

АКТИВНОСТЬ АСКОРБАТ-ПЕРОКСИДАЗЫ В РАСТЕНИЯХ И КАЛЛУСАХ ОГУРЦА И РЕДИСА ПРИ ДЕЙСТВИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

И.Д. Михайлова, А.С. Лукаткин

ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский
государственный университет им. Н.П. Огарева»

Поступила в редакцию 01.02.2023 г.

Аннотация. Интенсивное развитие промышленности и сельского хозяйства привело к возрастанию в окружающей среде токсикантов, среди которых особо значимыми являются тяжелые металлы (ТМ). Тяжелые металлы оказывают стрессовое воздействие на растения, приводящее к различным аномалиям в клетках, повреждению структур и метаболических функций, снижению или полному подавлению образования органического вещества. При действии ТМ возникает окислительный стресс, обусловленный возрастом генерации активированных форм кислорода (АФК). Защита от окислительного стресса в растениях в значительной степени определяется активностью антиоксидантных ферментов, среди которых большую роль играет аскорбат-пероксидаза (АПО), утилизирующая H_2O_2 . Целью исследования было сравнительное изучение активности АПО в молодых растениях и каллусных культурах *in vitro* огурца (*Cucumis sativus* L., сорт Единство) и редиса (*Raphanus sativus* L., сорт Красный великан) при действии различных концентраций ионов ТМ (Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+}).

Каллусную ткань огурца и редиса высаживали на среду Мурасиге–Скуга с добавлением солей ТМ $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $Pb(NO_3)_2$, $NiSO_4 \cdot 7H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ в конечных концентрациях 10 мкМ, 0.1 мМ и 1 мМ и выращивали 4–5 недель *in vitro*. Растения огурца и редиса росли 7 суток в стерильных условиях на водных растворах с добавлением ТМ в тех же концентрациях. В семядольных листьях растений и каллусах определяли активность АПО по понижению оптической плотности при длине волны 290 нм (по Nakano, Asada, 1981 с модификациями).

Определение активности АПО в молодых растениях и каллусах огурца и редиса, выращенных на фоне различных доз ТМ в среде, показало, что в большинстве вариантов ионы металлов вызывали повышение активности. Это можно рассматривать как защитную реакцию антиоксидантной системы, направленную на утилизацию ТМ-индуцированных АФК в клетках. При сравнении влияния ТМ на активность АПО в растениях и каллусах огурца выявлено, что ионы Pb^{2+} оказали более сильную активацию АПО в растениях, чем в каллусной культуре, тогда как Zn^{2+} и Cu^{2+} – наоборот, в клетках каллусной ткани. У редиса более значительная активация фермента была в растениях на фоне Ni^{2+} , Zn^{2+} и Pb^{2+} , но при действии Cu^{2+} – в каллусах.

Ключевые слова: аскорбат-пероксидаза, огурец, редис, растение, каллус, тяжелые металлы

Загрязнение биосферы ТМ резко увеличилось с начала XX века [1,2], и во всем мире представляет серьезную проблему для окружающей среды и здоровья человека [3, 4]. Поступившие в организм ТМ выводятся очень медленно, и даже небольшое их поступление с пищей может вызвать кумулятивный эффект [5–7].

Тяжелые металлы могут оказывать стрессовое воздействие на растения, приводящее к различным физико-химическим аномалиям в клетках, повреж-

дению структур и метаболических функций, снижению или полному подавлению образования органического вещества [8–10]. Поэтому необходимо тщательно изучать пути поступления ТМ в почвы и растения, роль каждого элемента и их взаимодействия в животном и растительном организмах, а также выявлять пути смягчения «металлического стресса» [2]. Вопрос весьма актуален в связи с тем, что токсическое действие ТМ сильно сказывается на культурных растениях, а в настоящее время их часто приходится культивировать в условиях загрязнения, особенно вблизи крупных городов [1, 11].

Известно, что в неблагоприятных условиях в растениях возрастает образование АФК, что приводит к окислительному стрессу, нарушению обмена веществ, ускоренному старению и разрушению клеток [12]; это показано при действии сублетальных концентраций ТМ, и приводит к значительным нарушениям метаболизма и разрушениям биомолекул [13, 14]. Также ТМ оказывают негативное воздействие на защитную систему растительных клеток – ферменты супероксиддисмутазу (СОД), каталазу, пероксидазы, и др. [2, 15].

Культура клеток высших растений представляет собой хорошую модель для изучения молекулярных и клеточных механизмов устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам [16], дает возможность изучения влияния стрессовых факторов на клеточном уровне [17]. Более того, культуры клеток и тканей растений позволяет контролировать нужные характеристики и поведение клеток в условиях стресса, независимо от регуляторных систем, которые имеются в целом растении [18]. Известно, что ответные реакции в растении и культуре клеток могут очень сильно различаться [17], и это дает возможность разграничения клеточных и организменных механизмов регуляции.

