

УДК 577.15:581.13:581.19

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ИОНОВ НИКЕЛЯ(II) В ПОЧВЕ НА ОБЩУЮ АНТИОКСИДАНТНУЮ АКТИВНОСТЬ И СОСТОЯНИЕ КОМПОНЕНТОВ АСКОРБАТ-ГЛУТАТИОНОВОГО ЦИКЛА В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ *NICOTIANA TABACUM*

К. В. ПРИСТУПА¹⁾, Т. А. КУКУЛЯНСКАЯ¹⁾, Е. А. ХРАМЦОВА¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Проведен сравнительный анализ некоторых биохимических характеристик нетрансгенных и трансгенных растений *Nicotiana tabacum*, выращенных в почве с повышенной концентрацией ионов никеля(II). Трансгенные растения несли в своем геноме бактериальный ген *acdS*, который кодирует фермент 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдеаминазу (АЦК-деаминазу). Обработка почвы ионами никеля приводила к индукции экспрессии гена *acdS* и повышению активности АЦК-деаминазы в трансгенных растениях. Также продемонстрировано, что в условиях абиотического стресса в исследуемых растениях возрастала общая антиоксидантная активность, увеличивалось содержание аскорбиновой кислоты, глутатиона, аскорбатпероксидазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы.

Ключевые слова: антиоксидантная система; аскорбат-глутатионовый цикл; ген *acdS*; *Nicotiana tabacum*.

Образец цитирования:

Приступа КВ, Кукулянская ТА, Храмцова ЕА. Изучение влияния ионов никеля(II) в почве на общую антиоксидантную активность и состояние компонентов аскорбат-глутатионного цикла в трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022;1:39–47.

For citation:

Pristupa KV, Kukulienskaya TA, Khramtsova EA. The influence of nickel(II) ions in soil on total antioxidant activity and components of the ascorbat-glutathione cycle in transgenic plants *Nicotiana tabacum*. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022;1:39–47. Russian.

Авторы:

Кристина Владимировна Приступа – аспирантка кафедры биохимии биологического факультета. Научный руководитель – Т. А. Кукулянская.

Татьяна Александровна Кукулянская – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры биохимии биологического факультета.

Елена Аркадьевна Храмцова – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры генетики биологического факультета.

Authors:

Kristina V. Pristupa, postgraduate student at the department of biochemistry, faculty of biology.

kristina.pristupa@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0003-1977-4949>

Tatsiana A. Kukulienskaya, PhD (biology), docent; associate professor at the department of biochemistry, faculty of biology. tak14@tut.by

<https://orcid.org/0000-0002-4204-658X>

Elena A. Khramtsova, PhD (biology), docent; associate professor at the department of genetics, faculty of biology.

elena_khramtsova@inbox.ru

THE INFLUENCE OF NICKEL(II) IONS IN SOIL ON TOTAL ANTIOXIDANT ACTIVITY AND COMPONENTS OF THE ASCORBATE-GLUTATHIONE CYCLE IN TRANSGENIC PLANTS *NICOTIANA TABACUM*

K. V. PRISTUPA^a, T. A. KUKULIANSKAYA^a, E. A. KHRAMTSOVA^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: K. V. Pristupa (kristina.pristupa@mail.ru)

We conducted a comparative analysis of some biochemical parameters in non-transgenic and transgenic plants *Nicotiana tabacum*, cultivated in soil with an increased concentration of nickel(II) ions. Transgenic plants had in their genome a bacterial *acdS*-gene encoding the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACC-deaminase) enzyme. The introduction of elevated concentrations of nickel ions into the soil promotes induction of the *acdS*-gene expression and an increase in ACC-deaminase activity in transgenic plants. It was shown that the total antioxidant activity and the content of ascorbic acid, glutathione, ascorbate peroxidase, glutathione peroxidase and glutathione reductase increased in plants under abiotic stress.

Keywords: antioxidant system; ascorbate-glutathione cycle; *acdS*-gene; *Nicotiana tabacum*.

Введение

Повышение устойчивости сельскохозяйственных и декоративных растений к воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды является одной из важнейших задач, которые стоят перед учеными разных стран в настоящее время. Данное направление актуально в связи с усиливающимся техногенным воздействием на природные сообщества, экосистемы и ухудшением экологической обстановки на территориях, занятых сельскохозяйственным производством. Растения, произрастающие в неблагоприятных условиях, подвергаются абиотическому стрессу, что может быть обусловлено такими факторами, как загрязнение почв тяжелыми металлами, засоление, нарушение водного режима и др. [1; 2].

