

растения проверяли с помощью системы лазерной сканирующей конфокальной микроскопии Axio Observer Z1 LSM 710 NLO/Duo (Carl Zeiss, Германия) и получали флуоресцентные изображения клеток.

Далее проверяли работу сенсора HyPer7 в целом растении в установке флуоресцентного имиджинга DVS-03 (ИФТ РАН, Россия) и использовали для возбуждения сенсора светодиоды 395/25 нм и 490/20 нм, флуоресцентные изображения создавали с помощью CMOS-камеры в диапазоне 535/43 нм с экспозицией 2000 мс. Для проверки реакции сенсора на экзогенную  $H_2O_2$  на лист наносили раствор 10%  $H_2O_2$  в 0,05% адьюванте Сильвет 408, в качестве контроля использовали раствор 0,05% Сильвет 408. Соотношение флуоресценции F490/F395 повысилось в месте раздражения в ответ на это раздражение. Затем смотрели распространение волны АФК по всему листу при локальном нагреве части листа элементом Пельтье до 65°C в течение 5 минут. Было зафиксировано быстрое распространяющееся изменение флуоресценции сенсора по всему листу. Параметры волн АФК были сопоставлены с волнами кальция, визуализированными с помощью генетически кодируемого флуоресцентного сенсора Case12, была выполнена оценка этих волн в ответ на один и тот же стимул.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что растения с генетически кодируемыми сенсорами отличный инструмент для визуализации сигнальных веществ как на уровне клеток, так и на уровне целого растения.

Поддержано Программой 10 Экспериментальной Лаборатории Астрофизики и Геофизике НЦФМ

### **Характеристика показателей антиоксидантной системы трансгенных растений *Nicotiana tabacum*, выращенных в условиях загрязнения почвы ионами никеля (II)**

**Приступа К. В.<sup>A\*</sup>, Кукулянская Т. А.<sup>A</sup>, Храмова Е. А.<sup>B</sup>**

<sup>A</sup> Белорусский государственный университет, кафедра биохимии, Минск, Беларусь.

\*E-mail: kristina.pristupa@mail.ru

<sup>B</sup> Белорусский государственный университет, кафедра генетики, Минск, Беларусь.

Растения, произрастающие в неблагоприятных условиях, подвергаются сильному стрессу, который может быть обусловлен загрязнением почв тяжёлыми металлами, засухой, засолением, воздействием высоких и низких температур и т.д. [1]. При стрессовых воздействиях значительно повышается интенсивность свободнорадикальных окислительных процессов. Одним из элементов, способных в высоких концентрациях индуцировать развитие стресса в растениях, является никель (II). Несмотря на

то, что никель – необходимый для растений микроэлемент, его избыточные концентрации являются фактором абиотического стресса для растений. ПДК никеля в почве – 20,0 мг/кг, в среднем по Беларуси в землях содержится 4,8 мг/кг никеля [2]. Активные формы кислорода подавляют активность ряда ферментов, вызывают деграцию клеточных биополимеров, нарушают проницаемость биологических мембран, останавливают клеточный цикл и приводят к развитию апоптоза. В ответ на усиление генерации АФК, как правило, наблюдается активация энзиматических компонентов антиоксидантной защитной системы растений [3, 4].

Развитие абиотического стресса сопровождается образованием избыточного количества стрессового фитогормона – этилена, что приводит к ингибированию процессов роста и развития растений. Одним из подходов к снижению уровня «стрессового» этилена является использование фермента 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат-дезаминазы (АЦК-дезаминазы), который синтезируют некоторые ризобактерии. Фермент АЦК-дезаминаза, кодируемый геном *acdS*, разлагает предшественник этилена – АЦК – до аммиака и  $\alpha$ -кетобутирата. Устойчивость растений к неблагоприятным условиям окружающей среды, вызывающим стресс, в значительной степени обеспечивается функционированием антиоксидантной системы. В настоящее время во многих странах проводится изучение состояния антиоксидантной системы растений под влиянием избыточной концентрации тяжелых металлов в почве, а также создаются трансгенные формы растений, которые характеризуются сверхэкспрессией генов, кодирующих ферменты антиоксидантной защиты [5, 6]. Целью настоящей работы является изучение влияния хлорида никеля (II), внесенного в почву, на активность ряда ферментов в нетрансгенных и трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*, несущих *acdS*-ген бактерий *Pseudomonas putida* В-37.