Ранее нами было показано разнонаправленное действие низких и высоких концентраций ионов ТМ (Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+}) на каллусогенез, генерацию супероксидного анион-радикала, интенсивность перекисного окисления липидов в каллусах и проростках огурца и редиса [19–23]. В большинстве вариантов низкие дозы ТМ в среде стимулировали каллусогенез и рост, не активировали генерацию АФК и проявления окислительного стресса; однако высокие концентрации ТМ запускали окислительный стресс и ингибировали жизнедеятельность растений и каллусов. Известно, что защита от окислительного стресса в растениях в сильной степени определяется уровнем низкомолекулярных антиоксидантов и активностью антиоксидантных ферментов [2, 12, 24].

Несмотря на многочисленность исследований, посвященных изучению стрессового действия ТМ на компоненты про-/антиоксидантной систем у растений, до сих пор остается много вопросов. Среди них – насколько существенны межвидовые различия в направленности изменений этих систем? Как глубоко различия между ТМ, индуцирующими окислительный стресс? Где проходит концентрационная грань, отделяющая действие ряда эссенциальных ТМ как микроэлементов от

вызывающих повреждения, и насколько она различается для разных видов растений и металлов? Наконец, насколько глубоко различия в реакции на ТМ растений и полученных из них каллусных клеток?

Для частичного ответа на поставленные вопросы было проведено определение влияния ионов ТМ на активность антиоксидантного фермента аскорбат-пероксидазы (АПО) в проростках и каллусных тканях огурца и редиса при действии ионов ТМ. АПО (КФ 1.11.1.11), один из ключевых ферментов антиоксидантной защитной системы, локализована в различных клеточных компартментах и является, наряду с каталазой, главным ферментом, утилизирующим H_2O_2 [24–26].

Целью исследования было сравнительное изучение активности АПО в молодых растениях *in vivo* и каллусных культурах *in vitro* огурца и редиса при действии различных концентраций ионов ТМ (Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+}).

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследования были проростки и каллусы огурца (*Cucumis sativus* L., сорт Единство) и редиса (*Raphanus sativus* L., сорт Красный великан).

В ходе работы параллельно проводилось несколько экспериментов:

1. Получение каллусной ткани огурца и редиса в культуре *in vitro* и ее выращивание на среде Мурасиге-Скуга (МС) с добавлением ТМ в конечных концентрациях 10 мкМ, 0.1 мМ и 1 мМ;
2. Выращивание молодых растений огурца и редиса в стерильных условиях на водных растворах с добавлением ТМ в тех же концентрациях;
3. Определение влияния тяжелых металлов на активность аскорбат-пероксидазы в растениях и каллусных культурах огурца и редиса.

Первый эксперимент включал в себя следующие этапы:

- а) стерилизация семян, которую проводили по схеме: KMnO_4 (20 мин) → хлорамин 6 % (8 мин) → спирт 70 % (1 мин) → дистиллированная вода;
- б) выращивание стерильных растений на мостиках из фильтровальной бумаги;
- в) посадка эксплантов на питательную среду МС с добавлением регуляторов роста 6-БАП (от 0.5 до 2 мг/л) и 2,4-Д (от 1 до 5 мг/л) и перенос в термостат для образования каллусной ткани;
- г) пересадка первичных каллусов на среду МС с добавлением растворов солей ТМ: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ до достиже-

ния конечных концентраций 10 мкМ, 0.1 мМ, 1 мМ (для ТМ, входящих в состав маточного раствора микроэлементов по прописи МС). Каллусы выращивали в термостате при температуре 23 °С до возраста 4–5 недель. Контролем служили каллусы, выращенные на среде МС без дополнительного внесения ТМ.

Во втором эксперименте поверхностно стерилизованные семена высаживали в стерильных условиях на такие же растворы, содержащие соли ТМ (контроль – на воду), и растения выращивали в течение 7 дней при температуре 22–25 °С, освещении люминесцентными лампами при плотности потока фотонов около 80 мкмоль/(м²·с), фотопериоде 12/12 ч, влажности воздуха около 80%.

После достижения указанного возраста в каллусах и растениях определяли активность аскорбат-пероксидазы.

Активность АПО определяли по методике [25] с некоторыми модификациями [24]. Высечки семядольных листьев массой 1 г гомогенизировали на холоде в 10 мл 50 мМ фосфатного буфера (рН 7.6) с добавлением 0.3 г поливинилпирролидона. Полученную смесь фильтровали и центрифугировали 10 мин при 8000 g. Реакционная смесь состояла из 50 мкл 0,1 мМ ЭДТА, 50 мкл 0.05 мМ аскорбиновой кислоты, 50 мкл 0.1 мМ перекиси водорода, 2.55 мл фосфатного буфера (рН 7.6) и 300 мкл полученного экстракта. Оптическую плотность регистрировали на спектрофотометре UVmini-1240 Shimadzu при длине волны 290 нм против контроля, которым служила смесь без ферментного экстракта [21]. При расчете активности аскорбат-пероксидазы использовали понижение оптической плотности раствора за первые 30 сек реакции с коэффициентом молярной экстинкции $\epsilon = 2,8 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

Повторности и статистическая обработка результатов. Все опыты проводили в трех биологических повторностях, каждый опыт повторяли не менее 3 раз. Результаты обрабатывали статистически по общепринятым биометрическим

формулам с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel 2007. В таблицах и на графиках приведены средние значения из всех опытов с их стандартными ошибками.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Растительные клетки содержат обезвреживающие АФК ферменты, такие как СОД, каталазу, АПО и др. [26]. Их активность существенно меняется при действии стрессовых факторов. АПО – утилизирующий H₂O₂ фермент, использующий в качестве доноров электронов аскорбиновую кислоту, и обладающий более высокой аффинностью к H₂O₂, чем каталаза [24, 26]. Активность этого фермента рассматривается как ключевая в противодействии окислительному стрессу, особенно в структурах растений, где не работает каталаза [25]. При действии ТМ на разные виды растений показано как увеличение, так и подавление активности АПО [26]. Это обстоятельство требует детального анализа влияния различных ТМ, а также их концентраций на активность АПО в разных видах растений и тканях.