Следует отметить, что ионы никеля(II), входящие в состав Ni-зависимых ферментов (например, уреазы), в небольших количествах необходимы для нормального функционирования растений. Однако в высоких концентрациях они оказывают негативное воздействие на жизнедеятельность растительного организма. Во-первых, ионы никеля способны образовывать высокоспецифичные связи с функциональными группами и нарушать структуру молекул, во-вторых, они обуславливают нарушение ионного гомеостаза и изменение барьерных свойств мембран, а в-третьих, вызывают повреждение ядра, нарушают синтез РНК [3]. Кроме того, избыточное количество ионов никеля приводит к возрастанию продукции активных форм кислорода (АФК) в растительных клетках и, как следствие, повышению интенсивности свободнорадикальных окислительных процессов. АФК подавляют активность ряда ферментов, вызывают деградацию клеточных биополимеров, нарушают проницаемость биологических мембран, останавливают клеточный цикл и способствуют развитию апоптоза. В ответ на усиление генерации АФК, как правило, активируются ферментативные компоненты антиоксидантной защитной системы и увеличивается содержание низкомолекулярных антиоксидантов, повышается интенсивность перекисного окисления липидов [4; 5].

Известно, что развитие абиотического стресса сопровождается образованием в растениях избыточного количества этилена – фитогормона, который участвует в регуляции прорастания семян, роста корней и стеблей, образования цветков, созревания плодов. Однако его чрезмерное накопление приводит к изменению параметров роста и развития растений.

Одним из современных способов снижения избыточного количества этилена в растениях является создание трансгенных форм, которые несут в своем геноме бактериальный ген *acdS*, кодирующий 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдеамиразу (АЦК-деамиразу). Данный фермент катализирует разложение предшественника этилена – 1-аминоциклопропан-1-карбоксилата (АЦК) – до аммиака и α -кетобутирата, которые не оказывают негативного влияния на растения [6; 7].

Функционирование антиоксидантной системы в значительной степени повышает устойчивость растений к неблагоприятным факторам окружающей среды. Во многих странах мира проводится изучение антиоксидантной активности растений под влиянием стрессовых воздействий, создаются трансгенные растения, которые отличаются сверхэкспрессией генов, кодирующих компоненты аскорбат-глутатионового цикла [8]. Механизм функционирования последнего заключается в восстановлении пероксида водорода до воды с участием аскорбиновой кислоты и аскорбатпероксидазы [9].

Данные об изменении состояния и эффективности антистрессового действия аскорбат-глутатионовой системы получены также для ряда растений, инокулированных бактериями, которые имеют ген *acdS*

в своем геноме [10]. Однако изучение общей антиоксидантной активности и компонентов аскорбат-глутатионового цикла трансгенных растений, несущих данный ген, в условиях загрязнения почвы ионами никеля не проводилось.

Целью настоящей работы является изучение влияния ионов никеля, внесенных в почву, на общую антиоксидантную активность, а также активность ряда ферментов и содержание неферментативных антиоксидантов аскорбат-глутатионового цикла в нетрансгенных и трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*, несущих ген *acdS* бактерий *Pseudomonas putida* В-37.

Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследования выступали нетрансгенные и трансгенные растения *N. tabacum*, несущие ген *acdS* бактерий *P. putida* В-37. Предметом исследования являлись общая антиоксидантная активность данных растений, активность ферментов аскорбат-глутатионового цикла (аскорбатпероксидазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы) и содержание низкомолекулярных антиоксидантов (аскорбиновой кислоты, глутатиона) в растениях *N. tabacum*.

Исследуемые растения были разделены на две серии:

- контрольную (без обработки почвы);
- опытную (однократная обработка почвы NiCl_2 в концентрации 20 мкг на 1 кг почвы).

Каждая серия включала в себя 10 трансгенных растений линий 4-12 и 10-38, а также 10 нетрансгенных растений *N. tabacum*.

Создание трансгенных растений осуществлялось согласно методике, описанной А. А. Мельниковой и соавторами [11]. Линии трансгенных растений *N. tabacum* 4-12 и 10-38 были получены с использованием векторной конструкции *pBI121acdS*, несущей ген *acdS* бактерий *P. putida* В-37, который находится под контролем конститутивного промотора *CaMV 35S*. Генетическая конструкция введена в клетки *Agrobacterium tumefaciens* AGL0. Полученный агробактериальный штамм использован для трансформации каллусов *N. tabacum*.

Линии растений 4-12 и 10-38 были получены с разных трансформированных клонов, поэтому различались между собой на уровне ДНК по локусу внедрения и, соответственно, проявлению функций целевого гена, его взаимодействию с другими генами, а также влиянию на растения.

Растения линии 10-38 имели более высокие ($p \leq 0,05$) ростовые характеристики стебля ($(44,50 \pm 0,13)$ см) по сравнению с растениями линии 4-12 ($(40,00 \pm 0,09)$ см). Также растения линии 10-38 отличались большими ($p \leq 0,05$) длиной корня ($(1,90 \pm 0,12)$ см) и биомассой ($(23,20 \pm 0,06)$ г), чем растения линии 4-12 ($(1,5 \pm 0,1)$ см и $(20,40 \pm 0,03)$ г соответственно).