Материалы и методы исследования. В качестве объектов исследования выступали нетрансгенные и трансгенные растения *Nicotiana tabacum*, несущие *acdS*-ген бактерий *Pseudomonas putida* В-37. Предметом исследования являлись общая антиоксидантная активность данных растений, а также активность ферментов аскорбат-глутатионового цикла (глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, аскорбатпероксидазы) и содержание низкомолекулярных антиоксидантов (аскорбиновой кислоты, глутатиона) в исследуемых растениях. Растения были разделены на 2 серии: контрольная серия (без обработки почвы); опытная серия (однократная обработка почвы  $\text{NiCl}_2$  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 *Nicotiana tabacum*.

Создание трансгенных растений осуществлялось согласно методике, описанной А.А. Мельниковой и соавторами [7]. Трансгенные растения *N. tabacum* были получены с использованием векторной конструкции pBI121-acdS, несущей ген *acdS* бактерий *Pseudomonas putida* B-37, который находится под контролем конститутивного CaMV 35S промотора. Генетическая конструкция была введена в клетки *Agrobacterium tumefaciens* AGL0. Полученный агробактериальный штамм был использован для трансформации каллусов *N. tabacum*.

Семена растений стерильно высевали на увлажненные фильтры и в течение 2 суток выдерживали при  $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$  в темноте для прорастания. Затем проростки помещали в климатокамеру с температурой  $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$  и 16-часовым световым днем. Через 14 суток растения пересаживали в стаканчики со стерильной почвой (50 г). Дальнейшее культивирование производили при температуре  $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , влажности 70-80%, 16-часовом световом дне в течение 8 недель.

Растительный материал (0,5 г) гомогенизировали в 0,1 моль/л калий-фосфатном буфере (pH 7,8), затем объем доводили 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 ( $4^\circ\text{C}$ ). Клеточные экстракты использовали для определения общей антиоксидантной активности, а также активности ферментов аскорбат-глутатионового цикла, содержания низкомолекулярных антиоксидантов и белка в растениях. Содержание белка в растительных экстрактах определяли биуретовым методом при длине волны 540 нм. Общую антиоксидантную активность растительных экстрактов оценивали по степени ингибирования окисления парафенилендиамина пероксидом водорода с применением спектрофотометрического метода при длине волны 530 нм. Активность супероксиддисмутазы оценивали по степени ингибирования реакции аутоокисления кверцетина. Определение активности каталазы проводили методом, основанным на способности пероксида водорода образовывать с молибдатом аммония стойкий окрашенный комплекс при  $\lambda=410$  нм. Пероксидазную активность определяли кинетическим методом, основанном на определении скорости накопления продуктов окисления бензидина пероксидом водорода в присутствии экстракта растений. Активность аскорбатпероксидазы (APX) в растительных экстрактах определяли спектрофотометрически по методу *Verma, Dubey* при длине волны 290 нм. Активность глутатионпероксидазы (GPX) в растительных экстрактах устанавливали спектрофотометрически по количеству накопленного окисленного глутатиона

в среде инкубации при длине волны 260 нм. Активность глутатионредуктазы (GR) в растительных экстрактах измеряли спектрофотометрически по количеству НАДФН, образующегося при восстановлении окисленного глутатиона в среде инкубации, при длине волны 340 нм. Общее содержание фенольных соединений в растительных экстрактах определяли спектрофотометрически по методу *Singleton* при длине волны 765 нм. Общее содержание флавоноидов в растительных экстрактах измеряли спектрофотометрически по методу *Quettier* при длине волны 415 нм. Содержание аскорбиновой кислоты в растительных экстрактах устанавливали спектрофотометрически с использованием метода *Das*, который основан на способности фосфомолибдата восстанавливаться данной кислотой до молибдата синего цвета. Измерение проводили при длине волны 660 нм. Содержание восстановленного глутатиона в растительных экстрактах измеряли спектрофотометрическим методом с использованием реактива Элмана при длине волны 412 нм.