Влияние различных концентраций ТМ на активность аскорбат-пероксидазы в растениях огурца. При анализе действия различных ТМ была показана неодинаковая реакция АПО в семядольных листьях огурца на концентрации металлов в среде (табл. 1). На фоне повышенных доз ионов никеля установлено, что лишь в концентрации 10 мкМ Ni²⁺ оказал ингибирующее действие на фермент растения, а в концентрации 1 мМ – значительно стимулировал АПО (увеличение активности почти в 2 раза).

Несколько иное действие оказали на молодые растения огурца ионы цинка: при всех концентрациях значения активности АПО были ниже контроля. Наиболее резкое падение активности (на 83.9 % относительно контроля) наблюдали при концентрации 10 мкМ Zn²⁺.

Сходная с ионами цинка зависимость активности фермента от концентрации выявлена для

Таблица 1

Влияние различных концентраций ионов ТМ на активность АПО в семядольных листьях 7-дневных растений огурца, ммоль/г·мин

Ионы ТМ	Контроль (вода)	Концентрации ионов		
		10 мкМ	0,1 мМ	1 мМ
Ni ²⁺	0.31±0.009	0.25±0.020*	0.30±0.012	0.60±0.015*
Zn ²⁺		0.05±0.005*	0.13±0.004*	0.16±0.002*
Cu ²⁺		0.10±0.007*	0.12±0.007*	0.10±0.007*
Pb ²⁺		0.81±0.010*	0.56±0.012*	0.69±0.013*

* - различия с контролем достоверны при P = 0.05

Cu^{2+} : при всех дозах ионов меди в среде она была ниже контроля, достоверных концентрационных различий не было.

При действии ионов свинца (неэссенциального элемента) активность АПО была резко повышена относительно контроля, наиболее значительно – в концентрации 10 мкМ (на 161.3 %).

Таким образом, у растений огурца выявлено как снижение, так и возрастание активности АПО при действии различных ионов ТМ и их концентрациях в среде. Достоверное повышение активности аскорбат-пероксидазы вызывали ионы Ni^{2+} (1 мМ) и Pb^{2+} , снижение – Ni^{2+} (10 мкМ), Zn^{2+} и Cu^{2+} .

Активность аскорбат-пероксидазы в каллусах огурца на фоне ионов ТМ. Активность АПО в каллусах огурца, выращенных на средах с добавлением ТМ, изменялась неоднозначно (табл. 2). В эксперименте с внесением избыточных доз Ni^{2+} наблюдали возрастание активности фермента с увеличением концентрации никеля в среде, и при дозе 1 мМ активность АПО была самой высокой, на 46.4 % превысив контроль.

Обратная тенденция наблюдалась при действии ионов цинка на каллусную культуру огурца, хотя здесь все концентрации показали тенденцию к стимулированию активности АПО. При этом, чем выше была концентрация ионов Zn^{2+} , тем ниже была активность фермента.

В опытах с ионами Cu^{2+} активность АПО в каллусах огурца падала с увеличением концентрации меди в среде. В итоге активность АПО в

каллусах огурца, выращенных на среде МС с добавлением $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, была максимальной при концентрации 10 мкМ, где увеличение относительно контроля составило 39.3 %, и минимальной при дозе Cu^{2+} 1 мМ (ниже контроля в 2 раза).

Ионы свинца, наоборот, вызывали подавление активности АПО в каллусах огурца при дозе 10 мкМ (на 64.3 % к контролю), но активировали в высокой концентрации (1 мМ) на 25 %.

Изменения активности АПО у растений редиса при действии различных концентраций ТМ. Активность АПО проявила значительное повышение в семядольных листьях редиса, выращенных на среде с внесением ионов Ni^{2+} ; при этом наибольшая активация фермента (на 71.2 %) отмечена для самой малой дозы никеля в среде, и с увеличением концентрации Ni^{2+} активность фермента снижалась (табл. 3).

В растениях редиса, выращенных на растворах, содержащих ионы Zn^{2+} , активность АПО была повышена при всех исследованных дозах, максимально (в 2.75 раз) при концентрации Zn^{2+} 0.1 мМ.

Выявлено, что ионы Cu^{2+} достоверно снижали активность АПО в проростках редиса, прогрессирующе с увеличением дозы ионов меди в среде. Максимальное подавление активности фермента (на 79.8 %) показано при дозе 1 мМ.