Семена растений стерильно высевали на увлажненные фильтры и в течение 2 сут выдерживали в темноте при $(20,0 \pm 0,5)$ °С для прорастания. Затем проростки помещали в климатокамеру с температурой $(20,0 \pm 0,5)$ °С и 16-часовым световым днем. Через 14 сут растения пересаживали в стаканчики со стерильной почвой (50 г). Дальнейшее культивирование осуществляли при температуре $(20,0 \pm 0,5)$ °С, влажности 70–80 %, 16-часовом световом дне в течение 8 нед.

Растительный материал (0,5 г) гомогенизировали в 0,1 моль/л калий-фосфатном буфере (рН 7,8), затем доводили объем до 10 мл. Полученные гомогенаты трижды по 15 с подвергали ультразвуковому воздействию при частоте 11 кГц с помощью дезинтегратора УЗДН-2Т (НПП «Академприбор», Россия), после чего центрифугировали в течение 15 мин при 10 000 об/мин. Все процедуры производили на холоде (4 °С).

Гомогенаты обрабатывались ультразвуком в целях разрушения клеточных мембран и высвобождения содержимого клеток с дальнейшим осаждением их обломков путем центрифугирования для определения общей антиоксидантной активности полученных экстрактов, а также активности ферментов аскорбат-глутатионового цикла, содержания низкомолекулярных антиоксидантов и белка в растениях.

Общую антиоксидантную активность растительных экстрактов оценивали по степени ингибирования окисления парафенилендиамина пероксидом водорода с применением спектрофотометрического метода при длине волны 530 нм [12]. Содержание аскорбиновой кислоты в растительных экстрактах устанавливали спектрофотометрически с использованием метода Даса, который основан на способности фосфомолибдата восстанавливаться данной кислотой до молибдата синего цвета. Измерение проводили при длине волны 660 нм [13]. Содержание восстановленного глутатиона в растительных экстрактах измеряли спектрофотометрическим методом с использованием реактива Элмана при длине волны 412 нм [14]. Активность аскорбатпероксидазы в растительных экстрактах определяли спектрофотометрически по методу Вермы – Дубея при длине волны 290 нм [15]. Активность глутатионпероксидазы в растительных экстрактах устанавливали спектрофотометрически по количеству окисленного глутатиона, накопленного в среде инкубации, при длине волны 260 нм [16]. Активность глутатионредуктазы

в растительных экстрактах измеряли спектрофотометрически по количеству НАДФН, образующегося при восстановлении окисленного глутатиона в среде инкубации, при длине волны 340 нм [17]. *Содержание белка* в растительных экстрактах определяли биуретовым методом при длине волны 540 нм [18].

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью лицензионного пакета программ *Statistica 6.0*. Данные представлены как средняя арифметическая величина \pm среднестатистическая ошибка. Оценку достоверности различий средних арифметических величин проводили на основании коэффициента Стьюдента. Различия между группами считали достоверными при двустороннем уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Развитие стресса у растений сопровождается активацией свободнорадикальных окислительных процессов в клетке [4]. Первоначально нами была определена общая антиоксидантная активность (выражается степенью инактивации антиоксидантами растений окисления парафенилендиамина пероксидом водорода) всех нетрансгенных и трансгенных растений, выращенных в различных условиях (табл. 1).

Таблица 1

Общая антиоксидантная активность нетрансгенных и трансгенных растений *N. tabacum*, %

Table 1

Total antioxidant activity of non-transgenic and transgenic plants *N. tabacum*, %

Серия	Нетрансгенные растения	Трансгенные растения	
		Линия 4-12	Линия 10-38
Без обработки почвы	60,0 \pm 1,5	56,0 \pm 1,4	54,0 \pm 1,4
Обработка почвы Ni ²⁺	75,0 \pm 1,9*	63,0 \pm 1,5* ^a	62,0 \pm 1,5* ^a

Примечание. * – различия между контрольной (без обработки почвы) и опытной (обработка почвы Ni²⁺) сериями растений достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$; ^a – различия между нетрансгенными и трансгенными растениями, выращенными в аналогичных условиях, достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Как видно из представленных в табл. 1 данных, исходная общая антиоксидантная активность нетрансгенных растений в 1,1 раза выше, чем у трансгенных форм. Установлено, что при внесении в почву Ni²⁺ общая антиоксидантная активность исследуемых растений увеличивается: у нетрансгенных форм – в 1,25 раза, у трансгенных растений линии 4-12 – в 1,13 раза, а у трансгенных растений линии 10-38 – в 1,15 раза по сравнению с контрольной серией.

