

УДК 581.1

РЕАКЦИЯ РАСТЕНИЙ *Nicotiana tabacum*, ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ГЕНОМ ХОЛИНОКСИДАЗЫ (*codA*), НА ДЕЙСТВИЕ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА

© 2021 г. И. Г. Широких^{1,2, *}, С. Ю. Огородникова², Я. И. Назарова¹, О. Н. Шуплецова¹

¹ФГБНУ Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого, Киров, 610007 Россия

²Институт биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, 167982 Россия

*e-mail: irgenal@mail.ru

Поступила в редакцию 04.06.2020 г.

После доработки 30.09.2020 г.

Принята к публикации 02.11.2020 г.

Генная инженерия синтеза глицинбетаина (ГБ) предлагает новый подход к повышению продуктивности и стресс-устойчивости культурных растений. Для выяснения возможного влияния бактериальной гетерологичной последовательности на реакцию растений при окислительном стрессе (ОС), индуцированном 3 мМ пероксидом водорода (H₂O₂), использовали независимые трансгенные линии табака (*Nicotiana tabacum* L.) Cod 16 и Cod 45 с геном холиноксидазы (*codA*) из *Arthrobacter globiformis*, отвечающим за синтез глицинбетаина. Трансгенные линии отличались от исходных растений меньшей устойчивостью к действию H₂O₂, что выразилось в более значительном снижении пула фотосинтетических пигментов, большей интенсивности перекисного окисления липидов, динамике активности супероксиддисмутазы (СОД) и пероксидазы (ПО). По показателям, характерным для проявления ОС, трансгенные линии с первоначально близкими значениями накопления ГБ (0.825–0.910 мкмоль/г) имели между собой существенные различия. У линии Cod 16 реакция на индукцию ОС заключалась в более раннем (через 1 ч после обработки H₂O₂) и более значительном, чем у Cod 45 и исходного сорта, повышении активности ПО и содержания пролина. У линии Cod 45 наблюдали значительное увеличение активности ПО и СОД, содержания пролина в ответ на индукцию ОС через 24 ч после обработки и, в отличие от исходного сорта и линии Cod 16, сопровождавшемся существенным повышением содержания в листьях каротиноидов. При использовании методов генной инженерии для повышения продуктивности и стрессоустойчивости растений необходимо учитывать функциональное взаимодействие антиоксидантов и осмопротекторов.

Ключевые слова: окислительный стресс, глицинбетаин, малоновый диальдегид, пролин, антиоксидантные ферменты, пластидные пигменты

DOI: 10.31857/S0555109921020148

Воздействие на растения таких стрессовых факторов, как засуха, повышенная соленость или кислотность почвы, ионная токсичность, экстремальные температуры, существенно снижает продуктивность сельскохозяйственных культур. Потери, обусловленные различными абиотическими стрессами, составляют в общих потерях сельского хозяйства США и России порядка 70–80% [1]. Актуальность изучения механизмов устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды обусловлена также прогнозируемым увеличением площади территорий, подверженных стрессовым воздействиям, в связи с постоянным ростом народонаселения и глобальными изменениями климата [2].

Воздействия на растения различных абиотических стрессов имеют между собой много общего. Как известно, у растений разных видов в ответ на действие стресс-факторов различной природы происходит избыточное образование активных

форм кислорода (АФК), что принято рассматривать как окислительный стресс (ОС), приводящий к повреждению практически всех компонентов клетки [3, 4]. Исследования последних двух десятилетий показали, что различные стрессы также влекут за собой снижение в клетках содержания воды и связанное с этим нарушение водного баланса. При этом большинство адаптационных реакций у растений направлено на стабилизацию и защиту клеточных структур путем синтеза соединений со стресс-протекторными свойствами, в частности, различных антиоксидантов (АО) и совместимых осмолитов.

В литературе есть сведения о связи между функционированием систем ионного гомеостатирования и антиоксидантной защиты растений [5, 6], однако до конца связь между активностью антиоксидантных ферментов и устойчивостью растений к действию стрессоров остается пока не

выясненной. Это объясняется сложностью и взаимозависимостью различных механизмов устойчивости, а также функциональным взаимодействием различных компонентов антиоксидантной системы, в том числе скорее, ферментативных и низкомолекулярных АО. Помимо АО белковой природы и низкомолекулярных, способность прямо и косвенно взаимодействовать с АФК проявляют и многие другие соединения, накапливающиеся в растительных клетках в большом количестве, например, пролин и другие осмопротекторы. Эти соединения и ранее хорошо известные “классические” АО находятся в сложном функциональном взаимодействии [3]. Несмотря на то, что механизмы антиоксидантной защиты растений в стрессовых условиях активно исследуются, до сих пор влияние одних ее звеньев на функционирование других остается слабо изученным. Таковым остается вопрос о том, что происходит с ферментами антиоксидантной защиты и низкомолекулярными АО при повышении содержания в растениях глицинбетаина (триметилглицина) — одного из эффективных осмопротекторов, который накапливается в значительных количествах в клетках некоторых растений в ответ на высокую соленость, холод и засуху. Знание особенностей такого взаимодействия необходимо для установления связи между показателями функционирования антиоксидантной системы растений и их стресс-устойчивостью.