При изучении активности АПО в семядольных листьях редиса на фоне ионов Pb^{2+} обнаружено повышение относительно водного контроля на 40.4–91.3 %, которое было максимальным при

Таблица 2

Влияние различных концентраций ионов ТМ на активность АПО в 4-недельной каллусной культуре огурца, ммоль/г·мин

Ионы ТМ	Контроль	Концентрации ионов		
		10 мкМ	0,1 мМ	1 мМ
Ni^{2+}	0.28±0.01	0.28±0.014	0.37±0.014*	0.41±0.013*
Zn^{2+}		0.39±0.012*	0.35±0.022*	0.32±0.067
Cu^{2+}		0.39±0.023*	0.21±0.014*	0.14±0.013*
Pb^{2+}		0.10±0.007*	0.31±0.011	0.35±0.013*

* - различия с контролем достоверны при $P = 0.05$

Таблица 3

Влияние различных концентраций ионов ТМ на активность АПО в семядольных листьях 7-дневных растений редиса, ммоль/г·мин

Ионы ТМ	Контроль (вода)	Концентрации ионов		
		10 мкМ	0,1 мМ	1 мМ
Ni^{2+}	1.04±0.020	1.78±0.0096*	1.67±0.012*	1.22±0.013*
Zn^{2+}		1.52±0.0075*	2.86±0.021*	2.62±0.012*
Cu^{2+}		0.28±0.0086*	0.23±0.017*	0.21±0.014*
Pb^{2+}		1.99±0.0053*	1.82±0.015*	1.46±0.012*

* - различия с контролем достоверны при $P = 0.05$

самой малой дозе ТМ в среде, и минимальным – при самой большой.

Изменение активности АПО в каллусных тканях редиса при действии различных концентраций ТМ. Активность АПО в каллусах редиса возростала относительно контроля почти во всех вариантах эксперимента (кроме самой высокой дозы ионов Cu^{2+} в среде) (табл. 4). При этом активность фермента максимально (на 31.3 – 51.7 % к контролю) возросла при самой низкой концентрации всех ТМ (10 мкМ). Увеличение доз ТМ в среде культивирования привело к небольшому понижению активности относительно этой концентрации.

Таким образом, определение активности АПО в молодых растениях и каллусах огурца и редиса, выращенных на фоне различных доз ТМ в среде, показало, что в большинстве вариантов ионы металлов вызывали повышение активности. Это можно рассматривать как защитную реакцию антиоксидантной системы, направленную на утилизацию ТМ-индуцированных АФК в клетках [26]. На это указывает тот факт, что во многих вариантах опыта активация АПО была максимальной при самых низких дозах ТМ в среде (10 мкМ), которые не могли вызвать запуск окислительного стресса и появления каких-либо повреждений в клетках. Однако такие микродозы ТМ вполне заметно индуцировали генерацию АФК, которые проявляли свойства сигнальных молекул, активирующих защитную систему.

Известно, что при действии различных стрессоров, в том числе ТМ, в растительных клетках возрастает образование АФК. Избыточная генерация супероксидного анион-радикала нормализуется посредством работы СОД, что приводит к повышению уровня H_2O_2 ; пероксид водорода может функционировать как сигнал окислительного стресса, который приводит к индукции генов цитозольной АПО [27]. Показано, что повышение уровня H_2O_2 на 23–39 % достаточно для индукции синтеза цитозольной АПО [28].

В нашей работе мы видим, что начальное повышение уровня ТМ в среде культивирования как растений, так и каллусов приводит к значительному возрастанию активности АПО. Такое увеличение можно интерпретировать как реакцию клеток на сигнал возрастающего содержания H_2O_2 . Можно видеть, что для разных ТМ величина ответных изменений активности АПО не всегда подчиняется концентрационным зависимостям: тенденция к повышению активности АПО при возрастании дозы ТМ в среде отмечена для ионов никеля (растения и каллусы огурца), цинка (только растения огурца и редиса), и свинца (только каллусы огурца). Однако гораздо чаще видна противоположная тенденция, когда с увеличением дозы ТМ в среде активность АПО падает: это отмечено почти для всех вариантов ТМ в каллусах и растениях редиса (кроме цинка в растениях), а также свинца (в растениях огурца), цинка и меди (в каллусах огурца). Очевидно, столь разнонаправленная реакция изменений активности АПО указывает на то, что разные ТМ в одинаковых концентрациях могут оказывать различающееся действие на про-/антиоксидантную систему в растительных клетках, и что у разных видов растений и типов тканей эта реакция также может различаться. Наконец, нельзя исключать вариант, когда высокие концентрации ТМ в среде могут вызывать повреждение клеток, результирующее в падении активности антиоксидантной защиты, что свидетельствует об исчерпании защитных способностей клетки и о невозможности справиться с повышенными уровнями АФК (в данном случае H_2O_2).

Сравнение реакции каллусов и проростков огурца на действие ТМ. Одной из задач работы было сравнение реакции каллусов и проростков на действие различных ТМ. Расчетные значения изменений активности АПО в каллусах и растениях огурца к контролю приведены на рис. 1.

