

УДК 577.15:577.21

## ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ *NICOTIANA TABACUM*, ВЫРАЩЕННЫХ В УСЛОВИЯХ АБИОТИЧЕСКОГО СТРЕССА

К. В. ПРИСТУПА<sup>1)</sup>, Т. А. КУКУЛЯНСКАЯ<sup>1)</sup>, Е. А. ХРАМЦОВА<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

**Аннотация.** Проведен сравнительный анализ ряда биохимических характеристик нетрансгенных и трансгенных растений *Nicotiana tabacum*, выращенных на почве с повышенной концентрацией солей тяжелых металлов. Трансгенные растения несли в своем геноме бактериальный ген *acdS*, кодирующий 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдеаминазу (АЦК-деаминазу). Обработка почвы солями меди(II), хрома(VI) и свинца(II) в повышенных концентрациях способствовала индукции экспрессии гена *acdS* и увеличению активности АЦК-деаминазы в трансгенных растениях. Показано, что при выращивании растений в условиях абиотического стресса возрастала активность супероксиддисмутазы, каталазы, полифенолоксидазы и аскорбатоксидазы, а также интенсивность процессов пероксидазного окисления.

**Ключевые слова:** антиоксидантная система; каталаза; оксидазы; ферментативные антиоксиданты; ген *acdS*; *Nicotiana tabacum*.

---

### Образец цитирования:

Приступа КВ, Кукулянская ТА, Храмцова ЕА. Изучение активности некоторых антиоксидантных ферментов в трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*, выращенных в условиях абиотического стресса. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2024;3:22–29. EDN: NKOMPQ

### For citation:

Pristupa KV, Kukulianskaya TA, Khramtsova EA. The study of activity of several antioxidant enzymes in transgenic plants *Nicotiana tabacum* under abiotic stress conditions. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2024;3:22–29. Russian. EDN: NKOMPQ

---

### Авторы:

**Кристина Владимировна Приступа** – старший преподаватель кафедры биохимии биологического факультета.

**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**, senior lecturer at the department of biochemistry, faculty of biology.

[kristina.pristupa@mail.ru](mailto:kristina.pristupa@mail.ru)

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

**Tatsiana A. Kukulianskaya**, PhD (biology), docent; associate professor at the department of biochemistry, faculty of biology.

[tak14@tut.by](mailto: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](mailto:elena_khramtsova@inbox.ru)

## THE STUDY OF ACTIVITY OF SEVERAL ANTIOXIDANT ENZYMES IN TRANSGENIC PLANTS *NICOTIANA TABACUM* UNDER ABIOTIC STRESS CONDITIONS

K. V. PRISTUPA<sup>a</sup>, T. A. KUKULIANSKAYA<sup>a</sup>, E. A. KHRAMTSOVA<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Belarusian State University, 4 Niezaliezhnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

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

**Abstract.** We conducted a comparative analysis of several biochemical parameters for non-transgenic and transgenic plants *Nicotiana tabacum*. Plants were cultivated in heavy metal polluted soils. Transgenic plants had in their genome a bacterial *acdS* gene encoding the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACC deaminase). Soil treatment with salts of copper(II), chromium(VI) and lead(II) in elevated concentrations promoted induction of the *acdS* gene expression and an increase in ACC deaminase activity in transgenic plants. It was shown the activity of superoxide dismutase, catalase, polyphenol oxidase, ascorbate oxidase, and intensity of peroxidase oxidation processes increased in plants under abiotic stress.

**Keywords:** antioxidant system; catalase; oxidases; enzymatic antioxidants; *acdS* gene; *Nicotiana tabacum*.

### Введение

В настоящее время повышение устойчивости сельскохозяйственных растений к неблагоприятным факторам окружающей среды является одной из важнейших задач, которые решают ученые со всего мира. В связи с постоянно усиливающимся техногенным воздействием на природные сообщества, а также ухудшением экологической обстановки на территориях, занятых сельскохозяйственным производством, данное направление считается актуальным во многих странах. Растения, произрастающие в неблагоприятных условиях, в той или иной степени подвергаются абиотическому стрессу, что может быть обусловлено загрязнением почв тяжелыми металлами, засухой, засолением, влиянием высоких и низких температур и т. д. [1; 2].