Вероятно, в трансгенных растениях, несущих бактериальный ген *acdS*, образуется меньшее количество АФК, следовательно, они характеризуются более низкой интенсивностью свободнорадикальных окислительных процессов, чем нетрансгенные. Возможно, в трансгенных растениях в меньшей степени происходит активация элементов антиоксидантной защиты, что и обуславливает более низкую общую антиоксидантную активность трансгенных форм по сравнению с нетрансгенными.

На следующем этапе работы было определено содержание аскорбиновой кислоты (в миллиграммах на 1 г растительного материала) во всех сериях (табл. 2).

Таблица 2

Содержание аскорбиновой кислоты в нетрансгенных и трансгенных растениях *N. tabacum*, мг/г

Table 2

The content of ascorbic acid in non-transgenic and transgenic plants *N. tabacum*, mg/g

Серия	Нетрансгенные растения	Трансгенные растения	
		Линия 4-12	Линия 10-38
Без обработки почвы	0,730 \pm 0,015	0,810 \pm 0,016 ^a	0,780 \pm 0,015
Обработка почвы Ni ²⁺	1,180 \pm 0,023*	1,390 \pm 0,025* ^a	1,470 \pm 0,028* ^a

Примечание. * – различия между контрольной (без обработки почвы) и опытной (обработка почвы Ni²⁺) сериями растений достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$; ^a – различия между нетрансгенными и трансгенными растениями, выращенными в аналогичных условиях, достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Согласно представленным в табл. 2 данным при обработке почвы ионами никеля(II) содержание аскорбиновой кислоты в растениях повышается: в нетрансгенных формах – в 1,6 раза, в трансгенных растениях линии 4-12 – в 1,7 раза, в трансгенных растениях линии 10-38 – в 1,9 раза. Очевидно, что в случае присутствия Ni^{2+} в почве содержание аскорбиновой кислоты в трансгенных формах достоверно выше, чем в нетрансгенных, тогда как в образцах, выращенных в нормальных условиях, уровень витамина С достоверно не различается.

Также нами было определено содержание глутатиона (в миллимолях на 1 г растительного материала) во всех сериях растений (табл. 3).

Таблица 3

Содержание глутатиона в нетрансгенных и трансгенных растениях *N. tabacum*, ммоль/г

Table 3

The content of glutathione in non-transgenic and transgenic plants *N. tabacum*, mmol/g

Серия	Нетрансгенные растения	Трансгенные растения	
		Линия 4-12	Линия 10-38
Без обработки почвы	3,46 ± 0,15	3,43 ± 0,16	3,39 ± 0,15
Обработка почвы Ni^{2+}	4,79 ± 0,19*	5,34 ± 0,24*	5,37 ± 0,25*

*Различия между контрольной (без обработки почвы) и опытной (обработка почвы Ni^{2+}) сериями растений достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Как видно из табл. 3, содержание глутатиона в растениях при абиотическом стрессе, вызванном присутствием $NiCl_2$ в почве, также возросло: в нетрансгенных растениях оно увеличилось в 1,4 раза, а в трансгенных растениях обеих серий – в 1,6 раза по сравнению с содержанием глутатиона в растениях, выращенных без внесения $NiCl_2$ в почву.

На следующем этапе работы была определена активность основных ферментов аскорбат-глутатионового цикла. В частности, нами изучено влияние ионов никеля(II) в почве на активность аскорбатпероксидазы (табл. 4), глутатионпероксидазы (табл. 5) и глутатионредуктазы (табл. 6) в исследуемых растениях.

Таблица 4

Активность аскорбатпероксидазы в нетрансгенных и трансгенных растениях *N. tabacum*, отн. ед./мин на 1 мг белка

Table 4

Ascorbate peroxidase activity of non-transgenic and transgenic plants *N. tabacum*, rel. un./min per 1 mg protein

Серия	Нетрансгенные растения	Трансгенные растения	
		Линия 4-12	Линия 10-38
Без обработки почвы	0,031 ± 0,002	0,029 ± 0,003	0,030 ± 0,002
Обработка почвы Ni^{2+}	0,126 ± 0,006*	0,086 ± 0,005 ^{a*}	0,085 ± 0,004 ^{a*}

Примечание. * – различия между контрольной (без обработки почвы) и опытной (обработка почвы Ni^{2+}) сериями растений достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$; ^a – различия между нетрансгенными и трансгенными растениями, выращенными в аналогичных условиях, достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Приведенные в табл. 4 данные свидетельствуют об увеличении активности аскорбатпероксидазы во всех образцах при выращивании их в почве с $NiCl_2$. Однако в трансгенных растениях активность данного фермента повышается в меньшей степени, чем в нетрансгенных, при обработке почвы Ni^{2+} . Показано, что в нетрансгенных растениях активность аскорбатпероксидазы после внесения в почву ионов никеля(II) возросла в 4,1 раза по сравнению с ее активностью в растениях, выращенных без внесения данного металла в почву. В трансгенных растениях линии 4-12 активность фермента при обработке почвы Ni^{2+} увеличилась в 3,0 раза, а в трансгенных растениях линии 10-38 – в 2,8 раза относительно таковой в трансгенных растениях, выращенных в условиях отсутствия абиотического стресса.

