana tabacum* L., SNN), трансформированных смысловым геном митохондриальной СОД (*MSD1*) и хлоропластной СОД (*FSD2*) арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* L.) с лидерной последовательностью для транспортировки Mn-СОД в митохондрии и Fe-СОД в хлоропласты. Семена трансформантов (Т₁) со сверхэкспрессией *MSD1* и *FSD2* были любезно предоставлены профессором Б. Гриммом (Берлинский университет им. А. Гумбольдта, Германия). ДТ и трансформанты выращивали в грунте «Восторг» («Карио», РБ) при температуре $25\pm 2^\circ\text{C}$ в режиме 14 ч света (интенсивность $160 \text{ мкмоль квантов}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$) и 10 ч темноты.

Наличие экспрессии генов MSD1 и FSD2 арабидопсиса в растениях табака подтверждали с помощью ПЦР-РВ с использованием ген-специфичных праймеров и/или нативного гелеэлектрофореза, позволяющего разделять Mn-СОД и Fe-СОД табака и арабидопсиса и определять активность этих изоформ фермента соответственно [Bowler, 1989; C. Lee, 2000; Sh. Liangquan et al., 2004; M. Fumiyoshi, 2008]. *НТ стресс* моделировали с использованием холодильной камеры в присутствии освещения (интенсивность $160 \text{ мкмоль квантов}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ с 14 ч фотопериодом) либо без освещения (в темноте) при $+4^\circ\text{C}$ в течение 22 ч, после чего табак помещали в нормальные условия выращивания на 24 ч (ПС период). Отбор проб производили через 2, 4 и 24 ч после прекращения действия стрессового фактора. Контролем служили растения, не подвергавшиеся стрессовому воздействию. *Общий уровень АФК* определяли флуоресцентным методом, в основе которого лежит реакция окисления восстановленной формы дихлорфлуоресцеина (ДХФ) в присутствии АФК [Crow, 1997]. *Содержание пероксида водорода* в экстракте оценивали по методу, основанному на регистрации изменения флуоресценции скополетина при его окислении H_2O_2 в присутствии пероксидазы хрена [Козел, 2009]. *Интенсивность процессов ПОЛ* оценивали по накоплению малонового диальдегида (МДА), содержание которого определяли по образованию окрашенного продукта в реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [Ric De Vos et al., 1989]. *Оценку изменений барьерных свойств клеточных мембран* проводили спектрофотометрически, определяя величину выхода электролитов и свободных нуклеотидов из листовой ткани в дистиллированную воду [Кожушко, 1976; Конев, 1977]. *Содержание хлорофиллов, каротиноидов и токоферолов* в листьях табака определяли методом высокоэффективной жидкостной

хроматографии (ВЭЖХ) [William, 1986]. Активность ФС2 оценивали по параметрам флуоресценции хлорофилла *a*, регистрируемой с помощью РАМ-флуориметра «Teaching-РАМ» (Walz, Германия) [Корнеев, 2002]. Изоформы СОД и АПР определяли с помощью нативного гелеэлектрофореза, как описано в работе [Lee, 2000]. Разделение клеточных фракций проводили методом дифференциального центрифугирования [Побежимова, 2004]. При этом для выявления внутриклеточной локализации дополнительной СОД в Fe-СОД-трансформантах использовали листья, а в Mn-СОД-трансформантах – корни. Контролем служили листья и корни ДТ. Общую активность АПР определяли спектрофотометрически, регистрируя кинетику потребления аскорбата [Nakano, Asada, 1981]. Определение общей активности КАТ проводили спектрофотометрически, измеряя скорость разрушения H_2O_2 [Aebi, 1981]. Активность ГР определяли, регистрируя кинетику потребления НАДФН [Aono, 1995]. Активность ФПР определяли, регистрируя кинетику потребления гваякола [Kumar, 1993]. Для количественного определения окисленного (Г-SS-Г) и восстановленного (Г-SH) глутатиона использовали способность *o*-фталевого альдегида образовывать флуоресцирующий продукт с Г-SS-Г при pH 12,0 и с Г-SH при pH 8,0 [Шальго, 2007]. Содержание общего и восстановленного аскорбата оценивали спектрофотометрическим методом, как описано в работе [Козел, 2009]. Суммарное содержание фенольных соединений в экстракте листьев определяли спектрофотометрически с использованием реактива Фолина, как описано в [Запрометов, 1974]. Уровень экспрессии генов *AOX1* и *ANT*, кодирующих цианидрезистентную альтернативную оксидазу и АТФ/АДФ-антипортер табака соответственно, определяли методом ПЦР-анализа [Доманская, 2011]. Содержание белка в экстрактах определяли по методу Bradford [1974]. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью программ «Sigma Plot 10.0» («Systat Software», США) и «Excel 2010» («Microsoft», США). Оценивали среднюю квадратичную ошибку среднего арифметического. Статистический анализ проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Идентификация Mn-СОД- и Fe-СОД-трансформантов

Трансгенные растения выявляли с помощью ПЦР-РВ с использованием праймеров, специфичных к *MSD1* и *FSD2* арабидопсиса (рисунок 1А), и/или нативного гелеэлектрофореза с последующей визуализацией изоформ СОД (рисунок 1Б). В Fe-СОД-трансформантах регистрировали 6 изоформ фермента: 1 Mn-СОД табака, 2 Fe-СОД, принадлежащие табаку и арабидопсису соответственно, 1 цитозольную и 2 хлоропластные Cu/Zn-СОД табака. В Mn-СОД-трансформантах выявлялось также 6 изоформ СОД: 2 Mn-СОД, принадлежащие табаку и арабидопсису соответственно, а также 1 Fe-СОД, 1 цитозольную Cu/Zn-СОД и 2 хлоропластные Cu/Zn-СОД табака. В листьях ДТ регистрировали только 5 изоформ СОД: 1 митохондриальную Mn-СОД, 1 хлоропластную Fe-СОД, 1 цитозольную и 2 хлоропластные Cu/Zn-СОД табака.



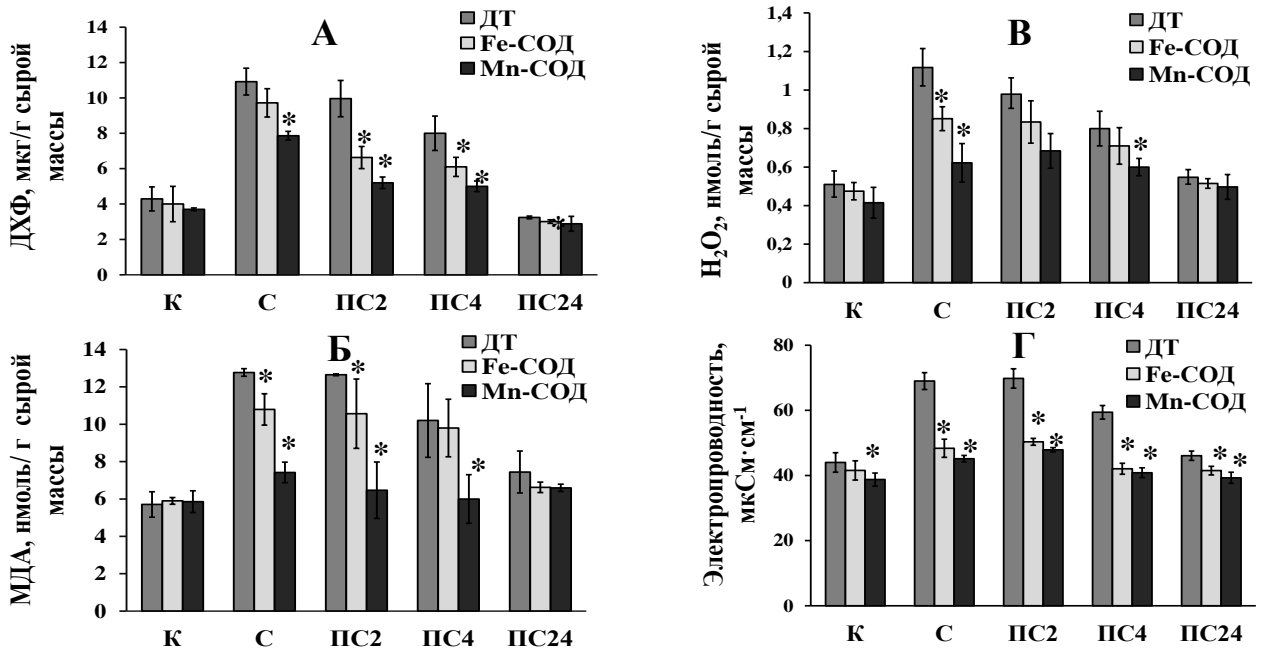
ДТ – дикий тип, 1 – Fe-СОД-трансформанты;
2 - Mn-СОД-трансформанты.
М – белковый маркер

Рисунок 1. – Кривые накопления продуктов амплификации для генов *MSD1* и *FSD2* (А) и электрофореграмма изоформ СОД в экстракте листьев (Б)

На основании количественного анализа активностей изоформ СОД из предоставленных нам пяти линий Fe-СОД- и Mn-СОД-трансформантов для дальнейших исследований были отобраны линии с наибольшей активностью Fe-СОД и Mn-СОД соответственно.

