ИЗУЧЕНИЕ СОСТОЯНИЯ КОМПОНЕНТОВ АСКОРБАТ-ГЛУТАТИОНОВОГО ЦИКЛА В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ *NICOTIANA TABACUM*, ВЫРАЩЕННЫХ В УСЛОВИЯХ АБИОТИЧЕСКОГО СТРЕССА

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

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

Проведен сравнительный анализ биохимических характеристик компонентов аскорбат-глутатионного цикла нетрансгенных и трансгенных растений *Nicotiana tabacum*, выращенных в почве с повышенной концентрацией солей тяжелых металлов. Трансгенные растения несли в своем геноме бактериальный *acdS*-ген, кодирующий фермент 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдеамиразу (АЦК-деамиразу). Обработка почвы ионами меди, хрома и свинца в повышенных концентрациях способствовала индукции экспрессии *acdS*-гена и увеличению активности АЦК-деамиразы в трансгенных растениях. Также показано, что в условиях абиотического стресса у исследуемых растений возрастало содержание аскорбиновой кислоты, глутатиона, аскорбатпероксидазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы.

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

STUDY OF THE ASCORBATE-GLUTATHIONE CYCLE IN TRANSGENIC PLANTS *NICOTIANA TABACUM* UNDER ABIOTIC STRESS CONDITIONS

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 biochemical parameters for the ascorbate-glutathione cycle in non-transgenic and transgenic plants *Nicotiana tabacum*, 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) enzyme. The introduction of elevated concentrations of copper, chromium, and lead ions into the soil promotes induction

Образец цитирования:

Приступа КВ, Кукулянская ТА, Храмцова ЕА. Изучение состояния компонентов аскорбат-глутатионного цикла в трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*, выращенных в условиях абиотического стресса. Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2021;2:11–18.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-2-11-18>

For citation:

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.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-2-11-18>

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. Kukulianskaya, 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

of the *acdS*-gene expression and an increase in ACC-deaminase activity in transgenic plants. It was shown 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

Одной из важнейших задач, которые стоят перед учеными в настоящее время, является повышение устойчивости сельскохозяйственных растений к неблагоприятным факторам окружающей среды. Данное направление считается актуальным в связи с постоянно усиливающимся техногенным воздействием на природные сообщества и ухудшением экологической обстановки на территориях, занятых сельскохозяйственным производством. Растения, которые произрастают в неблагоприятных условиях, подвергаются абиотическому стрессу, что может быть обусловлено загрязнением почв тяжелыми металлами, засолением, засухой и т. д. [1; 2].

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

Механизм функционирования аскорбат-глутатионового цикла заключается в восстановлении пероксида водорода до воды с участием аскорбиновой кислоты и аскорбатпероксидазы. Аскорбат в данной реакции окисляется до дегидроаскорбата, который способен вновь стать восстановленной формой за счет глутатиона. В свою очередь, восстановленный глутатион превращается в окисленную форму, которая восстанавливается в НАДФН-зависимой реакции при участии глутатионредуктазы [5].

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.

Одним из современных способов снижения избыточного количества этилена в растениях является создание трансгенных форм, которые несут в своем геноме бактериальный *acdS*-ген, кодирующий 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдеаминазу. Данный фермент катализирует разложение предшественника этилена – 1-аминоциклопропан-1-карбоксилата (АЦК) – до аммиака и α -кетобутирата [6–8].

Устойчивость растений к неблагоприятным условиям, вызывающим стресс, в значительной степени обеспечивается функционированием антиоксидантной системы. Во многих странах мира проводится изучение антиоксидантной активности растений под влиянием стрессовых воздействий, создаются трансгенные растения, которые характеризуются сверхэкспрессией генов, кодирующих компоненты аскорбат-глутатионового цикла [9]. Имеются данные об изменении состояния и эффективности антистрессового действия аскорбат-глутатионовой системы для ряда растений, инокулированных бактериями, которые несут *acdS*-ген в своем геноме [10]. Однако изучение активности аскорбат-глутатионового цикла трансгенных растений, несущих этот ген, в условиях абиотического стресса не проводилось.