Результаты и обсуждение. Воздействие никеля на растение проявляется в виде множества ответных реакций, которые нейтрализуют избыток поступающего в растение металла. Общая реакция на присутствие избытка никеля в среде – это увеличение содержания АФК, а также низкомолекулярных антиоксидантов и ферментов, которые противодействуют накоплению АФК и способствуют выживанию растений в условиях повышенной концентрации металла.

Несмотря на то, что данных о токсичности никеля для растений много, точный механизм действия этого металла до сих пор не установлен. Есть два предполагаемых механизма токсичности никеля – оба они являются непрямыми, так как никель не является металлом, который участвует в окислительно-восстановительных реакциях. Во-первых, считается, что никель способен взаимодействовать с другими микроэлементами-металлами, необходимыми для растения. В избыточных количествах никель способен нарушать всасывание и транспорт двухвалентных металлов, что приводит к возникновению их дефицита, из-за чего и развиваются различные токсические эффекты. Также стоит учесть, что железо, медь, цинк и марганец являются элементами, ассоциированными со многими ферментами, например, СОД или каталазой. Избыток никеля способствует снижению концентрации железа, меди и цинка в растительной клетке, что нарушает биосинтез этих ферментов и в итоге приводит к развитию окислительного стресса. Во-вторых, избыточное накопление никеля в растении и, как следствие, снижение активности СОД, аскорбатоксидазы, глутатионпероксидазы, каталазы и других ферментов-антиоксидантов, приводит к генерации АФК. Никель-индуцированные АФК вызывают ПОЛ, окисление белков, деструкцию ферментов и повреждение ДНК [8].

Нами было проведено определение активностей ферментов и оценены биохимические показатели, которые характеризуют состояние антиоксидантной системы. Исходная общая антиоксидантная активность (ОАА), которая выражается степенью инактивации окисления парафенилендиамина пероксидом водорода антиоксидантами растений, в нетрансгенных растениях выше, чем в трансгенных формах в 1,1 раз. Установлено, что при внесении в почву  $Ni^{2+}$  увеличивается общая антиоксидантная активность исследуемых растений. Показано, что при выращивании растений на почве с никелем (II) общая антиоксидантная активность повысилась в 1,25 раз, а для трансгенных растений обеих линий – в 1,13 раз по сравнению с контрольными сериями растений соответственно. Вероятно, в трансгенных растениях, несущих бактериальный *acdS*-ген, в меньшем количестве образуются АФК, следовательно, они характеризуются более низкой интенсивностью свободнорадикальных окислительных процессов по сравнению с нетрансгенными.

Нетрансгенные растения *Nicotiana tabacum* отличались более высокими показателями активности СОД и содержанием ТБК-активных продуктов по сравнению с трансгенными образцами при обработке почвы ионами никеля (II). Показано, что при выращивании растений в условиях абиотического стресса в нетрансгенных растениях активность СОД увеличилась в 3,6 раз, в трансгенных – в 1,7 раз соответственно по сравнению с контрольной серией, интенсивность ПОЛ в нетрансгенных растениях выросло в 4,2 раз, в трансгенных – в 1,6 раз соответственно по сравнению с контрольной серией. Активность каталазы в условиях абиотического стресса повышалась в 2,7 раз в нетрансгенных растениях и в 1,5 раза в трансгенных по сравнению с контрольной серией. Пероксидазная активность в условиях загрязнения почвы никелем (II) увеличилась в 3 раза для нетрансгенных растений и в 1,6 раз для трансгенных растений соответственно по сравнению с контрольной серией.