Окислительные процессы в трансгенных по *MSD1* и *FSD2* растениях табака в условиях НТ стресса

Установлено, что при НТ стрессе на свету (+4°C, 22 ч, 160 мкмоль квантов·м⁻²·с⁻¹ с 14 ч фотопериодом) в растениях табака с повышенной экспрессией *MSD1* и *FSD2* окислительные процессы протекают менее интенсивно, чем в ДТ. На это указывает пониженное в 1,4 и 1,1; 1,8 и 1,3; 1,7 и 1,2 раза содержание АФК, H₂O₂ и продуктов ПОЛ в Mn-СОД- и Fe-СОД-трансформантах по сравнению с ДТ соответственно (рисунок 2А-В).



ДТ – дикий тип, Fe-СОД и Mn-СОД – Fe-СОД- и Mn-СОД-трансформанты соответственно. К – контроль, С – стресс (+4°C, 22 ч, 160 мкмоль квантов·м⁻²·с⁻¹ с 14 ч фотопериодом); ПС 2, 4 и 24 – постстрессовый период через 2, 4 и 24 ч после прекращения действия стресса; *p≤0,05

Рисунок 2. – Содержание АФК (А), продуктов ПОЛ (Б), H₂O₂ (В) и выход электролитов (Г) в 4-м листе растений табака при НТ стрессе и в ПС период

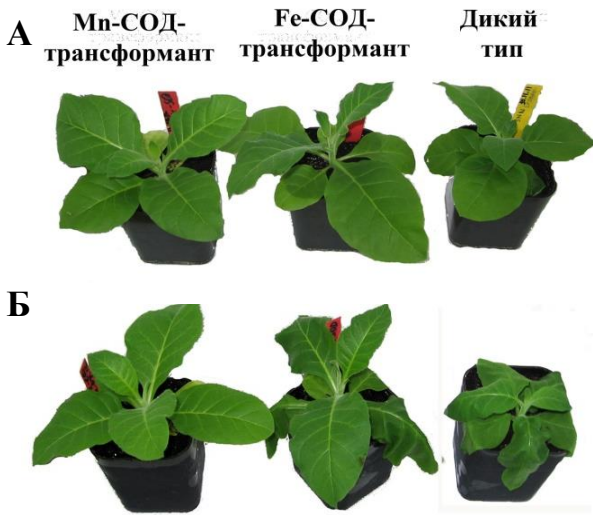
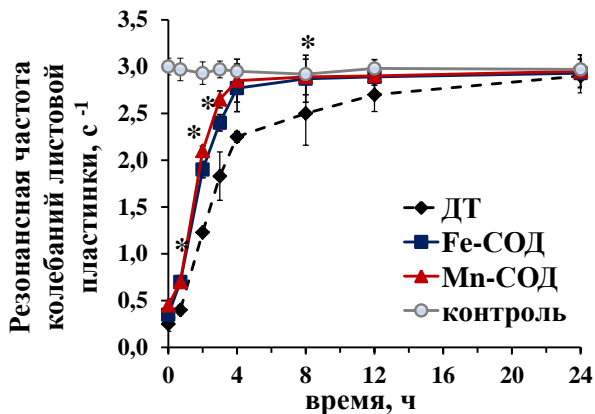


Рисунок 3. – Внешний вид растений до (А) и после стресса (+4°C, 22 ч, 160 мкмоль квантов·м⁻²·с⁻¹ с 14 ч фотопериодом) (Б)



Контроль – растения ДТ, не подвергавшиеся стрессу, ДТ – дикий тип, Fe-COD – Fe-COD- и Mn-COD – Mn-COD-трансформанты соответственно

Рисунок 4. – Восстановление жёсткости листовой пластинки в 4-м листе растений табака после их переноса из холода (+4°C, 22 ч, 160 мкмоль квантов·м⁻²·с⁻¹ с 14 ч фотопериодом) в тепло (+25°C, 24 ч); *p≤0,05

АФК и продуктов ПОЛ. И в этом случае в Mn-COD-трансформантах степень окислительных процессов была ниже по сравнению с Fe-COD-трансформантами.

Ответной реакцией растений на НТ стресс на организменном уровне во всех изученных вариантах была потеря тургора листьев, особенно, в растениях ДТ (рисунок 3). Следует отметить, что в трансформантах и в ДТ наблюдались существенные различия и в скорости восстановления тургора листьев после прекращения действия стрессового фактора. Количественной характеристикой тургора служила жесткость листовой пластинки, определяемая по резонансной частоте

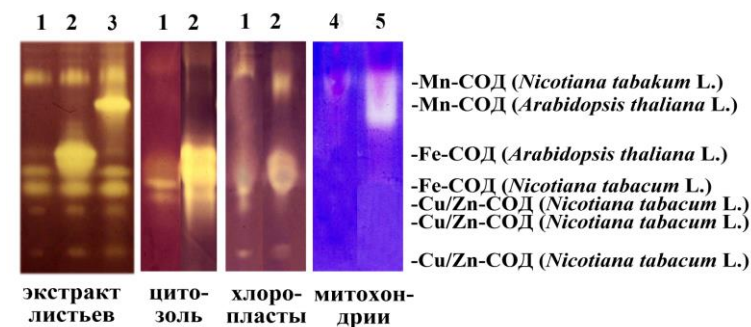
В ПС период в трансформантах содержание АФК снижалось, достигая к 24 ч исходных значений, зарегистрированных до начала действия стрессора. При этом нормализация окислительных процессов происходила быстрее в трансгенных растениях, чем в ДТ. Трансгенные по *MSD1* и *FSD2* растения табака характеризовались также меньшим выходом электролитов из мембран. Так, выход электролитов при НТ стрессе в ДТ возрастал на $57\pm 7\%$, а в Mn-COD- и Fe-COD-трансформантах – только на $16\pm 6\%$ и $17\pm 6\%$, соответственно, по сравнению со значениями, зарегистрированными до начала действия стресса. Через 4 ч после прекращения действия стрессового фактора данный показатель в трансформантах достигал исходного уровня, а в растениях ДТ оставался выше исходного уровня на $35\pm 8\%$ (рисунок 2Г).

При НТ стрессе, который протекал в темноте (+4°C, 22 ч), Mn-COD- и Fe-COD-трансформанты также характеризовались пониженным содержанием АФК, H₂O₂ и продуктов ПОЛ (в 1,9 и 1,3; 2,3 и 1,7; 1,4 и 1,2 раза соответственно) по сравнению с растениями ДТ. Через 2 ч после прекращения действия стрессового фактора изменение содержания АФК, в том числе и H₂O₂, а также продуктов ПОЛ проходит через максимум во всех исследуемых растениях и к 24 ч ПС периода достигает исходных величин. При этом выход электролитов и свободных нуклеотидов коррелировал с содержанием

методом, разработанном в ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси» [Доманский и др., 2011] (рисунок 4). Показано, что жесткость листовой пластинки в 4-м листе Fe-СОД- и Mn-СОД-трансформантов возвращается к исходному уровню уже через 4 ч после прекращения действия стрессового фактора, а в 4-м листе растений ДТ данная величина достигает исходного уровня только через 24 ч (рисунок 4). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о более эффективной системе детоксикации окислителей в трансформантах как при низкотемпературном стрессе в темноте, так и при низкой температуре в сочетании с освещением.