Цель настоящей работы – анализ влияния тяжелых металлов, внесенных в почву, на активность ряда ферментов, а также содержание неферментативных антиоксидантов аскорбат-глутатионового цикла в нетрансгенных и трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*, несущих *acdS*-ген бактерий *Pseudomonas putida* B-37.

Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследования выступали нетрансгенные и трансгенные растения *N. tabacum*, несущие *acdS*-ген бактерий *P. putida* B-37. Предметом исследования являлась активность ферментов аскорбат-глутатионового цикла (глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза и аскорбатпероксидаза) данных растений, а также содержание в них низкомолекулярных антиоксидантов (аскорбиновая кислота и глутатион).

Растения были разделены на четыре группы:

- контрольная серия (без обработки почвы тяжелыми металлами);
- 1-я серия (обработка CuSO_4 в концентрации 30 мг на 1 кг почвы);

- 2-я серия (обработка $K_2Cr_2O_7$ в концентрации 15 мг на 1 кг почвы);
- 3-я серия (обработка $Pb(CH_3COO)_2$ в концентрации 15 мг на 1 кг почвы).

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

Каждая серия включала в себя по 5 трансгенных растений линий 4-12 и 10-38, а также 5 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 получены с использованием векторной конструкции pBI121-acdS, несущей *acdS*-ген бактерий *P. putida* B-37, который находится под контролем конститутивного промотора CaMV 35S. Генетическая конструкция введена в клетки *Agrobacterium tumefaciens* AGL0. Созданный агробактериальный штамм использован для трансформации каллусов *N. tabacum*.

Линии трансгенных растений 4-12 и 10-38 были получены с разных трансформированных клонов, следовательно, отличаются 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 линией 4-12 ($(40,00 \pm 0,09)$ см) и большую ($p \leq 0,05$) длину корня ($(1,90 \pm 0,12)$ см), чем растения линии 4-12 ($(1,5 \pm 0,1)$ см). Кроме того, данные линии растений отличались ($p \leq 0,05$) своей биомассой: линия 4-12 имела меньшую биомассу ($(20,40 \pm 0,03)$ г) по сравнению с линией 10-38 ($(23,20 \pm 0,06)$ г).

Семена растений стерильно высевали на увлажненные фильтры и в течение 2 сут выдерживали в темноте при температуре $(20,0 \pm 0,5)$ °C для прорастания. Затем проростки помещали в климатическую камеру с температурой $(20,0 \pm 0,5)$ °C и 16-часовым световым днем. Через 14 сут растения пересаживали в стаканчики со стерильной почвой (50 г). Дальнейшее культивирование производили при температуре $(20,0 \pm 0,5)$ °C, 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 (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 °C). Клеточные экстракты использовали для определения активности ферментов аскорбат-глутатионного цикла, а также содержания низкомолекулярных антиоксидантов и белка в растениях.

Содержание аскорбиновой кислоты в растительных экстрактах устанавливали спектрофотометрически с применением метода Даса, который основан на способности фосфомолибдата восстанавливаться данной кислотой до молибдата синего цвета. Измерение проводили при длине волны 660 нм [12].

Содержание восстановленного глутатиона в растительных экстрактах измеряли спектрофотометрическим методом с использованием реактива Элмана при длине волны 412 нм [13].

Активность аскорбатпероксидазы в растительных экстрактах определяли спектрофотометрически по методу, который предложили С. Верма и Р. С. Дубей, при длине волны 290 нм [14].

Активность глутатионпероксидазы в растительных экстрактах устанавливали спектрофотометрически по количеству накопленного окисленного глутатиона в среде инкубации при длине волны 260 нм [15].