При стрессовых воздействиях содержание активных форм кислорода (АФК) в растительных клетках начинает возрастать и, как следствие, значительно повышается интенсивность свободнорадикальных окислительных процессов. АФК подавляют активность ряда ферментов, вызывают деградацию клеточных биополимеров, нарушают проницаемость биологических мембран, останавливают клеточный цикл и приводят к запрограммированной клеточной гибели [3]. В ответ на усиление генерации АФК, как правило, наблюдается активация энзиматических компонентов антиоксидантной защитной системы растений [4].

Развитие абиотического стресса сопровождается образованием избыточного количества этилена в растениях. Этилен представляет собой фитогормон, 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, ускорению старения, пожелтению листьев и опадению плодов. 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 превращение предшественника этилена – 1-аминоциклопропан-1-карбоксилата (АЦК) – до аммиака и  $\alpha$ -кетобутирата, которые не оказывают негативного влияния на растения [5; 6].

Устойчивость растений к неблагоприятным условиям окружающей среды, вызывающим стресс, в значительной степени обеспечивается функционированием антиоксидантной системы. Во многих странах проводится изучение антиоксидантной системы растений под влиянием избыточной концентрации тяжелых металлов в почве, создаются трансгенные растения, которые характеризуются сверхэкспрессией генов, кодирующих ферменты антиоксидантной защиты [7]. Имеются данные об изменении состояния и эффективности антистрессового действия ферментативных антиоксидантов для ряда растений, инокулированных бактериями, которые несут в своем геноме ген *acdS* [8]. Однако исследование состояния антиоксидантной системы трансгенных растений, имеющих этот ген, в условиях загрязнения почв солями тяжелых металлов не проводилось.

Целью настоящей работы является изучение влияния тяжелых металлов, внесенных в почву, на активность ряда ферментов в нетрансгенных и трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*, несущих ген *acdS* бактерий *Pseudomonas putida* B-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 являлась активность супероксиддисмутазы, каталазы, полифенолоксидазы и аскорбатоксидазы, а также интенсивность процессов пероксидазного окисления в нетрансгенных и трансгенных растениях табака.

Растения были разделены на четыре серии:

- контрольную серию (без обработки почвы солями тяжелых металлов);
- серию 1 (обработка  $\text{CuSO}_4$  в концентрации 30 мг на 1 кг почвы);
- серию 2 (обработка  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  в концентрации 15 мг на 1 кг почвы);
- серию 3 (обработка  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  в концентрации 15 мг на 1 кг почвы).

Каждая серия включала в себя пять трансгенных растений линии 4-12 и пять нетрансгенных растений *N. tabacum*.

Обработку почвы ионами тяжелых металлов проводили однократно с учетом их предельно допустимой концентрации (ПДК): вносимое количество должно было превышать ПДК в 5 раз.

Создание трансгенных растений осуществлялось согласно методике, описанной А. А. Мельниковой и соавторами. Линия трансгенных растений *N. tabacum* 4-12 получена с использованием векторной конструкции pBI121-*acdS*, несущей ген *acdS* бактерий *P. putida* В-37, который находится под контролем конститутивного промотора CaMV 35S. Генетическая конструкция была введена в клетки *Agrobacterium tumefaciens* AGL0. Полученный агробактериальный штамм использовался для трансформации каллусов *N. tabacum*. Следует отметить, что результаты ПЦР со специфическими к гену *acdS* праймерами подтвердили наличие целевого гена в трансгенных растениях *N. tabacum* [9].

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

Растительный материал в виде листьев (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 применением дезинтегратора УЗДН-2Т (НПП «Академприбор», Россия), после чего центрифугировали в течение 15 мин при скорости 10 000 об/мин. Все процедуры производили на холоде ( $4^\circ\text{C}$ ). Клеточные экстракты использовали для определения активности ферментативных антиоксидантов и содержания белка в растениях.

Интенсивность процессов пероксидазного окисления оценивали с помощью кинетического метода, основанного на определении скорости накопления продуктов окисления бензидина пероксидом водорода в присутствии экстракта растений [10].

Активность каталазы определяли методом, основанным на способности пероксида водорода образовывать с молибдатом аммония стойкий окрашенный комплекс при длине волны 410 нм [11].