Состояние и функционирование защитной системы трансгенных растений в норме, в стрессе и в ПС период

Внутриклеточная локализация дополнительных изоформ СОД в трансгенных растениях. Известно, что изоформы СОД различаются по своей активности, локализации в клетке и вносят различный вклад в общую активность фермента [Alscher et al., 2002].



1,4 – ДТ, 2 – Fe-СОД-трансформанты; 3, 5 – Mn-СОД-трансформанты. 1-3 – для анализа использовали листья. 4,5 – корни. Для лучшей визуализации изоформ фракция хлоропластов сконцентрирована в 5 раз относительно общего экстракта.

Рисунок 5. – Электрофореграмма изоформ СОД в экстракте листьев, а также во фракциях хлоропластов, цитозоля и митохондрий табака

цитозоле может быть связана с недостаточно эффективной работой транспортного белка при высокой экспрессии *FSD2*, как это было показано ранее для растений арабидопсиса [Fumiyoshi, 2008]. Для получения фракции митохондрий, не загрязненной мембранами хлоропластов, использовали корни 45-дневных растений табака. Установлено, что в растениях табака, трансформированных смысловым геном *MSD1* арабидопсиса, вся Mn-СОД локализована в митохондриях.

Состояние антиоксидантной системы в трансгенных растениях в нормальных условиях. Показано, что в нормальных условиях выращивания общая активность СОД в Mn-СОД- и Fe-СОД-трансформантах была в 1,4 и в 2,0 раза выше, чем в ДТ соответственно. При этом трансформация табака *MSD1* и *FSD2* приводила к

Анализ отдельных клеточных фракций, полученных с помощью дифференциального центрифугирования, показал, что хлоропластная Fe-СОД в трансгенных по *FSD2* растениях табака локализована не только в хлоропластах, но и в цитозоле (рисунок 5). Причем в цитозольной фракции Fe-СОД-трансформантов доля железосодержащей СОД составляла $90 \pm 5\%$ от общего пула данного фермента. Преимущественная локализация хлоропластной изоформы Fe-СОД в

хлоропластах, но и в цитозоле (рисунок 5). Причем в цитозольной фракции Fe-СОД-трансформантов доля железосодержащей СОД составляла $90 \pm 5\%$ от общего пула данного фермента. Преимущественная локализация хлоропластной изоформы Fe-СОД в

изменению активностей отдельных изоформ фермента. Так, в ДТ на долю Mn-СОД приходится $45\pm 15\%$, цитозольной Cu/Zn-СОД – $27\pm 7\%$, хлоропластной Fe-СОД и хлоропластной Cu/Zn-СОД – по $14\pm 3\%$ от общей активности фермента. В Mn-СОД-трансформантах активность Mn-СОД возросла в 1,5 раза и составила $51\pm 7\%$ от общей активности фермента. На долю хлоропластной Fe-СОД, цитозольной и хлоропластной Cu/Zn-СОД в таких растениях приходилось $15\pm 3\%$, $17\pm 4\%$ и $17\pm 8\%$ соответственно. Активность Fe-СОД в Fe-СОД-трансформантах была в 7 раз выше, чем в ДТ за счет возрастания доли Fe-СОД (в хлоропластах и цитозоле), которая составила $54\pm 4\%$ от общей активности фермента. В таких трансформантах было зафиксировано снижение активности Mn-СОД, цитозольной и хлоропластной Cu/Zn-СОД до $16\pm 3\%$, $18\pm 3\%$ и $12\pm 6\%$ от общей активности фермента соответственно.

Мы предположили, что трансформация растений *MSD1* и *FSD2* активирует антиоксидантную систему трансформантов. Действительно, в нормальных условиях выращивания в трансгенных по СОД растениях происходило возрастание относительно ДТ общей активности АПР, которая присутствует в листьях растений табака в двух изоформах – хлоропластной и цитозольной (таблица 2). В частности, в Mn-СОД-трансформантах активность цитозольной и хлоропластной изоформ фермента повышалась примерно в равной степени, в то время как в Fe-СОД-трансформантах повышение активности АПР было связано с возрастанием активности преимущественно хлоропластной АПР.

Таблица 2 – Активность изоформ АПР в 4-м листе трансгенных по *MSD1* и *FSD2* растений табака и ДТ; * $p\leq 0,05$

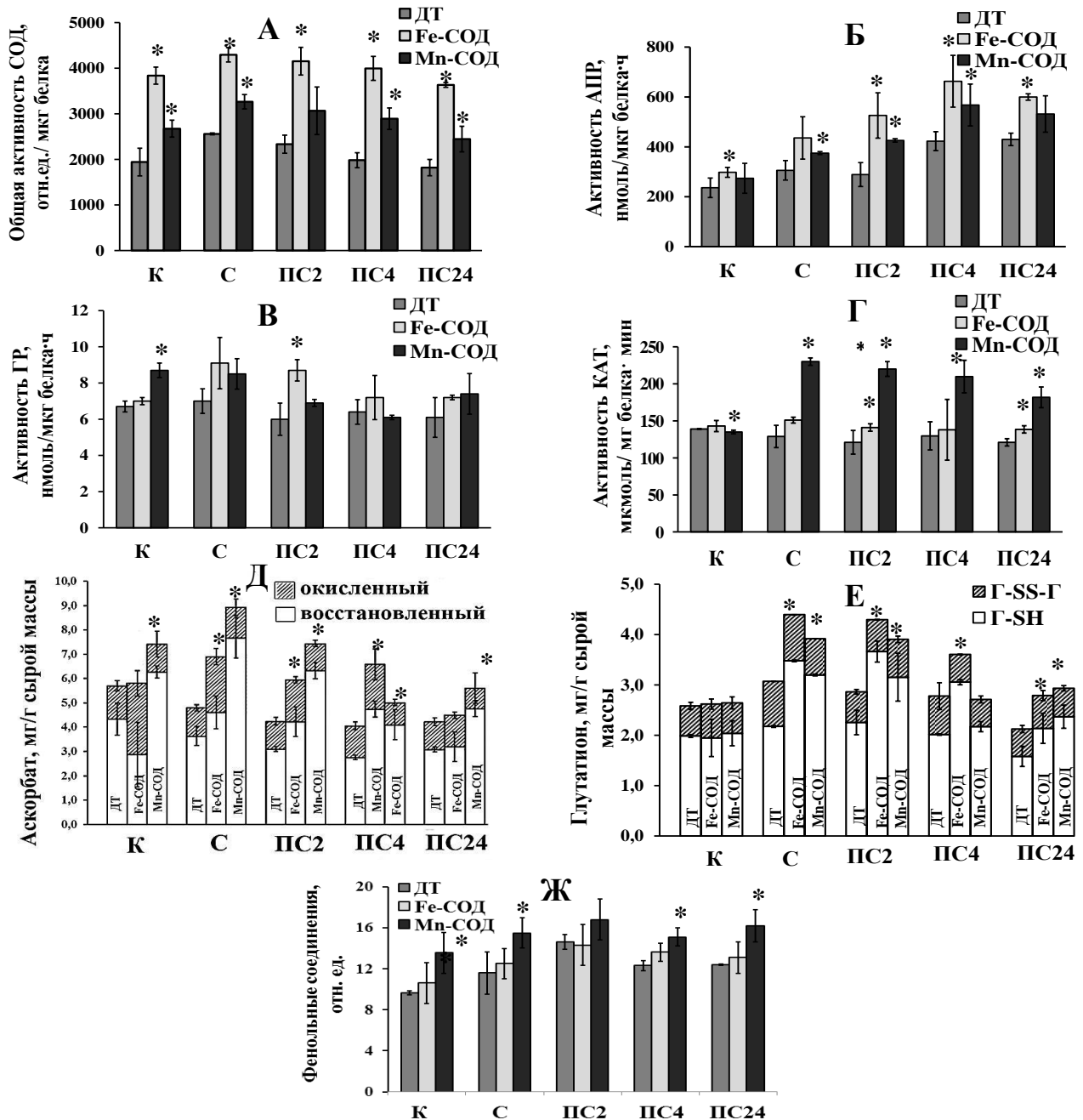
Вариант	Цитозольная АПР, отн. ед. (% к ДТ)	Хлоропластная АПР, отн. ед. (% к ДТ)
ДТ	$15,7\pm 0,3$ (100)	$7,5\pm 1,2$ (100)
Mn-СОД-трансформанты	$16,6\pm 0,2^*$ (106)	$8,4\pm 1,6$ (112)
Fe-СОД-трансформанты	$18,5\pm 0,7^*$ (118)	$11,9\pm 1,3^*$ (157)

