

Влияние регуляторов роста и развития растений на ростовые показатели и антиоксидантный статус проростков пшеницы

Андропова Виктория Николаевна

9 класс, МБОУ Школа № 113 Нижнего Новгорода

Научный руководитель: Тарасов Сергей Сергеевич, педагог ДО ГБУ ДО

ЦМИНК «Кванториум»; старший преподаватель кафедры ботаники, физиологии и защиты растений ФГБОУ ВО Нижегородская ГСХА

*Работа посвящена изучению реакции ферментативной антиоксидантной системы пшеницы (*Triticum aestivum*) при выращивании ее на различных биопрепаратах, являющихся отходами животноводства и растениеводства: экстракт вешенки, бактерии *Bacillus* и их композиции. Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли в проростках с помощью нитросинего тетразолия, а активность каталазы (КАТ) - спектрофотометрически. Выявлено, что активность СОД и КАТ в проростках, культивируемых на бактериальном препарате и композиции бактериального препарата и экстракта вешенки была меньше контроля, а у проростков, культивируемых с применением экстракта, активность исследуемых ферментов была выше, чем на контрольных образцах.*

*Также был проведен биоинформатический анализ, который показал, фермент супероксиддисмутазы пшеницы имеет множество изоформ, его структурная организация представлена димером и имеет высокую изменчивость. Гены СОД и КАТ, вероятнее всего, являются адаптационными, а их структурные изменения обусловлены идиоадаптацией к особенностям среды обитания, тем временем гены актина (*Act*) меняются гораздо реже, а их мутации связаны с ароморфозами всего генетического аппарата растений.*

Применение регуляторов роста и развития растения являются важным направлением современных агропромышленности и биотехнологии. Жизненно важными генами, можно назвать гены антиоксидантной защиты, в особенности кодирующие супероксиддисмутазу и каталазу.

Цель. Исследовать влияние микробиологических препаратов на основе *Bacillus*, экстракта вешенки и композиции *Bacillus* + экстракт вешенки на ростовые показатели и активность антиоксидантных ферментов пшеницы.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Выявить влияние бактерий рода *Bacillus* и экстракта вешенки на ростовые и морфометрические показатели проростков пшеницы.
2. Исследовать влияние бактерий и экстракта вешенки на активность супероксиддисмутазы (СОД).
3. Исследовать влияние бактерий и экстракта вешенки на активность каталазы (КАТ).
4. Провести биоинформатический анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей генов и белков антиоксидантной защиты.

Материалы и методы

Объектами исследования послужили недельные проростки, культивируемые на бактериальном препарате, который является 50 процентным раствором (маточной суспензии 10^7 КОЕ на основе *Bacillus subtilis*), 10% экстракте вешенки и композиции экстракта вешенки и бактериального препарата. Эксперимент проводился в 3 биологических повторностях, в каждой выборке было по 50 семян пшеницы. Растения культивировали в течение 7 суток на соответствующих растворах. Исследование in-vitro проводили на недельных проростках пшеницы.

Исследовали влияние бактериального препарата на основе *Bacillus*, биостимулятора на основе экстракта отработанного соломенного субстрата вешенки, полученного путем высушивания отработанного субстрата с последующей экстракцией в воде. По окончании экспозиции определяли активность СОД с использованием нитросинего тетразолия (НСТ), каталазу в проростках определяли спектрофотометрически.

Для разработки генетических конструкций in-silico редактирования генов работали с нуклеотидными и аминокислотными последовательностями растений, фитогормонов и ферментов антиоксидантной системы из «The Nucleotide database» (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>). Были использованы методики BLAST поиска нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, методика попарного и множественного выравнивания нуклеотидных и аминокислотных последовательностей.

Результаты

Установлено, что максимальная активность исследуемых ферментов (СОД и КАТ) наблюдалась у пшеницы, прорастающей на 10% экстракте вешенки, у растений, культивируемых на 50% бактериальном препарате и композиции препарата и вешенки, активность ферментов была ниже контроля ($P \leq 0,05$) (Рис. 1).