При сравнении влияния ионов никеля на активность АПО в каллусах и растениях огурца показано, что абсолютные значения в большинстве

Таблица 4

Влияние различных концентраций ионов ТМ на активность АПО в 5-недельной каллусной культуре редиса, ммоль/г·мин

Ионы ТМ	Контроль	Концентрации ионов		
		10 мкМ	0,1 мМ	1 мМ
Ni^{2+}	1.18±0.020	1.55±0.012*	1.24±0.011*	1.35±0.013*
Zn^{2+}		1.79±0.032*	1.74±0.012*	1.68±0.021*
Cu^{2+}		1.60±0.012*	1.40±0.019*	0.17±0.032*
Pb^{2+}		1.65±0.014*	1.56±0.012*	1.33±0.012*

* - различия с контролем достоверны при $P = 0.05$

вариантов были близкими (см. табл. 1 и 2). Однако относительно водного контроля наблюдали небольшое превышение активности АПО в каллусах при низких дозах Ni^{2+} в среде и в растениях при концентрации 1 мМ (рис. 1, А).

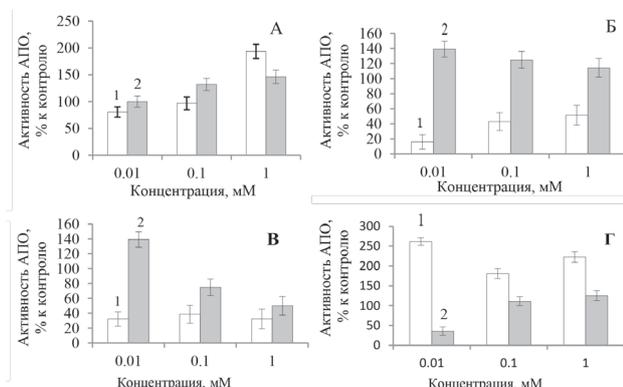


Рис. 1. Относительные изменения активности АПО в 7-дневных проростках (1) и 4-недельной каллусной культуре (2) огурца при действии ионов различных ТМ: А – Ni^{2+} , Б – Zn^{2+} , В – Cu^{2+} , Г – Pb^{2+} .

Влияние ионов цинка на активность АПО было однозначно выражено негативно в растениях и активирующе в каллусах, в результате в каллусах относительное изменение активности АПО всегда было значительно больше, чем в растениях (рис. 1, Б).

При сравнении влияния ионов меди установлено, что абсолютные значения активности АПО в каллусной культуре превышали значения в проростках (см. табл. 1 и 2). Эта тенденция подтвердилась при сравнении относительных изменений активности АПО, которые всегда были выше в каллусах, чем в молодых растениях (рис. 1, В).

При действии ионов свинца наблюдали прямо противоположную картину (см. табл. 1 и 2): если в растениях они привели к значительному превышению абсолютных значений активности АПО, то в каллусах – лишь к небольшим варьированиям относительно контроля. Поэтому изменения активности фермента, выраженные в процентах к водному контролю, были более сильными в растениях, чем в каллусах (рис. 1, Г).

Таким образом, из представленных данных видно, что ионы Pb^{2+} оказали более сильное положительное воздействие на активность АПО в растениях, чем в каллусной культуре огурца, тогда как Zn^{2+} и Cu^{2+} – наоборот, в клетках каллусной ткани.

Сравнение реакции каллусов и проростков редиса на действие ТМ. Сравнение реакции растений и каллусов редиса на действие ТМ показало, что ответные реакции сильно варьируют в зависимо-

сти от того, какие металлы воздействуют (рис. 2). Так, действие ионов никеля привело к более значительному возрастанию активности АПО в семядольных листьях растений редиса, чем в каллусах, за исключением концентрации 1 мМ (рис. 2, А).

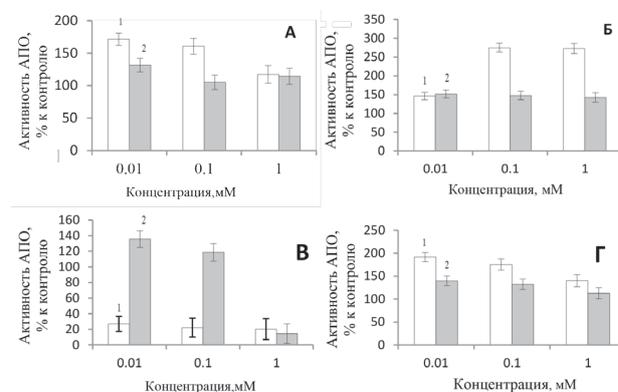


Рис. 2. Относительные изменения активности АПО в 7-дневных проростках (1) и 5-недельной каллусной культуре (2) редиса при действии ионов различных ТМ: А – Ni^{2+} , Б – Zn^{2+} , В – Cu^{2+} , Г – Pb^{2+} .

При действии ионов цинка относительная активность АПО возросла как в семядольных листьях, так и в каллусах, но изменения были более выраженными в растениях (за исключением концентрации 0.01 мМ в среде) (рис. 2, Б).

При анализе действия ионов Cu^{2+} видно значительное подавление активности АПО в растениях редиса, отмеченное при всех дозах ионов меди в среде, и активация АПО в каллусах (за исключением концентрации 1 мМ, где различия между растениями и каллусами были незначительными) (рис. 2, В). Действие ионов меди на активность антиоксидантных ферментов и проявление окислительного стресса было выражено сильнее у проростков по сравнению с каллусами *in vitro*.