В нормальных условиях выращивания в трансгенных по *MSD1* растениях была зафиксирована и повышенная на $30\pm 7\%$ по сравнению с ДТ активность ГР (рисунок 6В). Изменения общей активности КАТ – фермента, разрушающего H_2O_2 в пероксисомах и в митохондриях [Mhamdi, 2010], в Mn-СОД- и Fe-СОД-трансформантах не было зафиксировано (рисунок 6Г). Трансформация табака генами *MSD1* и *FSD2* не оказывала существенного влияния и на содержание глутатиона (рисунок 6Е). В то же время в Mn-СОД-трансформантах регистрировался высокий уровень аскорбата (рисунок 6Д) и фенольных соединений (рисунок 6Ж).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что трансформация растений табака генами *MSD1* и *FSD2* изменяет антиоксидантный статус клеток табака, а именно, активирует (потенцирует) антиоксидантную систему не только за счет возрастания активности СОД, но и за счет увеличения активности отдельных

компонентов антиоксидантной системы, участвующих в детоксикации пероксида водорода.

Функционирование антиоксидантной системы трансгенных растений при НТ стрессе. В условиях НТ стресса на свету общая активность СОД, АПР и ГР увеличивалась по сравнению с исходным уровнем во всех исследуемых растениях (рисунок 6А-В). Так, активность СОД при стрессе в трансгенных по *MSD1* и *FSD2* растениях превышала значение активности, зарегистрированное в ДТ, в 1,3 и в 1,7 раза соответственно.



ДТ – дикий тип, Fe-COD и Mn-COD – Fe-COD- и Mn-COD-трансформанты соответственно. К – контроль, С – стресс (+4°C, 22 ч, свет 160 мкмоль квантов·м⁻²·с⁻¹ с 14 ч фотопериодом); ПС 2, 4 и 24 – постстрессовый период через 2, 4 и 24 ч после прекращения действия стресса; *p<0,05

Рисунок 6. – Изменение общей активности СОД (А), АПР (Б), ГР (В) и КАТ (Г), содержания аскорбата (Д), глутатиона (Е), и фенолов (Ж) в 4-м листе растений табака при НТ стрессе и в ПС период

Активность АПР при НТ в Mn-СОД- и Fe-СОД-трансформантах была в 1,2 и 1,4 раза выше, а активность ГР – в 1,2 и 1,3 раза выше, чем в ДТ соответственно. В ДТ и в трансгенных по *FSD2* растениях активность КАТ практически не изменялась, в то время как в Mn-СОД-трансформантах активность данного фермента возрастала в 1,8 раза по сравнению с исходным уровнем (рисунок 6Г).

Полученные данные свидетельствуют о том, что в растениях табака с повышенной экспрессией *FSD2* детоксикация пероксида водорода происходит преимущественно за счет АПР, в то время как в растениях с повышенной экспрессией *MSD1* основную роль в детоксикации H_2O_2 играет КАТ.

При холодовом стрессе растения ДТ и трансформанты различались также по содержанию низкомолекулярных антиоксидантов – аскорбата, глутатиона и фенольных соединений (рисунок 6Д-Ж). Например, в ДТ при температуре $+4^{\circ}C$ содержание общего и восстановленного аскорбата снижалось на $20\pm 4\%$. Напротив, в трансгенных растениях обоих вариантов в таких условиях уровень как общего, так и восстановленного аскорбата возрастал. Наряду с увеличением уровня аскорбата в трансформантах при НТ стрессе происходило значительное увеличение количества глутатиона, а именно: содержание γ -SH увеличивалось на $70\pm 2\%$ и $60\pm 2\%$, а количество γ -SS- γ возрастало на $30\pm 7\%$ и $20\pm 3\%$ в Fe-СОД- и Mn-СОД-трансформантах по сравнению с исходным значением соответственно. Следует отметить, что при НТ стрессе трансгенные по *MSD1* растения характеризовались повышенным содержанием фенольных соединений (рисунок 6Ж).

В ПС период активности антиоксидантных ферментов (СОД, ГР, КАТ) и количество низкомолекулярных антиоксидантов во всех исследуемых растениях снижались (рисунок 6А, В-Ж). При этом в клеточных компартментах трансформантов наблюдалась синхронизация активностей СОД (включая активность дополнительной Mn-СОД или Fe-СОД) и ферментов, участвующих в детоксикации пероксида водорода – КАТ и АПР.

Таким образом, при НТ стрессе степень активации СОД, АПР, ГР и КАТ, а также уровни аскорбата, глутатиона и фенолов в трансгенных по *MSD1* и *FSD2* растениях табака значительно превышали аналогичные показатели в ДТ, что согласуется с низким уровнем АФК, продуктов ПОЛ и низкой проницаемостью мембран в данных растениях. Следует отметить, что растения, трансформированные *FSD2*, при НТ стрессе имели повышенную активность СОД, АПР и ГР и большее количество глутатиона по сравнению с растениями, трансформированными геном *MSD1*. Напротив, Mn-СОД-трансформанты при НТ обладали повышенной активностью КАТ и характеризовались более высоким содержанием аскорбата и водорастворимых фенольных соединений, чем трансгенные по *FSD2* растения. При этом в трансгенных по *MSD1* растениях накапливалось меньше АФК, продуктов ПОЛ и пероксида водорода при стрессе, чем в Fe-СОД-трансформантах, что может свидетельствовать о том, что трансформанты с внесенным геном *MSD1* являются более устойчивыми к НТ.

Изменение активности ФС2 растений табака при НТ стрессе

Существенных изменений в содержании каротиноидов (неоксантина, антраксантина, виолоксантина, лютеина и β -каротина) при НТ воздействии как на свету, так и в темноте во всех исследуемых растениях зафиксировано не было.

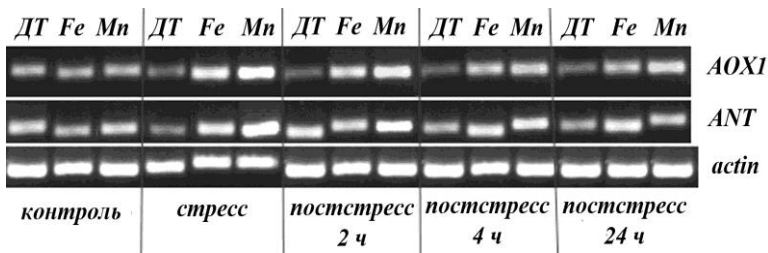
Установлено, что НТ стресс на свету ($+4^{\circ}\text{C}$, $160 \text{ мкмоль квантов}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ с 14 ч фотопериодом, 22 ч) существенно не влияет на параметры флуоресценции хлорофилла *a* во всех образцах. При этом в ДТ происходило незначительное снижение содержания хлорофиллов *a* и *b* (на 12 ± 4 и $9\pm 3\%$ соответственно), в трансформантах, напротив, уровень хлорофиллов практически не изменялся.

При действии НТ в темноте ($+4^{\circ}\text{C}$, 22 ч) происходило снижение функциональной активности ФС2, особенно в растениях ДТ. На это указывает увеличение параметра $(1-qP)$, отражающего долю восстановления первичного акцептора ФС2 Q_A , коэффициента нефотохимического тушения хлорофилла (qN), снижение скорости электронного транспорта (ETR) и незначительное снижение потенциального квантового выхода. В частности, параметр $(1-qP)$ при стрессе в условиях темноты увеличился в 2,5 раза в ДТ, в 1,6 раза – в Fe-СОД-трансформантах и в 1,1 раза – в Mn-СОД-трансформантах по сравнению с исходным уровнем. При этом показатель qN возрастал на $18\pm 8\%$ в ДТ, на $54\pm 10\%$ в Fe-СОД-трансформантах и практически не изменялся в трансгенных по *MSD1* растениях по сравнению с темновым контролем. Увеличение qN является механизмом защиты ФС2, которая наиболее чувствительна к температурному стрессу [Титов, 2009; Лукаткин, 2012]. В растениях ДТ в условиях стресса было также зафиксировано снижение скорости электронного транспорта на $32\pm 9\%$ по сравнению с исходным уровнем, в то время как в трансгенных растениях параметр ETR оставался практически неизменным. Отсутствие существенных изменений ETR в трансформантах может указывать на устойчивость их тилакоидных мембран к действию стрессового фактора. На это указывает также отсутствие изменения в содержании хлорофилла *a*, хлорофилла *b* и их соотношения в трансформантах при низкотемпературном стрессе в темноте.