У большинства растений, включая культурные виды, уровень естественного накопления глицинбетаина (ГБ) бывает слишком низким для адекватной регуляции осмотического давления в условиях стресса. Однако трансгенные формы, содержащие бактериальный ген холиноксидазы, способны к сверхнакоплению ГБ и проявляют устойчивость к различным абиотическим стрессам, связанном с нарушением водного обмена [7–10]. Описаны примеры снижения активности отдельных антиоксидантных ферментов и окислительных повреждений при генетических трансформациях, увеличивающих накопление ГБ [6, 11].

Известно, что ключевым событием при действии водного дефицита, солевого стресса и других повреждающих факторов, является образование пероксида водорода (H_2O_2) [4, 12]. Как сигнальный посредник H_2O_2 задействован в активации системы антиоксидантной защиты, индукции накопления совместимых осмолитов, а также в регуляции ионного гомеостаза растительных клеток [13]. В связи с этим систему антиоксидантной защиты растения можно активировать посредством его обработки экзогенным H_2O_2 , как модулятором окислительного стресса.

Цель работы — изучение реакции пула фотосинтетических пигментов и отдельных компонентов антиоксидантной системы на воздействие ОС, индуцированный пероксидом водорода, у расте-

ний табака исходного сорта и линий, трансформированных геном бактериальной холиноксидазы.

МЕТОДИКА

В работе использовали растения *Nicotiana tabacum* L. исходного сорта Самсун и линии Cod 16 и Cod 45, независимо трансформированные геном *codA*, кодирующим холиноксидазу (КФ 1.1.3.17) бактерии *Arthrobacter globiformis*. Целевой ген *codA* был снабжен сигнальной последовательностью, которая обеспечивала доставку фермента холиноксидазы внутрь пластидного компартмента [14]. Пробирочные растения с молекулярно подтвержденной экспрессией гена *codA* были предоставлены Г.Н. Ралдугиной (ИФР им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия). Растения табака микроклонально размножили на среде МС [15] без гормонов и витаминов, а при достижении возраста 6 нед. (хорошо сформированная корневая система) перенесли в почву и выращивали в климатической камере “Ика” при 25/18°C (день/ночь), освещении 4000 лк и фотопериоде 16 ч [16]. Через 7 нед. после адаптации к почвенным условиям растения подвергали ОС. В качестве модулятора ОС применяли обработку листьев табака пероксидом водорода в концентрации 3.0 мМ H_2O_2 .

Для биохимических анализов использовали пластинки зрелых листьев от шести растений в каждом варианте. Сырую биомассу листьев определяли обычным гравиметрическим методом, для определения сухой биомассы — листья высушивали при 103°C до постоянного веса.

Содержание в листьях малонового диальдегида (МДА), активность антиоксидантных ферментов определяли дважды — через 1 и 24 ч после обработки растений экзогенным H_2O_2 , фотосинтетические пигменты и пролин определяли однократно, через 24 ч, ГБ — однократно, до обработки растений H_2O_2 .

Содержание фотосинтетических пигментов после экстракции ацетоном определяли на спектрофотометре Specol (“Analytik Jena”, Германия) при длинах волн 662, 644 (хлорофиллы) и 440.5 нм (каротиноиды) [17] и выражали в мг/г сухой массы. Значения коэффициентов вариации для содержания в листьях хлорофиллов *a* и *b*, каротиноидов не превышали 8%.

Содержание ГБ определяли спектрофотометрически с солью Рейнеке [18], как описано в руководстве [19].

Содержание МДА определяли спектрофотометрически по образованию окрашенного комплекса с тиобарбитуровой кислотой при нагревании [20].

Экстракцию свободного пролина и его определение проводили по методу [21].

Определение общей активности СОД (КФ 1.15.1.1) проводили по методу [22], основанному на ингибировании СОД фотохимического восстановления нитросинего тетразолия до формазана.

Активность пероксидазы (ПО, КФ1.11.1.11) определяли спектрофотометрически по скорости окисления гваякола [23]. Все данные выражали в пересчете на сухую массу растений.