Активность АПО при действии ионов Pb^{2+} возросла относительно водного контроля, сравнение растений и каллусов редиса показало более высокие значения увеличения активности в семядольных листьях растений на фоне ионов Pb^{2+} .

Рассматривая относительные изменения активности АПО в растениях и каллусах редиса при действии ионов ТМ, можно заключить, что более значительная активация фермента была в растениях на фоне Ni^{2+} , Zn^{2+} и Pb^{2+} , но при действии Cu^{2+} – в каллусах. Однако, если оценивать по степени изменения активности, ионы меди также оказали более сильное влияние на АПО, только в плане инактивации фермента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Растения располагают большим арсеналом специфических и неспецифических систем и механизмов защиты и детоксикации ТМ. Известно, что центральное место в ответе растений на действие ТМ занимает возникновение окислительного стресса; возрастание уровней АФК, в том числе H_2O_2 , индуцирует повышение активности антиоксидантных ферментов, ответственных за их утилизацию. Одной из ведущих в этом процессе является аскорбат-пероксидаза.

Культура клеток и тканей *in vitro* дает возможность изучения влияния стрессовых факторов на растение на клеточном уровне. В ходе анализа реакции растений и каллусных культур огурца и редиса выявлены различия, очевидно, обусловленные особенностями каллусных тканей, которые могут быть связаны с отсутствием дальнего транспорта ионов, как это происходит в целом растении; отсутствием надклеточного уровня регуляции, на который в растении влияют ионы ТМ; отсутствием тканей, избирательно поглощающих тяжелые металлы; а также может быть результатом автоселекционных процессов, происходящих в культуре *in vitro*, или адаптации на клеточном уровне к избыточным дозам ТМ, что можно использовать в селекции металлоустойчивых форм растений [29].

По совокупности данных по влиянию ТМ на активность АПО и другие физиологические и биохимические параметры, приведенные в [19–23], каллусная культура более устойчива к воздействию большинства исследуемых ТМ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alengebawy A., Abdelkhalek S.T., Qureshi S.R., Wang M.-Q. // *Toxics*. 2021. Vol. 9. Art. 42.
2. Башмаков Д.И., Лукаткин А.С. Эколого-физиологические аспекты аккумуляции и распределения тяжелых металлов у высших растений. Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2009. 236 с.
3. Bhunia P. // *J. Hazard. Toxic. Radioact. Waste*. 2017. Vol. 21. Art. 02017001.
4. Ali H., Khan E., Ilahi I. // *J. Chem*. 2019. Vol. 2019. Art. 6730305.
5. Lu X., Zhang X., Li L.Y., Chen H. // *Environ. Res*. 2014. Vol. 128. P. 27–34.
6. Xiao R., Wang S., Li R., Wang J.J., Zhang Z. *Ecotoxicol. Environ. Saf*. 2017. Vol. 141. P. 17–24.
7. Tong S., Li H., Wang L., Tudi M., Yang L. // *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2020. Vol. 17. Art. 3099.
8. Anjum N.A., Singh H.P., Khan M.I., Masood A., Per T., Negi A., Batish D., Khan N.A., Duarte A.C., Pereira E., Ahmad I. // *Environ. Sci. Pollut. Res*. 2015. Vol. 22. P. 3361–3382.
9. Asati A., Pichhode M., Nikhil K. // *Int. J. Appl. Innovat. Engin. Manag*. 2016. Vol. 5. № 3. P. 56–66.
10. Lukatkin A.S., Bashmakov D.I., Al Harbawee W.E.Q., Teixeira da Silva J.A. // *Int. J. Phytorem*. 2021. V. Vol. 23. № 3. P. 219–230.
11. Bashmakov D.I., Lukatkin A.S., Ali B. // *Nickel in Relation to Plants*. Eds Barkat Ali, S. Hayat, A. Ahmad. New Delhi-Chennai-Mumbai-Kolkata: Narosa Publishing House, 2009. Chapter 3. P. 33–67.
12. Dumanović J., Nepovimova E., Natić M., Kuča K., Jačević V. // *Front. Plant Sci*. 2021. Vol. 11. Art. 552969.
13. Bashmakov D.I., Stepanov M.E., Anjum N.A., Lukatkin A.S. // *Oxidative stress in plants: causes, consequences and tolerance* / Eds. Anjum N. A., Umar S., Ahmad A. I.K. International Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi, 2012. Ch. 9. P. 321–352.
14. Wu X., Cobbina S.J., Mao G., Xu H., Zhang Z., Yang L. // *Environ. Sci. Pollut. Res*. 2016. Vol. 23. P. 8244–8259.
15. Fornazier R. K., Ferreira R. R., Pereira G. J., Molina S.M., Smith J., Lea P. J. // *Plant Cell, Tissue Organ Culture*. 2002. Vol. 71. № 2. P. 125–131.
16. Лукаткин А.С. // Доклады РАСХН. 2010. № 5. С. 10–12.
17. Гладков Е.А. // *Биотехнология*. 2006. № 3. С. 79–82.
18. Errabii T., Gandonou C.B., Essalmani H., Abrini J., Idaomar M., Senhaji N.S. // *Acta Physiol. Plant*. 2007. Vol. 29. P. 95–102.
19. Михайлова И.Д., Егорова И.В., Лукаткин А.С. // Вестник Мордов. ун-та. Сер. «Биол. науки». 2011. № 4. С. 210–212.
20. Lukatkin A. S., Michailova I.D., Teixeira da Silva J. A. // *Folia Horti*. 2013. Vol. 25. № 2. P. 141–151.
21. Lukatkin A., Egorova I., Michailova I., Malec P., Strzałka K. // *J. Trace Elem. Med. Biol*. 2014. Vol. 28. № 1. P. 80–86.
22. Михайлова И.Д., Лукаткин А.С. // Известия Саратовского университета. Новая серия. Сер. Химия. Биология. Экология. 2016. Т. 16. Вып. 2. С. 206–210.
23. Михайлова И. Д., Лукаткин А. С. // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Естественные науки. 2022. № 2. С. 3–11.
24. Лукаткин А.С. Холодовое повреждение теплолюбивых растений и окислительный стресс. Саранск: Изд-во Морд. ун-та, 2002. 208 с.