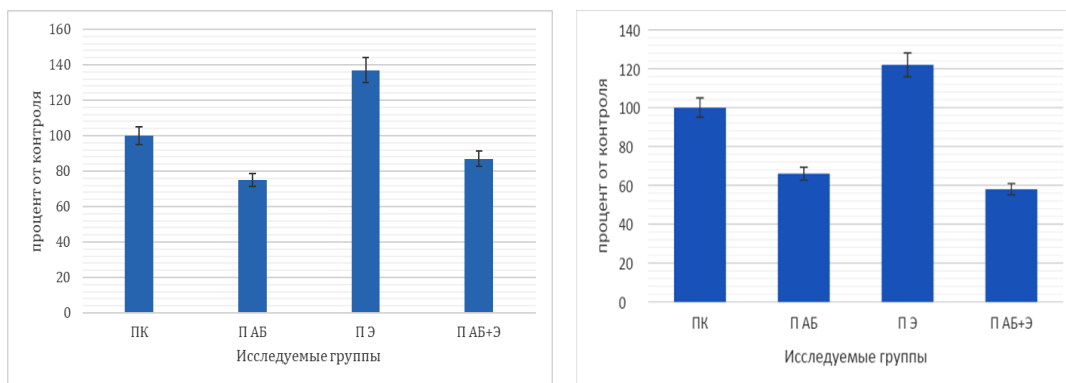


Рис. 1. Активность СОД (слева) и КАТ (справа) в листьях проростков пшеницы в зависимости от условий культивирования, где ПК – контроль, П АБ – бактериальный препарат, ПЭ – экстракт шенки, а П АБ+Э – композиция бактериального препарата и экстракта шенки.

Был проведен биоинформатический анализ генов ферментов СОД-1, СОД-2 и каталазы пшеницы. Информация о гене MnSOD имела в 211 записях, что делает данный ген самым изученным у пшеницы среди всех СОД. При анализе файла множественного выравнивания выявлено, что большинство отличий имеет незначительный однонуклеотидный характер, однако последовательности под номерами: AF092524.1, KP13757.1 и KP96754.1 имеют делецию из 18 нуклеотидов в диапазоне: 54–71 нуклеотид, соответствующих 6 аминокислотам (рис. 2, слева).

Исследования в структурной организации молекул антиоксидантных ферментов пшеницы показали некоторые отличия в их структуре. С помощью программы PSIPRED я получила модели вторичной структуры исследуемых ферментов (рис. 2, справа).

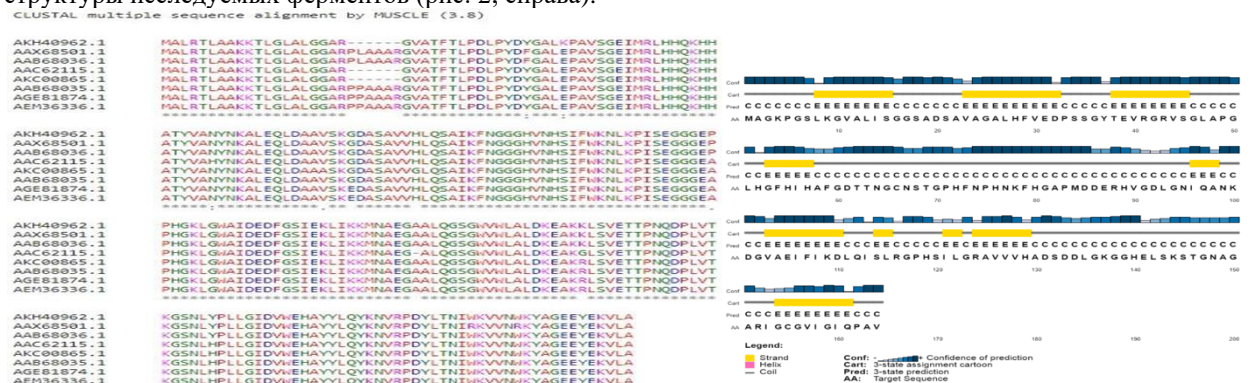


Рис. 2. Слева – множественное выравнивание аминокислотных последовательностей MnSOD пшеницы. Справа – вторичная структура СОД 1 пшеницы.

Молекулы СОД-1 исследуемых растений имеют только складчатую организацию вторичной структуры, у пшеницы данный фермент состоит из 164 аминокислот, 10 областей со складчатой структурой, организованных 56 аминокислотами (рис. 3, слева). СОД-2 имеет большие размеры, чем СОД-1. КАТ пшеницы имеет длину 529 аминокислоты, 10 спиральных областей и 28 складчатых областей. Трехмерная организация исследуемых ферментов гороха и пшеницы, полученная с использованием программы Swiss-Model, показала, что молекулы SOD-1 исследуемых растений состоят из 2-х субъединиц (рис. 3, справа).

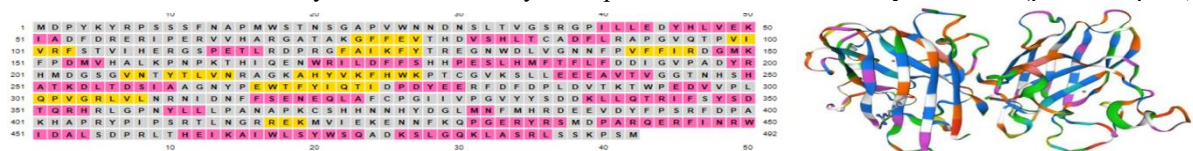


Рис. 3. Слева – вторичная структура КАТ пшеницы. Справа – трехмерная структура гена СОД-1 пшеницы.