Особенности экспрессии генов защитных белков (альтернативной оксидазы и АТФ/АДФ-антипортера) в трансгенных растениях табака в условиях НТ

Важную роль в защите растений от окислительного стресса играют защитные белки митохондрий, в частности, цианидрезистентная альтернативная оксидаза и АТФ/АДФ-антипортер [Грабельных, 2005].

Результаты исследований показали, что в условиях НТ стресса ($+4^{\circ}\text{C}$, 22 ч, свет $160 \text{ мкмоль квантов}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ с 14 ч фотопериодом) наиболее высокий уровень экспрессии *AOX1* и *ANT*, кодирующих альтернативную оксидазу и АТФ/АДФ-антипортер соответственно, был зафиксирован в Mn-СОД-трансформантах, что отчетливо видно после визуализации продуктов ПЦР-анализа (рисунок 7). В частности, в условиях стресса уровень экспрессии *AOX1* в ДТ снижался на $23\pm 15\%$, в то время как в Fe-СОД- и Mn-СОД-трансформантах – увеличивался на $37\pm 12\%$ и $58\pm 23\%$, соответственно, по



ДТ, Fe, Mn – растения дикого типа, Fe-СОД- и Mn-СОД-трансформанты соответственно. Контроль – нормальные условия выращивания (+25°C); стресс – +4°C, 22 ч, свет 160 мкмоль квантов·м⁻²·с⁻¹ с 14 ч фотопериодом; постстресс 2 ч, 4 ч и 24 ч – 2, 4, и 24 ч с момента прекращения действия стресса

Рисунок 7. – Электрофореграмма продуктов амплификации кДНК табака

экспрессии данного гена возрастал на 36±11%, а в Fe-СОД-трансформантах – на 28±8% относительно исходных значений. Через 2 ч после прекращения действия стрессового фактора уровень экспрессии *ANT* во всех исследуемых растениях увеличивался, причем, в Mn-СОД-трансформантах он был выше на 24±9% по сравнению с Fe-СОД-трансформантами и на 41±16% выше по сравнению с ДТ. Через 4 ч ПС периода уровень экспрессии гена АТФ/АДФ-антипортера постепенно снижался во всех исследуемых растениях. К 24 ч ПС периода данный показатель достигал исходных значений в ДТ и Mn-СОД-трансформантах, и оставался выше исходного уровня в Fe-СОД-трансформантах. Следует отметить, что изменение активности *AOX1* и *ANT* в ПС период ранее практически не изучалось [M. Ribas-Carbo et al., 2010]. Полученные нами результаты подтверждают важность этих белков в адаптации растений к стрессовым условиям и указывают на их большую роль при выходе растений из состояния стресса. Можно предположить, что активация защитных систем митохондрий в Mn-СОД-трансформантах способствует формированию в них повышенной устойчивости к НТ по сравнению с ДТ и Fe-СОД-трансформантами. Представленные в диссертации, а также имеющиеся в литературе данные, позволили нам разработать обобщающую схему, которая отражает механизмы формирования устойчивости трансгенных растений к действию НТ (рисунок 8). Согласно этой схеме, трансформация табака *MSD1* и *FSD2* приводит к повышению содержания СОД в клетках растений, активации СОД-аскорбат-глутатионового цикла. При НТ стрессе в различных компартментах растительной клетки трансформантов усиливается генерация АФК. Стрессовый сигнал посредством АФК-сенсоров передается в геном, после чего в клетках трансформантов происходит увеличение уровня экспрессии генов, кодирующих стрессовые белки, белки защитной системы и последующее дополнительное увеличение содержания низкомолекулярных антиоксидантов, антиоксидантных ферментов и стрессовых белков. В результате трансгенные растения характеризуются высокой эффективностью функционирования антиоксидантной системы, а именно: повышенной степенью

сравнению с исходными значениями, зарегистрированными до начала действия стрессового фактора. Через 24 ч ПС периода уровень экспрессии *AOX1* в ДТ оставался несколько ниже контроля, а в трансформантах достигал исходного значения в пределах погрешности измерений.

НТ стресс приводил к снижению уровня экспрессии *ANT* в растениях ДТ на 54±15% по сравнению с контролем. При этом в Mn-СОД-трансформантах уровень

активации антиоксидантных ферментов (СОД, АПР, ГР, а для Mn-СОД-трансформантов и КАТ), повышенным уровнем низкомолекулярных антиоксидантов (аскорбата, глутатиона, токоферола и фенольных соединений) в сравнении с ДТ. Вследствие вышеперечисленных факторов, окислительные процессы в трансгенных по *MSD1* и *FSD2* растениях протекают менее интенсивно, что выражается в более низком уровне АФК и продуктов ПОЛ, а также в более низкой проницаемости клеточных мембран к электролитам и свободным нуклеотидам по сравнению с ДТ. Кроме того, одним из механизмов формирования холоустойчивости трансгенных растений табака может быть активация в них цианидрезистентного дыхания, реализуемого за счет индукции экспрессии *AOX1*, кодирующего альтернативную оксидазу. В результате в трансгенных по *MSD1* и *FSD2* растениях в условиях НТ стресса отсутствуют потеря тургора, нарушение роста, дыхания и фотосинтеза. В постстрессовый период такие растения быстро восстанавливают свой метаболизм до нормального уровня (рисунок 8).