Активность супероксиддисмутазы оценивали по степени ингибирования реакции аутоокисления кверцетина [12].

Определение активности аскорбатоксидазы базируется на свойстве аскорбиновой кислоты поглощать свет с максимумом при длине волны 265 нм [13].

Активность полифенолоксидазы устанавливали спектрофотометрическим методом, основанным на измерении оптической плотности продуктов реакции, которые образуются при окислении пирокатехина за определенный промежуток времени [10].

Содержание белка в растительных экстрактах определяли биуретовым методом при длине волны 540 нм<sup>1</sup>.

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью лицензионного пакета программ *Statistica* (версия 6.0). Данные представлены как средние арифметические величины  $\pm$  среднестатистические ошибки средних арифметических величин. Оценку достоверности различий средних арифметических величин проводили на основании коэффициента Стьюдента. Различия между группами считали достоверными при двустороннем уровне значимости  $p \leq 0,05$ .

## Результаты и их обсуждение

При загрязнении почвы солями тяжелых металлов наблюдается изменение ростовых характеристик растений. В рамках проведенного опыта по прошествии 3 мес. определены длина корня, стебля и биомасса растений. Так как в результате абиотического стресса длина корня и растения в целом уменьшались,

<sup>1</sup>Семак И. В., Зырянова Т. Н., Губич О. И. Биохимия белков : практикум для студентов биол. фак. спец. 1-31 01 01 «Биология». Минск : БГУ, 2007. 49 с.

то было предположено, что будет изменяться и биомасса нетрансгенных и трансгенных растений, выращенных в условиях эксперимента. Средние значения биомассы нетрансгенных и трансгенных растений табака приведены в табл. 1.

Таблица 1

Средние значения биомассы нетрансгенных и трансгенных растений *N. tabacum*, г

Table 1

The average biomass of non-transgenic and transgenic plants *N. tabacum*, g

| Серия                                                           | Нетрансгенные растения | Трансгенные растения |
|-----------------------------------------------------------------|------------------------|----------------------|
| Контрольная серия (без обработки почвы солями тяжелых металлов) | 17,95 ± 0,11           | 20,38 ± 0,03         |
| Серия 1 (обработка Cu <sup>2+</sup> в количестве 5 × ПДК)       | 7,79 ± 0,06            | 12,38 ± 0,05         |
| Серия 2 (обработка Cr <sup>6+</sup> в количестве 5 × ПДК)       | 6,67 ± 0,06            | 8,05 ± 0,05          |
| Серия 3 (обработка Pb <sup>2+</sup> в количестве 5 × ПДК)       | 7,12 ± 0,08            | 10,76 ± 0,04         |

Примечание. Различия между контрольной и опытными сериями, а также между нетрансгенными и трансгенными растениями, выращенными в аналогичных условиях, во всех случаях являются достоверными ( $p \leq 0,05$ ).

Данные, представленные в табл. 1, отображают увеличение биомассы трансгенных растений табака, выращенных в условиях загрязнения почвы солями тяжелых металлов, относительно биомассы нетрансгенных растений, выращенных в аналогичных условиях, в 1,13–1,59 раза. Таким образом, было отмечено положительное влияние гена *acdS* бактерий *P. putida* B-37 на ростовые характеристики трансгенных растений табака, культивируемых под воздействием абиотического стресса.

Кроме того, ранее нами была определена удельная активность АЦК-деаминазы в трансгенных растениях *N. tabacum* при загрязнении почвы солями тяжелых металлов. Воздействие на почву тяжелых металлов повышало активность фермента в 8–12 раз. Такое изменение активности АЦК-деаминазы, вероятно, свидетельствует об индукции экспрессии гена, кодирующего АЦК-деаминазу, под влиянием абиотических факторов окружающей среды [14].

Следует отметить, что развитие стресса у растений в условиях загрязнения почвы солями тяжелых металлов сопровождается активацией свободнорадикальных окислительных процессов в клетке, что, в свою очередь, ведет к повышению активности ферментов антиоксидантной системы [4]. В связи с этим нами была определена активность супероксиддисмутазы (табл. 2).