25. Nakano Y., Asada K. // *Plant Cell Physiol.* 1981. Vol. 22. P. 867–80.
26. Anjum N.A., Sharma P., Gill S.S., Hasanuz-zaman M., Khan E.A., Mohamed A.A., Kachhap K., Thangavel P., Devi G.D., Vasudhevan P., Sofo A., Khan N.A., Misra A.N., Lukatkin A.S., Singh H.P., Pereira E., Tuteja N. // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2016. Vol. 23. № 19. P. 19002–19029.
27. Prasad T. K., Anderson M. D., Martin B. A., Stewart C. R. // *Plant Cell.* 1994. Vol. 6. № 1. P. 65–74.
28. Morita S., Kaminaka H., Masumura T., Tanaka K. // *Plant Cell Physiol.* 1999. Vol. 40. № 4. P. 417–422.
29. Гладков Е.А. // *С.-х. биология.* 2008. № 3. С. 83-87.

Мордовский государственный университет
им. Н.П. Огарева

*Лукаткин А. С., доктор биологических наук,
профессор кафедры общей биологии и экологии
E-mail: aslukatkin@yandex.ru

Михайлова И. Д., соискатель, кафедры общей
биологии и экологии

E-mail: kariglazayi@yandex.ru

Mordovia State University

*Lukatkin A. S., PhD., DSci., Full Professor,
Department of General Biology and Ecology
E-mail: aslukatkin@yandex.ru

Mikhailova I. D., post-graduate student,
Department of General Biology and Ecology

E-mail: kariglazayi@yandex.ru

ASCORBATE PEROXIDASE ACTIVITY IN CUCUMBER AND RADISH PLANTS AND CALLUSES AFFECTED BY HEAVY METALS

I.D. Mikhailova, A.S. Lukatkin

N.P. Ogarev National Research Mordovia State University

Abstract. Intensive development of industry and agriculture has led to toxicants increase in the environment, and heavy metals (HMs) are particularly significant. HMs have a stressful effect on plants, leading to various abnormalities in cells, damage to structures and metabolic functions, decrease or complete cessation of organic matter production. HMs induces in cells the initiation of oxidative stress, which leads to increased generation of activated oxygen species (AOS). Protection against oxidative stress in plants is largely determined by the activity of antioxidant enzymes, among which ascorbate peroxidase (APO), which utilizes H_2O_2 , plays a major role. The aim of the study was to compare the activity of APO in young plants and *in vitro* callus cultures of cucumber (*Cucumis sativus* L., cv. Unity) and radish (*Raphanus sativus* L., cv. Red Giant) affected by different concentrations of HMs (Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+}) ions.

Cucumber and radish callus tissue was grown on Murashige-Scoog medium with the addition of salts $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $Pb(NO_3)_2$, $NiSO_4 \cdot 7H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ at final concentrations of 10 μM , 0.1 mM and 1 mM and grown for 4–5 weeks *in vitro*. Cucumber and radish plants grew 7 days at sterile conditions on aqueous solutions with the addition of TM in the same concentrations. In calluses and cotyledons of seedlings, APO activity was determined by a decrease in optical density at 290 nm (according to Nakano and Asada, 1981, with modifications).

Determination of APO activity in seedlings and calluses of cucumber and radish grown on the media supplemented with different doses of HMs showed, in most cases, the increase in APO activity. This can be considered as a protective reaction of the antioxidant system aimed at the utilization of the HM-induced AOS in the cells. A comparison of HM effect on APO activity in cucumber plants and calluses revealed that Pb^{2+} ions had a stronger activation of APO in plants than in callus culture, whereas Zn^{2+} and Cu^{2+} , on the contrary, in callus cells. In radish, the APO activation was more significant in plants in case of Ni^{2+} , Zn^{2+} , and Pb^{2+} , but in callus cells at Cu^{2+} action.