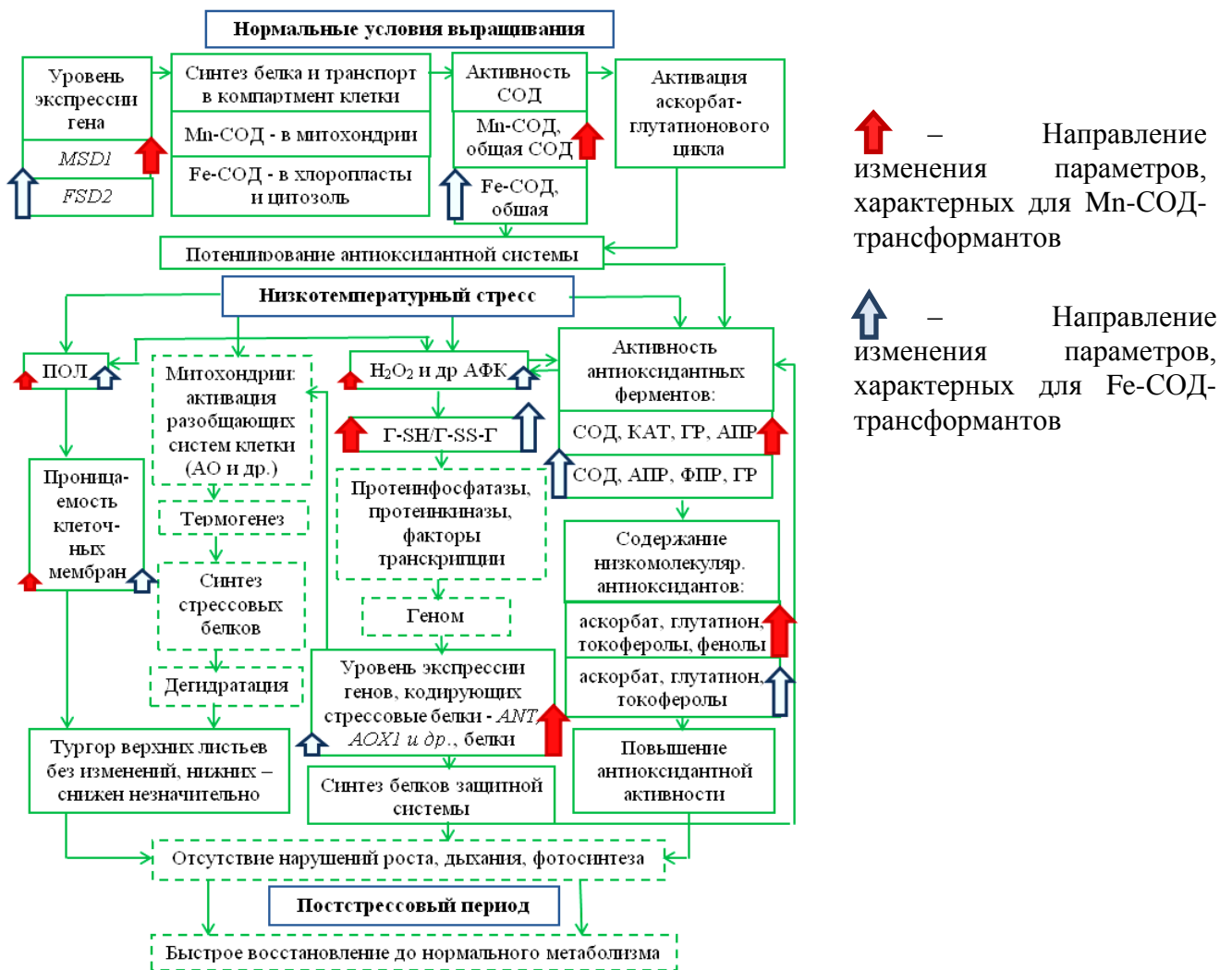


Схема разработана на основе собственных результатов и литературных данных (выделено пунктирной линией) [Колесниченко, 2003; Lukatkin et al., 2012; Grabelnych et al., 2004].

Рисунок 8 – Схема формирования устойчивости Mn-СОД- и Fe-СОД-трансформантов к НТ стрессу

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации:

1. Установлено, что трансформация растений табака генами *MSD1* и *FSD2* арабидопсиса активирует антиоксидантную систему, что выражается в повышенном содержании низкомолекулярных антиоксидантов (аскорбата и фенольных соединений), увеличенной активности антиоксидантных ферментов (СОД, АПР, ГР) и более низких уровнях АФК по сравнению с растениями ДТ [2, 5–7, 13, 23].

2. При НТ стрессе (+4°C, 22 ч) как в темноте, так и на свету трансгенные растения табака с повышенной экспрессией *MSD1* и *FSD2*, характеризуются меньшей интенсивностью окислительных процессов, что выражается в более низком уровне АФК и продуктов ПОЛ, а также в более низкой проницаемости клеточных мембран к электролитам и свободным нуклеотидам по сравнению с ДТ. В ПС период изменение содержания АФК проходит через максимум, величина которого зависит от природы трансформанта (Mn-СОД, Fe-СОД) и от светового режима, достигая к 24 ч ПС периода исходных значений. При этом окислительные процессы в трансгенных растениях быстрее нормализуются [1, 6, 8, 9, 14, 15, 18–21].

3. Формирование устойчивости трансгенных по *MSD1* и *FSD2* растений табака к НТ обеспечивается высокой эффективностью функционирования в них антиоксидантной системы, а именно: активацией антиоксидантных ферментов (СОД, АПР, ГР, а для Mn-СОД-трансформантов и КАТ) и повышением содержания низкомолекулярных антиоксидантов (аскорбата, глутатиона, токоферола и фенольных соединений) в сравнении с ДТ. В ПС период активность антиоксидантных ферментов и количество низкомолекулярных антиоксидантов снижаются. В клеточных компартментах трансформантов наблюдается синхронизация общей активности СОД (включая активность дополнительных изоформ Mn-СОД и Fe-СОД), продуктом реакции которой является пероксид водорода, и ферментов, участвующих в его детоксикации: увеличение активности митохондриальной СОД в Mn-СОД-трансформантах сопровождается активацией КАТ, а увеличение активности хлоропластной и цитозольной СОД в Fe-СОД-трансформантах – активацией соответствующих изоформ АПР [1, 2, 7, 10–13, 16–19, 23].

4. Показано, что воздействие НТ стресса (+4°C) в течение 22 ч на свету не приводит к существенному изменению активности ФС2 и пигментного состава в листьях трансгенных по *MSD1* и *FSD2* растений табака. В условиях НТ стресса в темноте в ДТ и трансформантах происходит снижение активности фотосинтетического аппарата. Сравнительный анализ параметров флуоресценции хлорофилла *a* показал, что фотосинтетический аппарат Mn-СОД-трансформантов и, в особенности, Fe-СОД-трансформантов лучше адаптируется к действию НТ по сравнению с растениями ДТ [3, 18].

5. Установлено, что Mn-СОД-трансформанты обладают более высокой холодоустойчивостью, чем Fe-СОД-трансформанты с преимущественной локализацией

Fe-СОД в цитозоле. Одним из механизмов формирования холодоустойчивости трансгенных по *MSD1* растений табака является активация в них цианид-резистентного дыхания, реализуемого за счет индукции экспрессии гена *AOX1*, кодирующего альтернативную оксидазу. Важную роль в ответной реакции трансгенных растений на НТ стресс играет АТФ-АДФ-антипортер. Уровень экспрессии гена *ANT*, кодирующего АТФ-АДФ-антипортер, в Fe-СОД-трансформантах и, особенно в Mn-СОД-трансформантах, был значительно выше, чем в ДТ [4, 22].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. Данные по снижению интенсивности окислительных процессов в растениях табака, трансформированных смысловым геном *MSD1* и *FSD2*, могут быть использованы в селекции при создании новых сортов сельскохозяйственных культур, обладающих повышенной устойчивостью к НТ стрессу.

2. Результаты исследований внедрены в учебный процесс Витебского государственного университета им. П.М. Машерова на кафедре ботаники биологического факультета (Акт внедрения от 27.04.2012 г.) и Белорусского государственного педагогического университета им. Танка на кафедре ботаники и основ сельского хозяйства (Акт внедрения от 28.02.2012 г.).

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных журналах

1. Павлючкова, С.М. Активность супероксиддисмутазы и окислительные процессы при низкотемпературном стрессе в растениях табака (*Nicotiana tabacum*), трансформированных смысловым геном супероксиддисмутазы (Fe-СОД) / С.М. Павлючкова, Н.В. Шалыго // Весці Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2011. – № 1. – С.57–61.

2. Павлючкова, С.М. Функционирование антиоксидантной системы в растениях табака (*Nicotiana tabacum*), трансформированных смысловым геном супероксиддисмутазы, при низкотемпературном стрессе / С.М. Павлючкова, Н.В. Шалыго // Весці Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук.– 2012. – № 2. – С.91–95.

3. Павлючкова, С.М. Активность фотосинтетического аппарата растений табака (*Nicotiana tabacum*), трансформированных смысловым геном супероксиддисмутазы при низкотемпературном стрессе / С.М. Павлючкова, Н.В. Шалыго // Весці Нац. акад. навук Беларусі. Сер.біял. навук. – 2013. – № 2. – С.80–86.

4. Павлючкова, С.М. Особенности экспрессии генов альтернативной оксидазы и АТФ/АДФ-антипортера в трансгенных растениях табака в условиях низкотемпературного стресса / С.М. Павлючкова, Н.В. Шалыго // Весці Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2014. – № 4. – С. 58–62.

5. Савина, С.М. Потенцирование антиоксидантной системы в трансгенных растениях табака с повышенной экспрессией супероксиддисмутазы / С.М. Савина, Н.В. Шалыго // Доклады НАН Беларусі. – 2015. – Т.59, № 5. – С. 62–67.

Статьи в материалах конференций

6. Павлючкова, С.М. Окислительные повреждения мембран растений табака, трансформированных смысловым геном митохондриальной супероксиддисмутазы, в условиях низкотемпературного стресса / С.М. Павлючкова, Е.В. Вязов, Н.В. Шалыго // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : сб. ст. IX съезда Белорус. обществ. объедин. фотобиол. и биоф., Минск, 23–25 июня 2010 г. : в 2-х т. / Ин-т биоф. и клет. инж. НАН Беларуси, Белорус. гос. ун-т, Белорус. обществ. объедин. фотобиол. и биоф. ; редкол.: И.Д. Волоотовский [и др.]. – Минск : Изд. центр БГУ, 2010. – Т. 2. – С. 129–131.