По данным, представленным в табл. 5, можно судить о влиянии ионов никеля(II) в почве на активность глутатионпероксидазы (выражается в микромолях на литр окисленного глутатиона в минуту на 1 мг белка) в трансгенных и нетрансгенных растениях *N. tabacum*.

Таблица 5

Активность глутатионпероксидазы в нетрансгенных и трансгенных растениях *N. tabacum*, мкмоль · л⁻¹ · мин⁻¹ на 1 мг белка

Table 5

Glutathione peroxidase activity of non-transgenic and transgenic plants *N. tabacum*, μmol · L⁻¹ · min⁻¹ per 1 mg protein

Серия	Нетрансгенные растения	Трансгенные растения	
		Линия 4-12	Линия 10-38
Без обработки почвы	0,027 ± 0,002	0,028 ± 0,002	0,027 ± 0,002
Обработка почвы Ni ²⁺	0,065 ± 0,003*	0,042 ± 0,002* ^a	0,043 ± 0,002* ^a

Примечание. * – различия между контрольной (без обработки почвы) и опытной (обработка почвы Ni²⁺) сериями растений достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$; ^a – различия между нетрансгенными и трансгенными растениями, выращенными в аналогичных условиях, достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Согласно данным табл. 5 активность глутатионпероксидазы в нетрансгенных растениях после внесения в почву ионов никеля(II) увеличилась в 2,4 раза по сравнению с ее активностью в контрольных образцах, выращенных в нормальных условиях. Активность фермента в трансгенных растениях линий 4-12 и 10-38, выращенных в присутствии NiCl₂ в почве, была в 1,5 и 1,6 раза выше контроля соответственно.

Данные, представленные в табл. 6, характеризуют влияние присутствующих в почве ионов никеля(II) на активность глутатионредуктазы (выражается в микромолях на литр НАДФН в минуту на 1 мг белка) в исследуемых растениях.

Таблица 6

Активность глутатионредуктазы в нетрансгенных и трансгенных растениях *N. tabacum*, мкмоль · л⁻¹ · мин⁻¹ на 1 мг белка

Table 6

Glutathione reductase activity of non-transgenic and transgenic plants *N. tabacum*, μmol · L⁻¹ · min⁻¹ per 1 mg protein

Серия	Нетрансгенные растения	Трансгенные растения	
		Линия 4-12	Линия 10-38
Без обработки почвы	0,045 ± 0,003	0,044 ± 0,002	0,045 ± 0,003
Обработка почвы Ni ²⁺	0,113 ± 0,006*	0,074 ± 0,004* ^a	0,072 ± 0,004* ^a

Примечание. * – различия между контрольной (без обработки почвы) и опытной (обработка почвы Ni²⁺) сериями растений достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$; ^a – различия между нетрансгенными и трансгенными растениями, выращенными в аналогичных условиях, достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Как видно из табл. 6, при внесении в почву Ni²⁺ активность глутатионредуктазы в растениях увеличивается, однако в трансгенных образцах повышение активности фермента происходит в меньшей степени. В нетрансгенных растениях активность глутатионредуктазы при обработке почвы ионами никеля(II) выросла в 2,5 раза по сравнению с таковой в контрольных образцах, выращенных в условиях отсутствия абиотического стресса. В трансгенных растениях линии 4-12 при обработке почвы Ni²⁺ активность фермента повысилась в 1,7 раза, а в трансгенных растениях линии 10-38 – в 1,6 раза относительно его активности в трансгенных растениях, выращенных в нормальных условиях.

На основании полученных результатов показано, что трансгенные и нетрансгенные формы растений отвечают на абиотическое стрессовое воздействие увеличением содержания низкомолекулярных антиоксидантов, в частности аскорбата и глутатиона. Вероятно, в трансгенных растениях, несущих бактериальный ген *acdS*, в меньшем количестве образуется пероксид водорода, который является одним из субстратов для аскорбатпероксидазы и глутатионпероксидазы. Следовательно, данные формы растений имеют более низкую интенсивность свободнорадикальных окислительных процессов по сравнению с нетрансгенными.

Полученные нами результаты об активности ферментов аскорбат-глутатионового цикла согласуются с тем, что трансгенные растения *N. tabacum* в условиях загрязнения почвы Ni²⁺ характеризовались более низкой активностью ферментативных антиоксидантов (пероксидазы, каталазы, супероксиддисмутазы) и интенсивностью процессов перекисного окисления липидов по сравнению с нетрансгенными формами [19].

Нами установлено, что внесение в почву ионов никеля(II) приводило к повышению общей антиоксидантной активности исследуемых растений, как и в случае присутствия в почве ряда других тяжелых металлов (меди, хрома и свинца) [20].