Активность глутатионредуктазы в растительных экстрактах измеряли спектрофотометрически по количеству НАДФН, образующегося при восстановлении окисленного глутатиона в среде инкубации, при длине волны 340 нм [16].

Содержание белка в растительных экстрактах определяли биуретовым методом при длине волны 540 нм [17].

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью лицензионного пакета программ *Statistica 6.0*. Данные представлены в виде средних арифметических величин со среднестатистической ошибкой средних арифметических величин. 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, в том числе компонентов аскорбат-глутатионного цикла [3]. В первую очередь нами было определено содержание аскорбиновой кислоты (в миллиграммах) во всех сериях в расчете на 1 г растительного материала (табл. 1).

Таблица 1

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

Table 1

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 тяжелыми металлами	$0,73 \pm 0,015$	$0,81 \pm 0,016^a$	$0,78 \pm 0,015$
Обработка почвы Cu^{2+} в концентрации $5 \times \text{ПДК}$	$0,96 \pm 0,018^*$	$0,99 \pm 0,020^*$	$1,07 \pm 0,019^{*a}$
Обработка почвы Cr^{6+} в концентрации $5 \times \text{ПДК}$	$1,38 \pm 0,027^*$	$1,53 \pm 0,031^{*a}$	$1,74 \pm 0,037^{*a}$
Обработка почвы Pb^{2+} в концентрации $5 \times \text{ПДК}$	$0,75 \pm 0,016$	$0,88 \pm 0,018^{*a}$	$0,88 \pm 0,017^{*a}$

Примечание. * – различия между сериями без обработки почвы тяжелыми металлами и опытными сериями 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 данным при обработке почвы солями тяжелых металлов содержание аскорбиновой кислоты в трансгенных растениях повышается в той же степени, что и в нетрансгенных. Так, в нетрансгенных растениях содержание витамина С после внесения в почву ионов меди(II) и хрома(VI) увеличилось в 1,3 и 1,9 раза соответственно по сравнению с таковым в растениях, выращенных без внесения тяжелых металлов. В трансгенных растениях линии 10-38 содержание витамина С при обработке почвы ионами меди(II), хрома(VI) и свинца(II) возросло в 1,4; 2,2 и 1,1 раза соответственно по сравнению с его содержанием в растениях контрольной серии.

Помимо этого, нами было определено содержание глутатиона (в миллимолях) во всех сериях в расчете на 1 г растительного материала (табл. 2).

Таблица 2

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

Table 2

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

Серия	Нетрансгенные растения	Трансгенные растения	
		Линия 4-12	Линия 10-38
Без обработки почвы тяжелыми металлами	$3,46 \pm 0,15$	$3,43 \pm 0,16$	$3,39 \pm 0,15$
Обработка почвы Cu^{2+} в концентрации $5 \times \text{ПДК}$	$4,79 \pm 0,19^*$	$5,15 \pm 0,23^*$	$5,17 \pm 0,22^*$
Обработка почвы Cr^{6+} в концентрации $5 \times \text{ПДК}$	$5,45 \pm 0,25^*$	$5,88 \pm 0,28^*$	$5,91 \pm 0,29^*$
Обработка почвы Pb^{2+} в концентрации $5 \times \text{ПДК}$	$4,18 \pm 0,16^*$	$4,69 \pm 0,18^*$	$4,73 \pm 0,17^*$

Примечание. * – различия между сериями без обработки почвы тяжелыми металлами и опытными сериями достоверны при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Как видно из табл. 2, содержание глутатиона в растениях при абиотическом стрессе в виде солей тяжелых металлов также возрастало. Показано, что в нетрансгенных растениях при обработке почвы медью(II), хромом(VI) и свинцом(II) оно увеличилось в 1,4; 1,6 и 1,2 раза соответственно по сравнению с контролем. В трансгенных растениях линии 4-12 содержание глутатиона после внесения в почву ионов меди(II), хрома(VI) и свинца(II) возросло в 1,5; 1,7 и 1,4 раза соответственно по сравнению с его содержанием в растениях, выращенных без обработки почвы тяжелыми металлами.