7. Павлючкова, С.М. Активность антиоксидантных ферментов в трансгенных по Mn-SOD растениях табака при низкотемпературном стрессе / С.М. Павлючкова // Растение и стресс : тезисы докладов Всероссийского симпозиума, Москва, 9-12 ноября 2010 г. / Российская акад. наук., Общество физиол. раст. России, Науч. Совет по физиол. раст. и фотосинтезу РАН, Ин-т физиол. раст. им. К.А. Тимирязева РАН ; редкол.: В.В. Кузнецов [и др.]. – Москва, 2010. – С. 265–266.

8. Павлючкова, С.М. Влияние низкотемпературного стресса на окислительные процессы в трансгенных по супероксиддисмутазе растениях табака / С.М. Павлючкова, Н.В. Шалыго // Роль физиологии и биохимии в интродукции и селекции овощных, плодово-ягодных и лекарственных растений : материалы международной научно-методической конференции, посвященной 130-летию со дня рождения С. И. Жегалова и 80-летию со дня создания лаборатории физиологии и биохимии растений ВНИИСОК, Москва, 25 февр. 2011 г. / РУДН ; редкол.: коллектив авторов – Москва, 2011. – С. 280–283.

9. Павлючкова, С.М. Динамика окислительных процессов в трансгенных по Fe-SOD и Mn-SOD растениях табака в условиях низкотемпературного стресса и в постстрессовый период / С.М. Павлючкова // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : сб. ст. X съезда Белорус. обществ. объедин. фотобиол. и биоф., Минск, 19–21 июня 2012 г. : в 2-х т. / Ин-т биоф. и клет. инж. НАН Беларуси, Белорус. гос. ун-т, Белорус. обществ. объедин. фотобиол. и биоф. ; редкол.: И.Д. Волоотовский [и др.]. – Минск : Изд. центр БГУ, 2012. – Т. 2. – С. 130–133.

10. Павлючкова, С.М. Динамика активности аскорбатпероксидазы и каталазы в трансгенных по Fe-SOD и Mn-SOD растениях табака при низкотемпературном стрессе и в постстрессовый период / С.М. Павлючкова // Научные, прикладные и образовательные аспекты физиологии, генетики и биотехнологии растений и микроорганизмов : сб. ст. XII Межд. науч. конф., Киев, 15–16 ноября 2012 г. – Киев, 2012. – С. 114–116.

11. Павлючкова, С.М. Содержание α - и γ -токоферола в растениях табака (*Nicotiana tabacum* L.), трансформированных смысловым геном супероксиддисмутазы, в условиях низкотемпературного стресса / С.М. Павлючкова, Н.В. Шалыго // Факторы устойчивости растений в экстремальных природных условиях и техногенной среде :

материалы Всероссийск. науч. конф., Иркутск, Россия, 10–13 июня 2013 г. – Иркутск : СИФИБР СО РАН, 2013. – С. 192–194.

12. Павлючкова, С.М. Внутриклеточная локализация супероксиддисмутазы в трансгенных по Fe-SOD и по Mn-SOD растениях табака / С.М. Павлючкова, Н.В. Шалыго // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : сб. ст. XI съезда Белорус. обществ. объедин. фотобиол. и биоф., Минск, 17–20 июня 2014 г. : в 2-х т. / Ин-т биоф. и клет. инж. НАН Беларуси, Белорус. гос. ун-т, Белорус. обществ. объедин. фотобиол. и биоф. ; редкол.: И.Д. Волотовский [и др.]. – Минск : Изд. центр БГУ, 2014. – Т. 2. – С. 119–121.

13. Савина, С.М. Содержание аскорбата, глутатиона и фенольных соединений в трансгенных по Mn-SOD и Fe-SOD растениях табака при низкотемпературном стрессе / С.М. Савина // Современные проблемы биохимии : сб. матер. конф. молодых ученых-биохимиков с междунар. участием, Гродно, 29 июля 2015 г. / отв. ред.: Л.И. Надольник. – Гродно : ГрГМУ, 2015. – С. 99–101.

Тезисы докладов

14. Павлючкова, С.М. Особенности окислительных процессов в трансгенных по митохондриальной супероксиддисмутазе (Mn-SOD) растениях табака при низкотемпературном стрессе / С.М. Павлючкова, Н.В. Шалыго // Регуляция роста, развития и продуктивности растений : материалы VI Международной научной конференции, Минск, 28–30 окт. 2009 г. / Нац. акад. наук Беларуси, Ин-т эксп. ботаники им. В.Ф. Купревича, Белорус. обществ. объедин. физиол. растен. ; редкол.: Н.А. Ламан [и др.]. – Минск, 2009. – С. 118.

15. Павлючкова, С.М. Содержание низкомолекулярных антиоксидантов и активность антиоксидантных ферментов в трансгенных по Fe-SOD растениях табака при низкотемпературном стрессе / С.М. Павлючкова // Биоантиоксидант : тезисы докладов VIII Международной научной конференции, Москва, 4–6 окт. 2010 г. / РУДН ; редкол.: коллектив авторов – Москва, 2011. – С. 351.

16. Павлючкова, С.М. Влияние низкотемпературного стресса на антиоксидантную систему растений табака (*Nicotiana tabacum*), трансформированных смысловым геном супероксиддисмутазы (Fe-SOD) / С.М. Павлючкова, Н.В. Шалыго // Фундаментальные и прикладные проблемы стресса : материалы II Международной научной конференции, Витебск, 21–22 апр. 2011. / Вит. гос. ун-т ; редкол.: А.П. Солодков [и др.]. – Витебск, 2011. – С. 197.

17. Павлючкова, С.М. Активность аскорбатпероксидазы при гипотермии в трансгенных растениях табака, трансформированных смысловым геном супероксиддисмутазы / Павлючкова, Н.В. Шалыго // Регуляция роста, развития и продуктивности растений : материалы VII Международной научной конференции, Минск, 26–28 окт. 2011 г. / Нац. акад. наук Беларуси, Ин-т эксп. ботаники им. В.Ф. Купревича, Белорус. обществ. объедин. физиол. растен. ; редкол.: Н.А. Ламан [и др.]. – Минск, 2011. – С. 118

18. Pavluchkova, S. Effects of chilling on tobacco plants transformed by sense gens of superoxide dismutase / S. Pavluchkova // Molecular biology: advances and perspectives : the materials of the 4th international IMBG conference for young scientists, Kyiv, Ukraine, 14–17 September 2011. – Kyiv, 2011. – P.128

19. Pauliuchkova, S. Over-expression of manganese superoxide dismutase in transgenic *Nicotiana tabacum* increases plant resistance to chilling / S. Pauliuchkova // Annual Main Meeting : program and abstract book, Salzburg, Austria, 29th June – 2nd July 2012 / Society for Experimental Biology. – Salzburg, 2012. – P. 266.

20. Pauliuchkova, S. Dynamics of oxidative processes in superoxide dismutase over-expressing tobacco plants during low temperature stress and post-stress period / S. Pauliuchkova // Oxidative stress and cell death in plants: mechanisms and implications : program and abstract book of SEB Plant Symposium, Florence, Italy, 26th – 28th June 2013 / Society for Experimental Biology. – Florence, 2013. – P. 32–33.

21. Павлючкова, С.М. Стрессорный ответ растений табака, трансформированных смысловым геном супероксиддисмутазы, на действие низкой положительной температуры / С.М. Павлючкова // Инновационные направления современной физиологии растений : материалы Всероссийск. симпозиума с междунар. участием, Москва, Россия, 2–6 июня 2013 г. – Москва, 2013. – С. 314.

22. Павлючкова, С.М. Экспрессия генов *AOX1* и *ANT* в растениях табака, трансформированных смысловым геном супероксиддисмутазы, при действии низкой положительной температуры / С.М. Павлючкова // Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений : тезисы докладов I международного симпозиума, Казань, Россия, 17–20 сентября 2013 г. – Казань, 2013. – С.110.