Полученные нами данные об активности каталазы, СОД и пероксидазы в растениях *Nicotiana tabacum* могут свидетельствовать об активации ферментов антиоксидантной защиты при внесении в почву ионов никеля (II). Это может быть связано с усилением процессов свободного окисления, сопровождающихся образованием АФК. Однако, в трансгенных растениях активность ферментов при загрязнении почвы увеличивается в меньшей степени, чем в нетрансгенных формах. Это может быть обусловлено тем, что в трансгенных растениях снижается образование АФК, в частности пероксида водорода, который является субстратом, как для каталазы, так и для пероксидазы. Поэтому трансгенные растения имеют более низкую активность данных ферментов по сравнению с нетрансгенными при обработке почвы ионами никеля (II).

Также нами было изучено влияние абиотического стресса на общее содержание фенольных соединений (ФС) и флавоноидов. Присутствие в почве ионов никеля (II) приводило к повышению содержания фенольных соединений, в том числе и флавоноидов: содержание ФС выросло в 1,5 раза в нетрансгенных растениях и в 2 раза в трансгенных по сравнению с контрольной серией. Содержание флавоноидов в условиях загрязнения почвы никелем (II) увеличилось в 1,9 раз в нетрансгенных и в 2,4 раз в трансгенных формах.

О функционировании антиоксидантной системы организма и интенсивности свободнорадикальных окислительных процессов, вызванных, в первую очередь, действием токсичных веществ можно судить по состоянию системы аскорбат-глутатионового цикла. В связи с этим на следующем этапе нашей работы было определено содержание аскорбиновой кислоты и глутатиона (мг и ммоль, соответственно, на 1 г растительного материала) во всех сериях.

При внесении в почву ионов  $Ni^{2+}$  содержание аскорбиновой кислоты в растениях повышается: в нетрансгенных растениях в 1,6 раз, в трансгенных растениях линии 4-12 – в 1,7 раз и в 1,9 раз в образцах линии 10-38. Очевидно, что в трансгенных формах растений в присутствии  $Ni^{2+}$  в почве содержание аскорбиновой кислоты достоверно выше, чем в нетрансгенных растениях, тогда как в образцах, выращенных в нормальных условиях, уровень витамина С достоверно не различается. Содержание глутатиона в растениях при абиотическом стрессе, вызванном присутствием  $NiCl_2$  в почве, также возрастало. В нетрансгенных растениях содержание глутатиона увеличилось в 1,4 раз, а в трансгенных растениях обеих серий – в 1,6 раз.

Также была определена активность основных ферментов аскорбат-глутатионового цикла: аскорбатпероксидазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в исследуемых образцах. Активность аскорбатпероксидазы во всех образцах повышалась при выращивании их в почве с  $NiCl_2$ . Однако, активность данного фермента в трансгенных растениях повышается в меньшей степени, чем в нетрансгенных формах. В нетрансгенных растениях активность аскорбатпероксидазы возросла в 4 раза после внесения в почву никеля (II). В трансгенных растениях линии активность фермента увеличилась в 3 раза

Активность глутатионпероксидазы в нетрансгенных растениях увеличилась в 2,4 раз, а в трансгенных формах была в 1,5 раза после внесения в почву никеля (II). Активность глутатионредуктазы в растениях при внесении в почву  $Ni^{2+}$  также увеличилась, однако, в трансгенных образцах повышение активности фермента происходило в меньшей степени. В нетрансгенных растениях активность глутатионредуктазы выросла в 2,5 раза

при обработке почвы ионами никеля (II). В трансгенных растениях активность фермента повысилась в 1,7 раза.

Полученные результаты свидетельствуют, 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 *acdS*-ген, в меньшем количестве образуются пероксид водорода, который является одним из субстратов для пероксидаз.