На следующем этапе работы были определены активности основных ферментов аскорбат-глутатионового цикла. Нами изучено влияние солей тяжелых металлов в почве на активность аскорбатпероксидазы (выражается в относительных единицах в минуту на 1 мг белка) в исследуемых растениях (табл. 3).

Таблица 3

Активность аскорбатпероксидазы в нетрансгенных
и трансгенных растениях *N. tabacum*, отн. ед. · мин⁻¹ · мг⁻¹

Table 3

Ascorbate peroxidase activity of non-transgenic
and transgenic plants *N. tabacum*, rel. un. · min⁻¹ · mg⁻¹

Серия	Нетрансгенные растения	Трансгенные растения	
		Линия 4-12	Линия 10-38
Без обработки почвы тяжелыми металлами	0,031 ± 0,002	0,029 ± 0,003	0,030 ± 0,002
Обработка почвы Cu ²⁺ в концентрации 5 × ПДК	0,101 ± 0,004*	0,068 ± 0,004 ^a	0,066 ± 0,003 ^a
Обработка почвы Cr ⁶⁺ в концентрации 5 × ПДК	0,149 ± 0,007*	0,110 ± 0,005 ^a	0,108 ± 0,006 ^a
Обработка почвы Pb ²⁺ в концентрации 5 × ПДК	0,093 ± 0,004*	0,061 ± 0,003 ^a	0,058 ± 0,004 ^a

Примечание. * – различия между серией без обработки почвы тяжелыми металлами и опытными сериями 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 данных, в условиях абиотического стресса активность аскорбатпероксидазы значительно увеличилась и в трансгенных, и в нетрансгенных растениях. Показано, что при обработке почвы солями тяжелых металлов активность данного фермента в трансгенных растениях повышается в меньшей степени, чем в нетрансгенных. Так, в нетрансгенных растениях активность аскорбатпероксидазы после внесения в почву меди(II), хрома(VI) и свинца(II) возросла в 3,3; 4,8 и 3,0 раза соответственно по сравнению с контрольной серией, а в трансгенных растениях линии 10-38 – в 2,2; 3,6 и 1,9 раза соответственно.

Также нами было изучено влияние ионов тяжелых металлов на активность глутатионпероксидазы (выражается в микромолях на литр окисленного глутатиона в минуту на 1 мг белка) в исследуемых растениях (табл. 4).

Таблица 4

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

Table 4

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

Серия	Нетрансгенные растения	Трансгенные растения	
		Линия 4-12	Линия 10-38
Без обработки почвы тяжелыми металлами	0,027 ± 0,002	0,028 ± 0,002	0,027 ± 0,002
Обработка почвы Cu ²⁺ в концентрации 5 × ПДК	0,051 ± 0,003*	0,037 ± 0,002 ^a	0,036 ± 0,002 ^a
Обработка почвы Cr ⁶⁺ в концентрации 5 × ПДК	0,078 ± 0,004*	0,052 ± 0,003 ^a	0,053 ± 0,003 ^a
Обработка почвы Pb ²⁺ в концентрации 5 × ПДК	0,044 ± 0,002*	0,031 ± 0,002 ^a	0,030 ± 0,002 ^a

Примечание. * – различия между серией без обработки почвы тяжелыми металлами и опытными сериями 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. 4 активность глутатионпероксидазы после внесения в почву меди(II), хрома(VI) и свинца(II) в нетрансгенных растениях увеличилась в 1,9; 2,9 и 1,6 раза соответственно по сравнению с ее активностью в растениях, выращенных на не загрязненной тяжелыми металлами почве. В трансгенных растениях линии 4-12 при обработке почвы солями ионов меди(II), хрома(VI), свинца(II) активность глутатионпероксидазы выросла в 1,3; 1,9 и 1,1 раза соответственно по сравнению с серией растений, выращенных в отсутствие абиотического стресса.