Так, ранее нами было показано, что при внесении в почву солей Cu^{2+} , Cr^{6+} , Pb^{2+} трансгенные растения *N. tabacum* отличались более высоким содержанием низкомолекулярных компонентов (глутатиона, аскорбиновой кислоты) и более низкой активностью ферментов аскорбат-глутатионового цикла (аскорбатпероксидазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы) по сравнению с нетрансгенными формами [21].

В литературе имеются данные, что трансгенные растения табака, характеризующиеся сверхэкспрессией супероксиддисмутазы, демонстрировали увеличение активности ферментов аскорбат-глутатионового цикла. Эти растения отличались повышенной устойчивостью к окислительному стрессу, только если другие антиоксиданты (в частности, глутатион и аскорбат) также присутствовали в клетке в высоких концентрациях [8].

Следует отметить, что полученные данные согласуются с тем, что у ряда растений, инокулированных бактериями, которые несли ген *acdS* в своем геноме, в условиях абиотического стресса наблюдалась более низкая активность ферментов аскорбат-глутатионового цикла. Так, например, растения кукурузы, инокулированные бактериями *P. putida*, в условиях засухи отличались более низкой активностью аскорбатпероксидазы и глутатионпероксидазы по сравнению с неинокулированными растениями [10]. Растения картофеля, инокулированные бактериями *Bacillus* sp., содержащими фермент АЦК-деаминазу, при выращивании в условиях воздействия на почву тяжелых металлов имели более низкую активность аскорбатпероксидазы и глутатионредуктазы, чем неинокулированные растения картофеля, выращенные на загрязненной тяжелыми металлами почве [22].

Заключение

Таким образом, трансгенные растения, несущие в своем геноме бактериальный ген *acdS* и способные синтезировать АЦК-деаминазу, в меньшей степени подвержены воздействию повышенных концентраций ионов никеля в почве. Необходимо отметить, что трансгенные растения *N. tabacum*, которые выращивались на загрязненной почве, имели лучшие ростовые характеристики (большую длину стебля, корня) и более высокую биомассу, чем нетрансгенные образцы [11].

Полученные результаты свидетельствуют об увеличении общей антиоксидантной активности, повышении содержания глутатиона, аскорбиновой кислоты, возрастании активности ферментов аскорбат-глутатионового цикла в условиях абиотического стресса, вызванного обработкой почвы Ni^{2+} .

Практическая значимость данного исследования связана с использованием трансгенных растений, экспрессирующих бактериальный ген АЦК-деаминазы (*acdS*) и обладающих повышенной устойчивостью к неблагоприятным воздействиям окружающей среды.

Библиографические ссылки

1. Glick BR. Bacterial ACC deaminase and the alleviation of plant stress. *Advances in Applied Microbiology*. 2004;56:291–312. DOI: 10.1016/S0065-2164(04)56009-4.
2. Grichko VP, Glick BR. Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2001;39(1):11–17. DOI: 10.1016/S0981-9428(00)01212-2.
3. Sreekanth TVM, Nagajyothi PC, Lee KD, Prasad TNKV. Occurrence, physiological responses and toxicity of nickel in plants. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2013;10(5):1129–1140. DOI: 10.1007/s13762-013-0245-9.
4. Matés JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*. 2000; 153(1–3):83–104. DOI: 10.1016/S0300-483X(00)00306-1.
5. Ahmad P, Sarwat M, Sharma S. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Biology*. 2008; 51(3):167–173. DOI: 10.1007/BF03030694.
6. Hontzeas N, Hontzeas CE, Glick BR. Reaction mechanisms of the bacterial enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Biotechnology Advances*. 2006;24(4):420–426. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2006.01.006.
7. Sergeeva E, Shah S, Glick BR. Growth of transgenic canola (*Brassica napus* cv. *Westar*) expressing a bacterial 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase gene on high concentrations of salt. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2006; 22(3):277–282. DOI: 10.1007/s11274-005-9032-1.
8. Young-Pyo Lee, Sun-Hyung Kim, Jae-Wook Bang, Haeng-Soon Lee, Sang-Soo Kwak, Suk-Yoon Kwon. Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco plants expressing three antioxidant enzymes in chloroplasts. *Plant Cell Reports*. 2007;26(5): 591–598. DOI: 10.1007/s00299-006-0253-z.
9. Вязов ЕВ, Козел НВ, Доманский ВП, Шалыго НВ. Активность аскорбат-глутатионового цикла в растениях огурца (*Cucumis sativus*) в условиях светодиодного освещения. *Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук*. 2014;1:78–83.
10. Vurukonda SSKP, Vardharajula S, Shrivastava M, SkZ A. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*. 2016;184:13–24. DOI: 10.1016/j.micres.2015.12.003.