Keywords: ascorbate peroxidase, cucumber, radish, plant, callus, heavy metals

REFERENCES

1. Alengebawy A., Abdelkhalek S.T., Qureshi S.R., Wang M.-Q., *Toxics*, 2021, Vol. 9, art. 42.
2. Bashmakov D.I., Lukatkin A.S. *Jekologo-fiziologicheskie aspekty akumuljaccii i raspredelenija tjazhelyh metallov u vysshih rastenij*. Saransk: Izd-vo Mordov. un-ta, 2009, 236 p.
3. Bhunia P., *J Hazard Toxic Radioact Waste*, 2017, Vol. 21, art. 02017001.
4. Ali H., Khan E., Ilahi I., *J Chem*, 2019, Vol. 2019, art. 6730305.
5. Lu X., Zhang X., Li L.Y., Chen H., *Environ Res*, 2014, Vol. 128, pp. 27–34.
6. Xiao R., Wang S., Li R., Wang J.J., Zhang Z., *Ecotoxicol Environ Saf*, 2017, Vol. 141, pp. 17–24.
7. Tong S., Li H., Wang L., Tudi M., Yang L., *Int J Environ Res Public Health*, 2020, Vol. 17, art. 3099.
8. Anjum N.A., Singh H.P., Khan M.I., Masood A., Per T., Negi A., Batish D., Khan N.A., Duarte A.C., Pereira E., Ahmad I., *Environ Sci Pollut Res*, 2015, Vol. 22, pp. 3361–3382.
9. Asati A., Pichhode M., Nikhil K., *Int J Appl Innovat Engin Manag*, 2016, Vol. 5, No 3, pp. 56–66.
10. Lukatkin A.S., Bashmakov D.I., Al Harbawee W.E.Q., Teixeira da Silva J.A., *Int J Phytorem*, 2021, Vol. 23, No 3, pp. 219–230.
11. Bashmakov D.I., Lukatkin A.S., Ali B. *Nickel in Relation to Plants*, Eds Barkat Ali, S. Hayat, A. Ahmad, New Delhi-Chennai-Mumbai-Kolkata, Narosa Publishing House, 2009, Ch. 3, pp. 33–67.
12. Dumanović J., Nepovimova E., Natić M., Kuča K., Jačević V., *Front. Plant Sci*, 2021, Vol. 11, art. 552969.
13. Bashmakov D.I., Stepanov M.E., Anjum N.A., Lukatkin A.S. *Oxidative stress in plants: causes, consequences and tolerance*, Eds. Anjum N. A., Umar S., Ahmad A., New Delhi, I.K. International Publishing House Pvt. Ltd., 2012, Ch. 9, pp. 321–352.
14. Wu X., Cobbina S.J., Mao G., Xu H., Zhang Z., Yang L., *Environ Sci Pollut Res*, 2016, Vol. 23, pp. 8244–8259.
15. Fornazier R. K., Ferreira R. R., Pereira G. J., Molina S.M., Smith J., Lea P. J., *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 2002, Vol. 71, No 2. P. 125–131.
16. Lukatkin A.S., *Doklady RASHN*, 2010, No 5, pp. 10–12.
17. Gladkov E.A., *Biotehnologija*, 2006, No 3, pp. 79–82.
18. Errabii T., Gandonou C.B., Essalmani H., Abrini J., Idaomar M., Senhaji N.S., *Acta Physiol Plant*, 2007, Vol. 29, pp. 95–102.
19. Michailova I.D., Egorova I.V., Lukatkin A.S., *Vestnik Mordov un-ta. Ser Biol nauki*, 2011, No 4, pp. 210–212.
20. Lukatkin A. S., Michailova I.D., Teixeira da Silva J. A., *Folia Horti*, 2013, Vol. 25, No 2, pp. 141–151.
21. Lukatkin A., Egorova I., Michailova I., Malec P., Strzałka K., *J Trace Elem Med Biol*, 2014, Vol. 28, No 1, pp. 80–86.
22. Michailova I.D., Lukatkin A.S., *Izvestija Saratovskogo universiteta. Novaja serija. Ser Himija. Biologija. Jekologija*, 2016, Vol. 16, No 2, pp. 206–210.
23. Michailova I.D., Lukatkin A.S., *Izvestija vysshih uczebnyh zavedenij. Povolzhskij region. Estestvennye nauki*, 2022, No 2, pp. 3–11.
24. Lukatkin A.S. *Holodovoe povrezhdenie teploljubivyh rastenij i oksiditel'nyj stress*, Saransk, Izd-vo Mord. un-ta, 2002, 208 p.
25. Nakano Y., Asada K., *Plant Cell Physiol*, 1981, Vol. 22, pp. 867–80.
26. Anjum N.A., Sharma P., Gill S.S., Hasanuzzaman M., Khan E.A., Mohamed A.A., Kachhap K., Thangavel P., Devi G.D., Vasudhevan P., Sofo A., Khan N.A., Misra A.N., Lukatkin A.S., Singh H.P., Pereira E., Tuteja N., *Environ Sci Pollut Res*, 2016, Vol. 23, No 19, pp. 19002–19029.
27. Prasad T. K., Anderson M. D., Martin B. A., Stewart C. R., *Plant Cell*, 1994, Vol. 6, No 1, pp. 65–74.
28. Morita S., Kaminaka H., Masumura T., Tanaka K., *Plant Cell Physiol*, 1999, Vol. 40, No 4, pp. 417–422.
29. Gladkov E.A., *S.-h. biologija*, 2008, No 3, pp. 83–87.