Таблица 2

Активность супероксиддисмутазы в нетрансгенных и трансгенных растениях *N. tabacum*, единиц активности на 1 мг белка

Table 2

Superoxide dismutase activity in non-transgenic and transgenic plants *N. tabacum*, units of activity per 1 mg of protein

| Серия                                                           | Нетрансгенные растения | Трансгенные растения |
|-----------------------------------------------------------------|------------------------|----------------------|
| Контрольная серия (без обработки почвы солями тяжелых металлов) | 0,26 ± 0,01            | 0,29 ± 0,01          |
| Серия 1 (обработка Cu <sup>2+</sup> в количестве 5 × ПДК)       | 0,71 ± 0,03*           | 0,43 ± 0,02*, **     |
| Серия 2 (обработка Cr <sup>6+</sup> в количестве 5 × ПДК)       | 0,97 ± 0,05*           | 0,50 ± 0,03*, **     |
| Серия 3 (обработка Pb <sup>2+</sup> в количестве 5 × ПДК)       | 0,89 ± 0,04*           | 0,46 ± 0,02*, **     |

Примечание. Знаком \* отмечены достоверные различия между контрольной и опытными сериями ( $p \leq 0,05$ ), а знаком \*\* – достоверные различия между нетрансгенными и трансгенными растениями, выращенными в аналогичных условиях ( $p \leq 0,05$ ).

Как видно из представленных в табл. 2 данных, при обработке почвы солями тяжелых металлов активность супероксиддисмутазы значительно увеличилась как в трансгенных, так и в нетрансгенных растениях. В нетрансгенных растениях при внесении в почву 5-кратной ПДК ионов меди(II), хрома(VI) и свинца(II) активность фермента возросла в 2,7; 3,7 и 3,4 раза соответственно по сравнению с его активностью в растениях контрольной серии. В трансгенных растениях линии 4-12 при обработке почвы

солями меди(II), хрома(VI) и свинца(II) активность супероксиддисмутазы была соответственно в 1,5; 1,7 и 1,6 раза выше, чем в серии растений, которые не подвергались абиотическим стрессовым воздействиям. Кроме того, в ходе работы определена активность каталазы в экстрактах растений *N. tabacum* всех серий (табл. 3).

Таблица 3

Активность каталазы в нетрансгенных  
и трансгенных растениях *N. tabacum*, мкмоль/мин на 1 мг белка

Table 3

Catalase activity in non-transgenic  
and transgenic plants *N. tabacum*,  $\mu\text{mol}/\text{min}$  per 1 mg of protein

| Серия                                                                    | Нетрансгенные растения | Трансгенные растения     |
|--------------------------------------------------------------------------|------------------------|--------------------------|
| Контрольная серия (без обработки почвы солями тяжелых металлов)          | $8,75 \pm 0,29$        | $9,56 \pm 0,34$          |
| Серия 1 (обработка $\text{Cu}^{2+}$ в количестве $5 \times \text{ПДК}$ ) | $21,81 \pm 0,32^*$     | $15,88 \pm 0,33^{*, **}$ |
| Серия 2 (обработка $\text{Cr}^{6+}$ в количестве $5 \times \text{ПДК}$ ) | $27,68 \pm 0,24^*$     | $16,96 \pm 0,25^{*, **}$ |
| Серия 3 (обработка $\text{Pb}^{2+}$ в количестве $5 \times \text{ПДК}$ ) | $25,24 \pm 0,32^*$     | $16,05 \pm 0,31^{*, **}$ |

Примечание. Знаком \* отмечены достоверные различия между контрольной и опытными сериями ( $p \leq 0,05$ ), а знаком \*\* – достоверные различия между нетрансгенными и трансгенными растениями, выращенными в аналогичных условиях ( $p \leq 0,05$ ).

На основе данных табл. 3 можно сделать вывод о том, что трансгенные растения *N. tabacum* отличаются более низкой активностью каталазы по сравнению с нетрансгенными растениями при загрязнении почвы солями тяжелых металлов. Так, для нетрансгенных растений при обработке почвы 5-кратной ПДК ионов меди(II), хрома(VI) и свинца(II) наблюдалось увеличение активности фермента в 2,5; 3,2 и 2,9 раза соответственно относительно его активности в контрольных образцах, выращенных без воздействия абиотического стресса. В трансгенных растениях линии 4-12 при внесении в почву солей меди(II), хрома(VI) и свинца(II) активность каталазы выросла в 1,7; 1,8 и 1,7 раза соответственно по сравнению с таковой в серии растений, почва которых не обрабатывалась солями тяжелых металлов.