На последнем этапе нами была определена активность глутатионредуктазы (выражается в микромолях на литр НАДФН в минуту на 1 мг белка) в исследуемых экстрактах растений (табл. 5).

Таблица 5

Активность глутатионредуктазы в нетрансгенных
и трансгенных растениях *N. tabacum*, $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$

Table 5

Glutathione reductase activity of non-transgenic
and transgenic plants *N. tabacum*, $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$

Серия	Нетрансгенные растения	Трансгенные растения	
		Линия 4-12	Линия 10-38
Без обработки почвы тяжелыми металлами	$0,045 \pm 0,003$	$0,044 \pm 0,002$	$0,045 \pm 0,003$
Обработка почвы Cu^{2+} в концентрации $5 \times \text{ПДК}$	$0,098 \pm 0,005^*$	$0,067 \pm 0,003^{*a}$	$0,066 \pm 0,004^{*a}$
Обработка почвы Cr^{6+} в концентрации $5 \times \text{ПДК}$	$0,132 \pm 0,006^*$	$0,082 \pm 0,004^{*a}$	$0,083 \pm 0,003^{*a}$
Обработка почвы Pb^{2+} в концентрации $5 \times \text{ПДК}$	$0,077 \pm 0,004^*$	$0,061 \pm 0,003^{*a}$	$0,061 \pm 0,002^{*a}$

Примечание. * – различия между серией без обработки почвы тяжелыми металлами и опытными сериями 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 данных, при обработке почвы солями тяжелых металлов активность глутатионредуктазы в трансгенных растениях повышается в меньшей степени, чем в нетрансгенных. Так, в нетрансгенных растениях при внесении в почву 5-кратной ПДК ионов меди(II), хрома(VI) и свинца(II) активность фермента выросла в 2,2; 2,9 и 1,7 раза соответственно по сравнению с контролем, а в трансгенных растениях линии 4-12 – в 1,5; 1,9 и 1,4 раза соответственно.

Показано, что трансгенные и нетрансгенные формы растений отвечают на абиотическое стрессовое воздействие увеличением содержания общего пула низкомолекулярных антиоксидантов, в частности аскорбата и глутатиона. Вероятно, в трансгенных растениях, несущих бактериальный *acdS*-ген, 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 результаты относительно активности ферментов аскорбат-глутатионового цикла согласуются с итогами предыдущих исследований, согласно которым трансгенные растения *N. tabacum* имели более низкую активность ферментативных антиоксидантов (пероксидазы, каталазы, супероксиддисмутаза), а также более низкую интенсивность процессов перекисного окисления липидов по сравнению с нетрансгенными формами в условиях абиотического стресса [18]. Кроме того, ранее нами было показано, что трансгенные растения *N. tabacum* отличались более высоким содержанием низкомолекулярных антиоксидантов (фенольных соединений и флавоноидов), чем нетрансгенные формы, при загрязнении почвы солями тяжелых металлов [19].

Также согласно данным литературы были получены трансгенные растения табака, которые сверхэкспрессировали супероксиддисмутазу и при этом демонстрировали увеличение активности ферментов аскорбат-глутатионового цикла. Эти растения отличались повышенной устойчивостью к окислительному стрессу, только если другие антиоксиданты (в частности, глутатион и аскорбат) тоже присутствовали в клетке в высоких концентрациях [9].

Полученные данные согласуются с выводами, что для ряда растений, инокулированных бактериями, которые несли в своем геноме *acdS*-ген, в условиях абиотического стресса наблюдалась более низкая

активность ферментов аскорбат-глутатионового цикла. Так, например, растения кукурузы, инокулированные бактериями *P. putida*, при засухе имели более низкую активность аскорбатпероксидазы и глутатионпероксидазы по сравнению с неинокулированными растениями [10]. В свою очередь, стоит отметить, что растения картофеля, выращенные в условиях воздействия на почву тяжелых металлов и инокулированные бактериями *Bacillus* sp., имеющими фермент АЦК-деаминазу, отличались более низкой активностью аскорбатпероксидазы и глутатионредуктазы, чем неинокулированные растения картофеля, выращенные на загрязненной тяжелыми металлами почве [20].