11. Мельникова АА, Храмова ЕА, Королева ЕС, Руткевич ДА, Кукулянская ТА. Анализ экспрессии *acdS*-гена бактерий *Pseudomonas putida* B-37 в трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2019;1:45–53. DOI: 10.33581/2521-1722-2019-1-45-53.
12. Dávalos A, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC – fluorescein) assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52(1):48–54. DOI: 10.1021/jf0305231.
13. Das N, Misra M, Misra AN. Sodium chloride salt stress induced metabolic changes in callus cultures of pearl millet (*Pennisetum americanum* L. Leeke): free solute accumulation. *Journal of Plant Physiology*. 1990;137(2):244–246. DOI: 10.1016/S0176-1617(11)80090-8.
14. Sahoo S, Awasthi JP, Sunkar R, Panda SK. Determining glutathione levels in plants. In: Sunkar R, editor. *Plant stress tolerance. Methods and Protocols*. 2nd edition. New York: Humana Press; 2017. p. 273–277 (Methods in molecular biology; volume 1631). DOI: 10.1007/978-1-4939-7136-7_16.
15. Verma S, Dubey RS. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science*. 2003;164(4):645–655. DOI: 10.1016/S0168-9452(03)00022-0.
16. Starlin T, Gopalakrishnan VK. Enzymatic and non-enzymatic antioxidant properties of *Tylophora pauciflora* Wight and Arn. – an *in vitro* study. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2013;6(supplement 4):68–71.
17. Kiran BR, Prasad MNV. Defense manifestations of enzymatic and non-enzymatic antioxidants in *Ricinus communis* L. exposed to lead in hydroponics. *The EuroBiotech Journal*. 2019;3(3):117–127. DOI: 10.2478/eibtj-2019-0014.
18. Семак ИВ, Зырянова ТН, Губич ОИ. *Биохимия белков*. Минск: БГУ; 2007. 49 с.
19. Приступа КВ, Кукулянская ТА, Петрова СМ, Партач ДА, Халицкая АА. Изучение ряда показателей антиоксидантной системы трансгенных растений *Nicotiana tabacum*, выращенных в условиях загрязнения почвы ионами никеля(II). В: Тихомиров ВН, Поликсенова ВД, Карпук ВВ, Гельтман ДВ, Аначков Г, Сенников АН, редакторы. *Актуальные проблемы изучения и сохранения фито- и микобиоты. Материалы IV Международной научно-практической конференции, приуроченной к 100-летию кафедры ботаники БГУ; 31 мая 2021 г.; Минск, Беларусь*. Минск: БГУ; 2021. с. 172–176.
20. Приступа КВ, Кукулянская ТА, Храмова ЕА. Анализ содержания фенольных антиоксидантов и аскорбиновой кислоты в трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*, выращенных в условиях абиотического стресса. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2020;1:20–26. DOI: 10.33581/2521-1722-2020-1-20-26.
21. Приступа КВ, Кукулянская ТА, Храмова ЕА. Изучение состояния компонентов аскорбат-глутатионового цикла в трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*, выращенных в условиях абиотического стресса. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2021;2:11–18. DOI: 10.33581/2521-1722-2021-2-11-18.
22. Gururani MA, Upadhyaya CP, Baskar V, Venkatesh J, Nookaraju A, Park SW. Plant growth-promoting rhizobacteria enhance abiotic stress tolerance in *Solanum tuberosum* through inducing changes in the expression of ROS-scavenging enzymes and improved photosynthetic performance. *Journal of Plant Growth Regulation*. 2013;32(2):245–258. DOI: 10.1007/s00344-012-9292-6.