Данные об активности ферментов аскорбат-глутатионового цикла согласуются с тем, что трансгенные растения *Nicotiana tabacum* характеризовались более низкой активностью ферментативных антиоксидантов (пероксидазы, каталазы, супероксиддисмутазы) и интенсивностью процессов перекисного окисления липидов по сравнению с нетрансгенными формами в условиях загрязнения почвы ионами  $Ni^{2+}$ . Внесение в почву никеля (II) приводило к повышению общей антиоксидантной активности исследуемых растений, что наблюдалось также в присутствии в почве ряда других тяжелых металлов. Также ранее нами было показано, что при внесении в почву солей  $Cu^{2+}$ ,  $Cr^{6+}$ ,  $Pb^{2+}$  трансгенные растения *Nicotiana tabacum* имели более высокое содержание низкомолекулярных компонентов (глутатиона, аскорбиновой кислоты) и более низкую активность ферментов (APX, GPX, GR) аскорбат-глутатионового цикла по сравнению с нетрансгенными формами [9, 10].

В литературе имеются также 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 [11].

Следует также отметить, что полученные результаты согласуются с тем, что для ряда растений, инокулированными бактериями, которые несли в своем геноме *acdS*-ген, в условиях абиотического стресса наблюдалась более низкая активность ферментов аскорбат-глутатионового цикла [12].

Таким образом, на основании полученных данных, характеризующих состояние антиоксидантной системы трансгенных и нетрансгенных растений *Nicotiana tabacum*, можно сделать заключение о том, что трансгенные растения, которые имеют в своем геноме бактериальный *acdS*-ген и способные синтезировать АЦК-деаминазу, в меньшей степени подвержены воздействию повышенных концентраций ионов никеля (II) в почве. Сле-

дует отметить, что трансгенные растения *N. tabacum*, которые выращивались на загрязненной почве, имели лучшие ростовые характеристики (бóльшая длина стебля, корня) и более высокую биомассу, чем нетрансгенные образцы.

### **Библиографические ссылки**

1. Glick BR. Bacterial ACC deaminase and the alleviation of plant stress. *Advances in Applied Microbiology*. 2004;56:291–312.
2. Hontzeas N., Hontzeas C.E., Glick B.R. Reaction mechanisms of the bacterial enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Biotechnology Advances*. 2006. Vol. 24. №4. P. 420–426.
3. Matés JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*. 2000;153(1–3):83–104.
4. Ahmad P, Sarwat M, Sharma S. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Biology*. 2008;51(3):167–173.
5. Sergeeva E., Shan S., Glick B.R. 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. Vol. 22. № 3. P. 277–282.
6. Lee Y.P., Kim S.H., Bang J.W., Lee H.S., Kwak S.S., Kwon S.Y. Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco plants expressing three antioxidant enzymes in chloroplasts. *Plant Cell Reports*. 2007. Vol. 26. №5. P. 591-598.
7. Мельникова А.А, Храпцова Е.А, Королева Е.С, Руткевич Д.А, Кукулянская Т.А. Анализ экспрессии *acdS*-гена бактерий *Pseudomonas putida* В-37 в трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2019. №1. С. 45–53.
8. Hassan, M.U., Chattha, M.U., Khan, I. *et al.* Nickel toxicity in plants: reasons, toxic effects, tolerance mechanisms, and remediation possibilities — a review. *Environ Sci Pollut Res* 2019. Vol. 26, P. 12673–12688 (2019).
9. Приступа К.В., Кукулянская Т.А., Храпцова Е.А. Анализ содержания фенольных антиоксидантов и аскорбиновой кислоты в трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*, выращенных в условиях абиотического стресса. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2020. №1. С.20-26.
10. Приступа К.В., Кукулянская Т.А., Храпцова Е.А. Изучение состояния компонентов аскорбат-глутатионового цикла в трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*, выращенных в условиях абиотического стресса. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2021. №2. С.11-18.
11. 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.
12. 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*. 2012;32:245-258.