Также была определена интенсивность процессов пероксидазного окисления во всех сериях нетрансгенных и трансгенных растений *N. tabacum* (табл. 4).

Таблица 4

Интенсивность процессов пероксидазного окисления в нетрансгенных  
и трансгенных растениях *N. tabacum*, мкмоль/мин на 1 мг белка

Table 4

Intensity of peroxidase oxidation processes in non-transgenic  
and transgenic plants *N. tabacum*,  $\mu\text{mol}/\text{min}$  per 1 mg of protein

| Серия                                                                    | Нетрансгенные растения | Трансгенные растения    |
|--------------------------------------------------------------------------|------------------------|-------------------------|
| Контрольная серия (без обработки почвы солями тяжелых металлов)          | $2,32 \pm 0,06$        | $2,51 \pm 0,07$         |
| Серия 1 (обработка $\text{Cu}^{2+}$ в количестве $5 \times \text{ПДК}$ ) | $6,53 \pm 0,08^*$      | $3,61 \pm 0,05^{*, **}$ |
| Серия 2 (обработка $\text{Cr}^{6+}$ в количестве $5 \times \text{ПДК}$ ) | $7,96 \pm 0,06^*$      | $4,03 \pm 0,06^{*, **}$ |
| Серия 3 (обработка $\text{Pb}^{2+}$ в количестве $5 \times \text{ПДК}$ ) | $6,88 \pm 0,05^*$      | $3,87 \pm 0,05^{*, **}$ |

Примечание. Знаком \* отмечены достоверные различия между контрольной и опытными сериями ( $p \leq 0,05$ ), а знаком \*\* – достоверные различия между нетрансгенными и трансгенными растениями, выращенными в аналогичных условиях ( $p \leq 0,05$ ).

Как видно из представленных в табл. 4 данных, трансгенные растения *N. tabacum* отличаются более низкой интенсивностью процессов пероксидазного окисления по сравнению с нетрансгенными растениями при обработке почвы солями тяжелых металлов. Максимальная интенсивность процессов пероксидазного окисления отмечена при внесении в почву ионов хрома(VI): в нетрансгенных растениях она выросла в 3,4 раза, в трансгенных растениях – в 1,6 раза относительно интенсивности данных процессов в серии растений, выращенных без воздействия абиотического стресса.



Полученные нами данные об активности супероксиддисмутазы и каталазы, а также интенсивности процессов пероксидазного окисления в растениях *N. tabacum* могут свидетельствовать об активации ферментов антиоксидантной защиты при внесении в почву солей тяжелых металлов, что, вероятно, связано с усилением процессов свободного окисления, сопровождающихся образованием АФК. Однако в трансгенных растениях активность исследуемых ферментов при обработке почвы солями тяжелых металлов увеличивается в меньшей степени, чем в нетрансгенных растениях. Возможно, это обусловлено тем, что в трансгенных растениях снижается образование АФК, в частности пероксида водорода, который является субстратом как для каталазы, так и для пероксидаз. По этой причине трансгенные растения имеют более низкую активность данных антиоксидантов по сравнению с нетрансгенными растениями при обработке почвы ионами тяжелых металлов.

На следующем этапе работы было изучено влияние тяжелых металлов на активность полифенолоксидазы (табл. 5) и аскорбатоксидазы (табл. 6).