References

1. Glick BR. Bacterial ACC deaminase and the alleviation of plant stress. *Advances in Applied Microbiology*. 2004;56:291–312. DOI: 10.1016/S0065-2164(04)56009-4.
2. Grichko VP, Glick BR. Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2001;39(1):11–17. DOI: 10.1016/S0981-9428(00)01212-2.
3. Sreekanth TVM, Nagajyothi PC, Lee KD, Prasad TNVKV. Occurrence, physiological responses and toxicity of nickel in plants. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2013;10(5):1129–1140. DOI: 10.1007/s13762-013-0245-9.
4. Matés JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*. 2000; 153(1–3):83–104. DOI: 10.1016/S0300-483X(00)00306-1.
5. Ahmad P, Sarwat M, Sharma S. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Biology*. 2008; 51(3):167–173. DOI: 10.1007/BF03030694.
6. Hontzas N, Hontzas CE, Glick BR. Reaction mechanisms of the bacterial enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Biotechnology Advances*. 2006;24(4):420–426. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2006.01.006.
7. Sergeeva E, Shah S, Glick BR. Growth of transgenic canola (*Brassica napus* cv. *Westar*) expressing a bacterial 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase gene on high concentrations of salt. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2006; 22(3):277–282. DOI: 10.1007/s11274-005-9032-1.
8. Young-Pyo Lee, Sun-Hyung Kim, Jae-Wook Bang, Haeng-Soon Lee, Sang-Soo Kwak, Suk-Yoon Kwon. Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco plants expressing three antioxidant enzymes in chloroplasts. *Plant Cell Reports*. 2007;26(5): 591–598. DOI: 10.1007/s00299-006-0253-z.
9. Viazau YV, Kozel NV, Domanskii VP, Shalygo NV. Activity of ascorbate-glutathione cycle in cucumber plants (*Cucumis sativus*) under led lighting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological Series*. 2014;1:78–83. Russian.
10. Vurukonda SSKP, Vardharajula S, Shrivastava M, SkZ A. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*. 2016;184:13–24. DOI: 10.1016/j.micres.2015.12.003.
11. Melnikava AA, Khrantsova AA, Karaleva KS, Rutkevich DA, Kukulianskaya TA. Expression analysis of *acdS*-gene of *Pseudomonas putida* B-37 in transgenic plants *Nicotiana tabacum*. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2019;1:45–53. Russian. DOI: 10.33581/2521-1722-2019-1-45-53.
12. Dávalos A, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC – fluorescein) assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52(1):48–54. DOI: 10.1021/jf0305231.
13. Das N, Misra M, Misra AN. Sodium chloride salt stress induced metabolic changes in callus cultures of pearl millet (*Pennisetum americanum* L. Leeke): free solute accumulation. *Journal of Plant Physiology*. 1990;137(2):244–246. DOI: 10.1016/S0176-1617(11)80090-8.
14. Sahoo S, Awasthi JP, Sunkar R, Panda SK. Determining glutathione levels in plants. In: Sunkar R, editor. *Plant stress tolerance. Methods and Protocols*. 2nd edition. New York: Humana Press; 2017. p. 273–277 (Methods in molecular biology; volume 1631). DOI: 10.1007/978-1-4939-7136-7_16.

15. Verma S, Dubey RS. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science*. 2003;164(4):645–655. DOI: 10.1016/S0168-9452(03)00022-0.
16. Starlin T, Gopalakrishnan VK. Enzymatic and non-enzymatic antioxidant properties of *Tylophora pauciflora* Wight and Arn. – an *in vitro* study. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2013;6(supplement 4):68–71.
17. Kiran BR, Prasad MNV. Defense manifestations of enzymatic and non-enzymatic antioxidants in *Ricinus communis* L. exposed to lead in hydroponics. *The EuroBiotech Journal*. 2019;3(3):117–127. DOI: 10.2478/ebtj-2019-0014.
18. Semak IV, Zyryanova TN, Gubich OI. *Biokhimiya belkov* [Biochemistry of proteins]. Minsk: Belarusian State University; 2007. 49 p. Russian.
19. Pristupa KV, Kukulianskaya TA, Petrova SM, Partach DA, Khalitskaya AA. Study of number indicators antioxidant system in transgenic *Nicotiana tabacum* plants under soil contamination with nickenl(II) ions. In: Tikhomirov VN, Poliksenova VD, Karpuk VV, Gel'tman DV, Anachkov G, Sennikov AN, editors. *Aktual'nye problemy izucheniya i sokhraneniya fito- i mikrobioty. Materialy IV Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, priurochennoi k 100-letiyu kafedry botaniki BGU; 31 maya 2021 g.; Minsk, Belarus'* [Actual problems of studying and preserving phyto- and mycobiota. Materials of the 4th International scientific and practical conference dedicated to the 100th anniversary of the department of botany of the Belarusian State University; 2021 May 31; Minsk, Belarus]. Minsk: Belarusian State University; 2021. p. 172–176. Russian.
20. Pristupa KV, Kukulianskaya TA, Khramtsova EA. Analysis of the low-molecular weight antioxidants of transgenic plants *Nicotiana tabacum* under abiotic stress conditions. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2020;1:20–26. Russian. DOI: 10.33581/2521-1722-2020-1-20-26.
21. Pristupa KV, Kukulianskaya TA, Khramtsova EA. Study of the ascorbate-glutathione cycle in transgenic plants *Nicotiana tabacum* under abiotic stress conditions. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2021;2:11–18. Russian. DOI: 10.33581/2521-1722-2021-2-11-18.
22. Gururani MA, Upadhyaya CP, Baskar V, Venkatesh J, Nookaraju A, Park SW. Plant growth-promoting rhizobacteria enhance abiotic stress tolerance in *Solanum tuberosum* through inducing changes in the expression of ROS-scavenging enzymes and improved photosynthetic performance. *Journal of Plant Growth Regulation*. 2013;32(2):245–258. DOI: 10.1007/s00344-012-9292-6.

Получена 19.11.2021 / исправлена 21.12.2022 / принята 21.12.2022.
Received 19.11.2021 / revised 21.12.2022 / accepted 21.12.2022.