23. Савина, С.М. Активность антиоксидантных ферментов в Mn-СОД И Fe-СОД трансформантах табака / С.М. Савина, Н.В. Шалыго // Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий : сб. ст. междунар. науч. конф., Петрозаводск, Россия, 21–26 сентября 2015 г. – Петрозаводск, 2015. – С. 463

РЭЗІЮМЭ
САВІНА СВЯТЛАНА МІХАЙЛАЎНА

Акісляльныя працэсы пры нізкатэмпературным стрэсе і ў постстрэсавы перыяд у раслінах тытуню, трансфармаваных сэнсавым генам супераксідысмутазы

Ключавыя словы: тытунь, супераксідысмутаза, нізкатэмпературны стрэс, трансгенныя расліны, антыаксідантная сістэма, антыаксіданты, актыўныя формы кіслароду (АФК), акісляльныя працэсы.

Мэта працы: выявіць механізмы функцыянавання антыаксідантнай сістэмы і фотасінтэтычнага апарату ў трансгенных па *MSD1* і *FSD2* раслінах тытуню пры нізкатэмпературным стрэсе і ў постстрэсавы перыяд.

Метады даследавання: біяхімічныя, малекулярна-генетычныя, біяфізічныя метады, якія ўключаюць гель-электрафарэз, імунаблотынг, спектрафотаметрыю, флуарыметрыю, ПЛР-аналіз, ВЭВХ.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: устаноўлена, што трансфармацыя раслін тытуню (*Nicotiana tabacum* L.) сэнсавымі генамі мітахандрыяльнай супераксідысмутазы (САД) і хларапластнай САД арабідопсіса (*Arabidopsis thaliana* L.) (*MSD1* і *FSD2* адпаведна), патэнцыруе антыаксідантную сістэму, што выяўляецца ў павелічэнні ўзроўняў нізкамалекулярных антыаксідантаў, актыўнасці антыаксідантных ферментаў і больш нізкіх узроўняў АФК у параўнанні з раслінамі дзікага тыпу. Ва ўмовах нізкатэмпературнага стрэсу (+4°C, 22 г) у трансгенных па *MSD1* і *FSD2* раслінах тытуню акісляльныя працэсы праходзяць менш інтэнсіўна, а у постстрэсавы перыяд хутчэй нармалізуюцца. Пры ўздзеянні нізкай тэмпературы ў трансфармантах актыўнасць САД, АПР, КАТ і ГР павялічваецца, а ўзроўні нізкамалекулярных антыаксідантаў узрастаюць у параўнанні з дзікім тыпам. Пры гэтым у клеткавых кампартментах назіраецца сінхранізацыя агульнай актыўнасці САД (уключаючы актыўнасць дадатковай САД), прадуктам рэакцыі якой з'яўляецца пераксід вадароду, і ферментаў, якія ўдзельнічаюць у яго дэтаксікацыі. Трансфармацыя раслін тытуню *MSD1* і *FSD2* арабідопсіса практычна не змяняе актыўнасці фотасінтэтычнага апарату, аднак прыводзіць да ўзрастання ўзроўняў экспрэсіі генаў ахоўных бялкоў (альтэрнатыўнай цыанід рэзістэнтнай аксідазы і АТФ/АДФ-антыпортэру). У цэлым, Mn-САД-трансфарманты валодаюць больш высокай холадаўстойлівасцю, чым Fe-САД-трансфарманты.

Ступень выкарыстання: Вынікі даследаванняў выкарыстоўваюцца ў навучальным працэсе Віцебскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя П.М. Машэрава і Беларускага дзяржаўнага педагагічнага ўніверсітэта імя М. Танка.

Вобласць ужывання: біяфізіка, фізіялогія і біяхімія раслін, сельская гаспадарка.

РЕЗЮМЕ

САВИНА СВЕТЛАНА МИХАЙЛОВНА

Окислительные процессы при низкотемпературном стрессе и в постстрессовый период в растениях табака, трансформированных смысловым геном супероксиддисмутазы

Ключевые слова: табак, супероксиддисмутаза, низкотемпературный стресс, трансгенные растения, антиоксидантная система, антиоксиданты, активные формы кислорода (АФК), окислительные процессы.

Цель работы: выявить механизмы функционирования защитной системы и фотосинтетического аппарата в трансгенных по *MSD1* и *FSD2* растениях табака при низкотемпературном стрессе и в постстрессовый период.

Методы исследования: биохимические, молекулярно-генетические, биофизические, включающие гель-электрофорез, иммуноблоттинг, спектрофотометрию, флуориметрию, ПЦР-анализ, ВЭЖХ.

Полученные результаты и их новизна: Установлено, что трансформация растений табака (*Nicotiana tabacum* L.) смысловыми генами митохондриальной СОД и хлоропластной СОД арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* L.) (*MSD1* и *FSD2* соответственно), потенцирует антиоксидантную систему, что выражается в возрастании уровней низкомолекулярных антиоксидантов, увеличении активности антиоксидантных ферментов и в более низких уровнях АФК по сравнению с растениями дикого типа. В условиях низкотемпературного стресса (+4°C, 22 ч) в трансгенных по *MSD1* и *FSD2* растениях табака окислительные процессы протекают менее интенсивно, а в постстрессовый период быстрее нормализуются. При действии низкой температуры в трансформантах активность СОД, АПР, КАТ и ГР увеличивается, а уровни низкомолекулярных антиоксидантов (аскорбата, глутатиона, токоферола, фенолов) возрастают по сравнению с диким типом. При этом в клеточных компартментах наблюдается синхронизация общей активности СОД (включая дополнительную активность СОД), продуктом реакции которой является пероксид водорода, и ферментов, участвующих в его детоксикации. Трансформация растений табака *MSD1* и *FSD2* арабидопсиса практически не изменяет активность фотосинтетического аппарата, однако приводит к возрастанию уровней экспрессии генов защитных белков (альтернативной цианидрезистентной оксидазы и АТФ/АДФ-антипортера). В целом, Mn-СОД-трансформанты обладают более высокой холодоустойчивостью, чем Fe-СОД-трансформанты.

Степень использования: Результаты исследований внедрены в учебный процесс Витебского государственного университета им. П.М. Машерова и Белорусского государственного педагогического университета им. М. Танка.

Область применения: биофизика, физиология и биохимия растений, сельское хозяйство.

SUMMARY
SAVINA SVETLANA

Oxidative processes in tobacco plants transformed with the semantic gene of superoxide dismutase under low-temperature stress and in post-stress period

Keywords: tobacco, superoxide dismutase, low temperature stress, transgenic plants, antioxidant system, antioxidants, reactive oxygen species, oxidative processes.

Objective: to identify the mechanisms of the functioning of antioxidant system and photosynthetic apparatus in Mn-SOD- and Fe-SOD-overproducing transgenic tobacco plants under low temperature stress and post-stress period.

Methods: complex biochemical, biophysical, and molecular genetic techniques, including gel electrophoresis, immunoblotting, spectrophotometry, fluorimetry, PCR, HPLC were used.

The results and their novelty: It is found that genetic transformation of *Nicotiana tabacum* L. plants with *MSD1* and *FSD2 Arabidopsis thaliana* L. genes leads to potentiation of antioxidant system in cellular compartments, resulting in increasing of antioxidants levels, antioxidant enzyme activity and lower ROS level compared with wild-type plants. The oxidative processes in transgenic tobacco plants proceed less intensively under low temperature stress (+ 4°C, 22 h) and normalized more quickly during post-stress period. The activities of SOD, APX, CAT and GR and low molecular weight antioxidants levels are increasing during low temperature stress in transformants as compared with wild type. In the cellular compartments observed synchronization between total SOD activity (including additional SOD activity), that produced hydrogen in the dismutation reaction, and enzymes involved in hydrogen peroxide detoxification. Transformation of tobacco plants by *Arabidopsis thaliana* L. *MSD1* и *FSD2* genes does not changes the photosynthetic apparatus activity practically, however, increases the gene expression levels of protective proteins (alternative oxidase and ATP/ADP-antiporter). In general Mn-SOD-transformants have a higher cold resistance than Fe-SOD-transformants.

Extent of application: The research results are introduced into the educational process of Vitebsk State University named after P.M. Masherov and Belarusian State Pedagogical University named after Maxim Tank.

The field of application: biophysics, physiology and biochemistry of plants and agriculture.