Таблица 5

Активность полифенолоксидазы в нетрансгенных  
и трансгенных растениях *N. tabacum*, мкмоль/мин на 1 мг белка

Table 5

Activity of polyphenol oxidase in non-transgenic  
and transgenic plants *N. tabacum*,  $\mu\text{mol/min}$  per 1 mg of protein

| Серия                                                                    | Нетрансгенные растения | Трансгенные растения  |
|--------------------------------------------------------------------------|------------------------|-----------------------|
| Контрольная серия (без обработки почвы солями тяжелых металлов)          | $0,85 \pm 0,02$        | $0,86 \pm 0,02$       |
| Серия 1 (обработка $\text{Cu}^{2+}$ в количестве $5 \times \text{ПДК}$ ) | $1,42 \pm 0,04^*$      | $1,25 \pm 0,03^*, **$ |
| Серия 2 (обработка $\text{Cr}^{6+}$ в количестве $5 \times \text{ПДК}$ ) | $1,73 \pm 0,04^*$      | $1,44 \pm 0,03^*, **$ |
| Серия 3 (обработка $\text{Pb}^{2+}$ в количестве $5 \times \text{ПДК}$ ) | $1,06 \pm 0,03^*$      | $0,96 \pm 0,03^*$     |

Примечание. Знаком \* отмечены достоверные различия между контрольной и опытными сериями ( $p \leq 0,05$ ), а знаком \*\* – достоверные различия между нетрансгенными и трансгенными растениями, выращенными в аналогичных условиях ( $p \leq 0,05$ ).

Согласно приведенным в табл. 5 данным при обработке почвы 5-кратной ПДК ионов меди(II), хрома(VI) и свинца(II) активность полифенолоксидазы в нетрансгенных растениях увеличилась в 1,7; 2,1 и 1,2 раза соответственно по сравнению с ее активностью в растениях, выращенных в нормальных условиях. В трансгенных растениях при внесении в почву солей меди(II), хрома(VI) и свинца(II) активность фермента выросла в 1,5; 1,7 и 1,1 раза соответственно относительно таковой в растениях, которые выращивались на почве, не загрязненной солями тяжелых металлов.

Таблица 6

Активность аскорбатоксидазы в нетрансгенных  
и трансгенных растениях *N. tabacum*, мкмоль/мин на 1 мг белка

Table 6

Activity of ascorbate oxidase in non-transgenic  
and transgenic plants *N. tabacum*,  $\mu\text{mol/min}$  per 1 mg of protein

| Серия                                                                    | Нетрансгенные растения | Трансгенные растения    |
|--------------------------------------------------------------------------|------------------------|-------------------------|
| Контрольная серия (без обработки почвы солями тяжелых металлов)          | $0,040 \pm 0,002$      | $0,040 \pm 0,002$       |
| Серия 1 (обработка $\text{Cu}^{2+}$ в количестве $5 \times \text{ПДК}$ ) | $0,110 \pm 0,006^*$    | $0,060 \pm 0,002^*, **$ |
| Серия 2 (обработка $\text{Cr}^{6+}$ в количестве $5 \times \text{ПДК}$ ) | $0,130 \pm 0,007^*$    | $0,090 \pm 0,004^*, **$ |
| Серия 3 (обработка $\text{Pb}^{2+}$ в количестве $5 \times \text{ПДК}$ ) | $0,100 \pm 0,005^*$    | $0,050 \pm 0,002^*, **$ |

Примечание. Знаком \* отмечены достоверные различия между контрольной и опытными сериями ( $p \leq 0,05$ ), а знаком \*\* – достоверные различия между нетрансгенными и трансгенными растениями, выращенными в аналогичных условиях ( $p \leq 0,05$ ).

Как видно из данных табл. 6, в нетрансгенных растениях при обработке почвы ионами меди(II), хрома(VI) и свинца(II) активность аскорбатоксидазы выросла в 2,8; 3,3 и 2,5 раза соответственно по

сравнению с ее активностью в растениях, выращенных без воздействия абиотического стресса. В трансгенных растениях при внесении в почву солей меди(II), хрома(VI) и свинца(II) активность данного фермента увеличилась в 1,5; 2,3 и 1,3 раза соответственно относительно контроля.

Полученные нами данные об активности ряда ферментов антиоксидантной защиты согласуются с результатами предыдущих исследований, согласно которым трансгенные растения *N. tabacum* отличались более низкой общей антиоксидантной активностью [15], а также более низкой интенсивностью процессов перекисного окисления липидов по сравнению с нетрансгенными растениями в условиях абиотического стресса [16]. Кроме того, ранее нами было установлено, что при внесении в почву ионов  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  трансгенные растения *N. tabacum* имели более высокое содержание низкомолекулярных компонентов (глутатиона, аскорбиновой кислоты) и более низкую активность ферментов аскорбат-глутатионового цикла, чем нетрансгенные растения [17].