Было произведено моделирование третичной структуры белка. Если вторичная структура каталазы представлена преимущественно складчатостями, то в третичной будет представлена тетрамером. В третичной структуре спиралей больше, неопределенных последовательностей и складчатостей больше, соответственно. Третичная структура состоит из 2 пучков вторичной структуры в овальном виде. (Рис. 4, слева). Также был найден активный центр каталазы, то есть фрагмент, где каталаза связывается с веществом (рис. 4, справа).



Рис. 4. Слева – третичная структура белка каталазы. Справа – молекула каталазы с активным центром.

Были построены филогенетические деревья по каталазе и актину (рис. 5). Четко видны различия между изменчивостью фермента АОС и белка, который является основным элементом цитоскелета растительной клетки. Были взяты группы растений из разных ареалов и разными приспособлениями к окружающей среде. Филогенетический анализ показал, что гены САТ вероятнее всего являются адаптационными, а их структурные изменения обусловлены приспособительными механизмами растений (идеоадаптация) к особенностям среды обитания, тем временем ген Акт меняется гораздо реже, а его мутации связаны с ароморфозами всего генетического аппарата растений.



Рис. 5. Слева – филогенетическое дерево актина. Справа – филогенетическое дерево по каталазе.

Выводы

1. Установлено усиление энергии прорастания семян пшеницы, культивируемых с применением экстракта вешенки, препарат бацилл ингибировал энергию прорастания. Активность СОД была максимальной в семенах пшеницы, выращенной с применением экстракта, а в семенах растений, выращенных с применением препарата бацилл, была ниже контроля.
2. Активность КАТ имела схожую динамику с активностью СОД.
3. Проведенный биоинформатический анализ показал, что супероксиддисмутаза пшеницы имеет множество изоформ, ее структурная организация представлена димером и имеет высокую изменчивость.
4. Филогенетический анализ показал, что гены КАТ вероятнее всего являются адаптационными, а их структурные изменения обусловлены приспособительными механизмами растений (идеоадаптация) к особенностям среды обитания, тем временем гены актина меняются гораздо реже и их мутации связаны с ароморфозами всего генетического аппарата растений.

Литература

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика. 1999. 459 с.
2. Донцов В.И., Крутько В.Н., Мрикаев Б.М., Уханов С.В. Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии и естественном старении // Труды ИСА РАН 2006. Т. 19. С.

3. Ерофеева Е.А., Речкин А.И., Савинов А.Б. Всхожесть семян и состояние проростков пшеницы *Triticum aestivum* в условиях воздействия на них суспензии клеток *Azotobacter chroococcum* // Принципы экологии. 2019. № 2. С. 4-11. DOI: 10.15393/j1.art.2019.8405
4. Кириченко Е.В. Биологическая активность ризосферной почвы пшеницы яровой в ассоциации с бактериями *Azotobacter chroococcum* T79, модифицированными N-ацетил-D-глюкозамином // Мікробіологія і біотехнологія. 2016. № 3. С. 30-42.
5. Кароматов И.Д. Медицинское значение грибов вешенки.
6. Полесская О.Г., Каширина Е.И., Алехина Н.Д. Изменение активности антиоксидантных ферментов в листьях и корнях пшеницы в зависимости от формы и дозы азота в среде // Физиология растений. 2004. Т. 51. С. 686-691.
7. Тарасов С.С., Михалев Е.В., Крутова Е.К., Веселов А.П., Корягин А.С. Технологии создания кормов и сложных органических удобрений на основе отходов грибоводства // Естественные и технические науки №. 2019. С. 52-55.
8. Феоктистова Н.В., Марданова А.М., Хадиева Г.Ф., Шарипова М.Р. Ризосферные бактерии // Ученые записки Казанского университета. Сер. Естественные науки. 2016. Т. 158. Кн. 2. С. 207-224.
9. Asada K. The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons // Annu. Rev. Plant Biol. 1999. Vol. 50 (1). P. 601-639.
10. Beauchamp C.H., Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // Anal. Biochem. 1971. V. 44. P. 276-287.
11. Bobrovskikh A, Zubairova U, Kolodkin A, Doroshkov A. Subcellular compartmentalization of the plant antioxidant system: an integrated overview // PeerJ. 2020 Jul 16;8:e9451. doi: 10.7717/peerj.9451. PMID: 32742779; PMCID: PMC7369019.
12. Campobenedetto C., Grange E., Mannino G., van Arkel J., Beekwilder J., Karlova R., Garabello C., Contartese V., Berteà C.M. A Biostimulant Seed Treatment Improved Heat Stress Tolerance During Cucumber Seed Germination by Acting on the Antioxidant System and Glyoxylate Cycle // Front Plant Sci. 2020 Jun 17;11:836. doi:10.3389/fpls.2020.00836