Заключение

Таким образом, трансгенные растения, несущие в своем геноме бактериальный *acdS*-ген и способные 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 (большая длина стебля, корня) и более высокую биомассу, чем нетрансгенные образцы [11].

Полученные результаты свидетельствуют об увеличении содержания глутатиона, аскорбиновой кислоты, повышении активности ферментов аскорбат-глутатионового цикла в условиях абиотического стресса, вызванного обработкой почвы ионами Cu^{2+} , Cr^{6+} , Pb^{2+} . Продemonстрировано, что наименьшая чувствительность растений к загрязнению почвы солями тяжелых металлов отмечалась при внесении в почву солей свинца(II).

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.
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. 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.
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. Grichko VP, Filby B, Glick BR. Increased ability of transgenic plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase to accumulate Cd, Co, Cu, Ni, Pb, and Zn. *Journal of Biotechnology*. 2000;81(1):45–53. DOI: 10.1016/S0168-1656(00)00270-4.
8. 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.
9. 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.
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. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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(suppl. 4):68–71.
16. 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.
17. Семак ИВ, Зырянова ТН, Губич ОИ. *Биохимия белков*. Минск: БГУ; 2007. 49 с.

18. 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 XIX 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.

19. Приступа КВ, Кукулянская ТА, Храмцова 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.

20. 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(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.

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. Viazau YV, Kozel NV, Domanskii VP, Shalygo NV. Activity of ascorbate-glutathione cycle in cucumber plants (*Cucumis sativus*) under led lighting. *Vesci Nacyjanal' naj akademiі navuk Belarusi. Seryja bijalagichnyh navuk*. 2014;1:78–83. Russian.

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. Grichko VP, Filby B, Glick BR. Increased ability of transgenic plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase to accumulate Cd, Co, Cu, Ni, Pb, and Zn. *Journal of Biotechnology*. 2000;81(1):45–53. DOI: 10.1016/S0168-1656(00)00270-4.

8. 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.

9. 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.

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, Khramtsova AA, Karaleva KS, Rutkevich DA, Kukulienskaya 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. 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.

13. 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.

14. 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.

15. 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(suppl. 4):68–71.

16. 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.

17. Semak IV, Zyryanova TN, Gubich OI. *Biokhimiya belkov* [Biochemistry of proteins]. Minsk: Belarusian State University; 2007. 49 p. Russian.

18. Pristupa KV, Karaleva KS, Kukulienskaya TA, Rutkevich DA. [Assessment status of the antioxidant system transgenic plants *Nicotiana tabacum* under abiotic stress]. In: *Biotehnologiya v rastenievodstve, zhivotnovodstve i sel'skokhozyaystvennoy mikrobiologii. Sbornik tezisev dokladov XIX Vserossiiskoi konferentsii molodykh uchenykh, posvyashchennoi pamyati akademika RASKhN Georgiya Sergeevicha Muromtseva; 15–16 aprelya 2019 g.; Moskva, Rossiya* [Biotechnology in crop production, animal husbandry and agricultural microbiology. Collection of abstracts of the 19th All-Russian conference of young scientists dedicated to the memory of the Russian Academy of Agricultural Sciences academician Georgy S. Muromtsev; 2019 April 15–16; Moscow, Russia]. Moscow: All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology; 2019. p. 55–56. Russian.

19. Pristupa KV, Kukulienskaya 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.

20. 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(2):245–258. DOI: 10.1007/s00344-012-9292-6.

Получена 20.10.2020 / исправлена 02.02.2021 / принята 03.05.2021.
Received 20.10.2020 / revised 02.02.2021 / accepted 03.05.2021.