Следует упомянуть, что полученные данные согласуются с тем фактом, что для ряда растений, инокулированных бактериями, которые несли в своем геноме ген *acdS*, в условиях абиотического стресса наблюдалась более низкая активность антиоксидантных ферментов. Например, растения кукурузы, инокулированные бактериями *P. putida*, при загрязнении почвы солями тяжелых металлов характеризовались более низкой активностью супероксиддисмутазы, каталазы и ряда пероксидаз, чем неинокулированные растения [8]. Растения картофеля, выращенные в условиях воздействия на почву солей тяжелых металлов и инокулированные бактериями *Bacillus* sp., имеющими фермент АЦК-деаминазу, отличались более низкой активностью супероксиддисмутазы и каталазы по сравнению с растениями картофеля, выращенными в загрязненной тяжелыми металлами почве [18].

### Заключение

Таким образом, трансгенные растения, которые несут в своем геноме бактериальный ген *acdS* и могут синтезировать АЦК-деаминазу, в меньшей степени подвержены воздействию повышенных концентраций ионов тяжелых металлов, присутствующих в почве. Следует 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.

Полученные результаты свидетельствуют об увеличении активности ряда оксидаз, каталазы, супероксиддисмутазы и интенсивности процессов пероксидазного окисления в условиях абиотического стресса, вызванного обработкой почвы ионами  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ . Установлено, что максимальная чувствительность растений к загрязнению почвы солями тяжелых металлов отмечалась при внесении в почву солей хрома(VI).

Практическая значимость данного исследования связана с использованием трансгенных растений, которые экспрессируют бактериальный ген АЦК-деаминазы (*acdS*) и обладают 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. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Glick BR. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiology Letters*. 2005; 251(1):1–7. DOI: 10.1016/j.femsle.2005.07.030.
7. 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;26(5):591–598. DOI: 10.1007/s00299-006-0253-z.
8. 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.
9. Melnikava AA, Khramtsova 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.
10. Soffan A, Alghamdi SS, Aldawood AS. Peroxidase and polyphenol oxidase activity in moderate resistant and susceptible *Vicia faba* induced by *Aphis craccivora* (Hemiptera: Aphididae) infestation. *Journal of Insect Science*. 2014;14(1):285. DOI: 10.1093/jisesa/ieu147.

11. Korolyuk MA, Ivanova LI, Maiorova IG, Tokarev VE. Method for determining catalase activity. *Laboratornoe delo*. 1988;1:16–19. Russian. EDN: SICXEJ.
12. Kostyuk VA, Potapovich AI, Kovaleva ZhV. A simple, sensitive assay for determination of superoxide dismutase activity based on reaction of quercetin oxidation. *Voprosy meditsinskoj khimii*. 1990;36(2):88–91. Russian. EDN: SCXIZD.
13. 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* [Internet]. 2013 [cited 2024 May 17];6(supplement 4):68–71. Available from: <https://journals.innovareacademics.in/index.php/ajpcr/article/view/393>.
14. Rutkevich DA, Karaleva KS, Khramtsova EA. The influence of bacteria *acdS*-gene of *Pseudomonas putida* B-37 on *Nicotiana tabacum* transgenic plants under abiotic stress conditions. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2020;1:39–46. Russian. DOI: 10.33581/2521-1722-2020-1-39-46.
15. 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.
16. Приступа КВ, Королева ЕС, Кукулянская ТА, Руткевич ДА. Оценка состояния антиоксидантной системы трансгенных растений *Nicotiana tabacum* в условиях абиотического стресса. В: *Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии. Сборник тезисов докладов 19-й Всероссийской конференции молодых ученых, посвященной памяти академика РАСХН Георгия Сергеевича Муромцева; 15–16 апреля 2019 г.; Москва, Россия*. Москва: Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии; 2019. с. 55–56. EDN: JJDFRO.
17. 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.
18. 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 20.06.2024 / исправлена 23.08.2024 / принята 02.09.2024.  
Received 20.06.2024 / revised 23.08.2024 / accepted 02.09.2024.