Полученные данные обрабатывали методами параметрической статистики Microsoft Excel 2007 и выражали как средние арифметические величины из трех биологических повторностей \pm стандартная ошибка средней величины.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В листьях растений исходного сорта ГБ не был обнаружен, тогда как у трансгенных линий Cod 16 и Cod 45 его концентрации составили соответственно 0.825 и 0.910 мкмоль/г, что можно объяснить конститутивной экспрессией *codA* трансгена под контролем 35S CaMV промотора. Известно, что даже в небольших (субмиллимолярных) концентрациях ГБ эффективен при снятии стрессов, связанных с нарушением обводненности тканей растения [24].

Одним из проявлений окислительного стресса для растений является нарушение функционирования фотосинтетического аппарата. В нормальных условиях линии табака, экспрессирующие ген *codA* из *A. globiformis*, существенно различались между собой по величине пула фотосинтетических пигментов. Так, линия Cod 16 характеризовалась существенно более высоким, а линия Cod 45 более низким, чем растения исходного генотипа, содержанием фотосинтетических пигментов. В результате обработки листьев табака 3 мМ H₂O₂ наблюдали резкое сокращение в течение суток количества пластидных пигментов по сравнению с интактными растениями (рис. 1). Суммарное содержание хлорофиллов *a* и *b* у растений сорта Самсун, линий Cod 16 и Cod 45 снизилось на 22, 33 и 42% соответственно. При этом у трансформированных линий сократилось содержание хлорофиллов обоих типов, в отличие от исходного сорта, у которого содержание хлорофилла *b* практически не изменилось в результате обработки H₂O₂.

Окислительный стресс приводит к повреждению практически всех компонентов клетки, вызывает усиление перекисного окисления липидов (ПОЛ), в результате чего накапливается продукт их распада – МДА. Под влиянием пероксида водорода у растений табака исходного сорта содержание МДА в листьях возрастало в течение 1 ч на 60%, но через сутки снижалось, и превышение над интактными растениями составляло не более 9% (рис. 2). Иная динамика в накоплении МДА

прослеживалась в листьях трансформированных растений. В первый срок наблюдений (через 1 ч) увеличение интенсивности ПОЛ у них было гораздо менее значительным, чем у исходного сорта и составило всего 22–24%. Через сутки содержание МДА в обработанных пероксидом водорода листьях увеличилось в 1.9 (линия Cod 16) и 2.2 (линия Cod 45) раза по сравнению с интактными растениями. Эти результаты хорошо согласовывались с данными о более значительном повреждении пигментного комплекса при индукции ОС у трансформантов по сравнению с растениями исходного сорта. Возможной причиной снижения устойчивости к ОС у линий, трансформированных геном бактериальной холиноксидазы, могло быть косвенное влияние ГБ, пока мало изученное, на экспрессию нескольких эндогенных генов в трансгенных растениях [25–27]. Возможно также участие ГБ в работе сразу нескольких метаболических путей: фотосинтез, репликация ДНК, трансдукция сигналов и биосинтез растительных гормонов, недавно установленное при секвенировании транскриптомов томатов, трансформированных геном *codA* и исходной линии [28]. Во многих исследованиях показана положительная корреляция между накоплением ГБ и стресс-устойчивостью растений, однако полученные в настоящей работе результаты с ними не вполне согласуются. В то же время, некоторые авторы отмечают существование в отношении действия ГБ на АФК возрастной периодизации и тканевой специфичности [6]. Например, положительные эффекты, связанные с локализацией ГБ в трансгенных по *codA* растениях томата, были наиболее выраженными в тканях генеративных органов (цветки, плоды), а не в листьях [24, 26].

Известно, что для регулирования уровня АФК и избегания окислительных повреждений у растений выработана система антиоксидантной защиты, состоящая из ферментов и низкомолекулярных веществ. При их скоординированной работе АФК не накапливаются в токсичных количествах, и опасность возникновения окислительных повреждений значительно снижается. К числу эффективных низкомолекулярных АО принадлежат каротиноиды. Содержание каротиноидов в ответ на обработку листьев табака пероксидом водорода снизилось на 44% у исходного сорта Самсун и на 29% у линии Cod 16 (рис. 1). В тех же условиях у линии Cod 45, напротив, наблюдали увеличение содержания каротиноидов на 41% по сравнению с интактными растениями.

Имеются сведения об антиоксидантных свойствах известных осмопротекторов, в частности пролина, что указывает на полифункциональность этого соединения [3]. В обычных условиях содержание пролина в листьях табака линии Cod 16 в 3.7 раз выше содержания у исходного сорта, а у линии Cod 45 в 3.9 раз ниже, чем у исходного

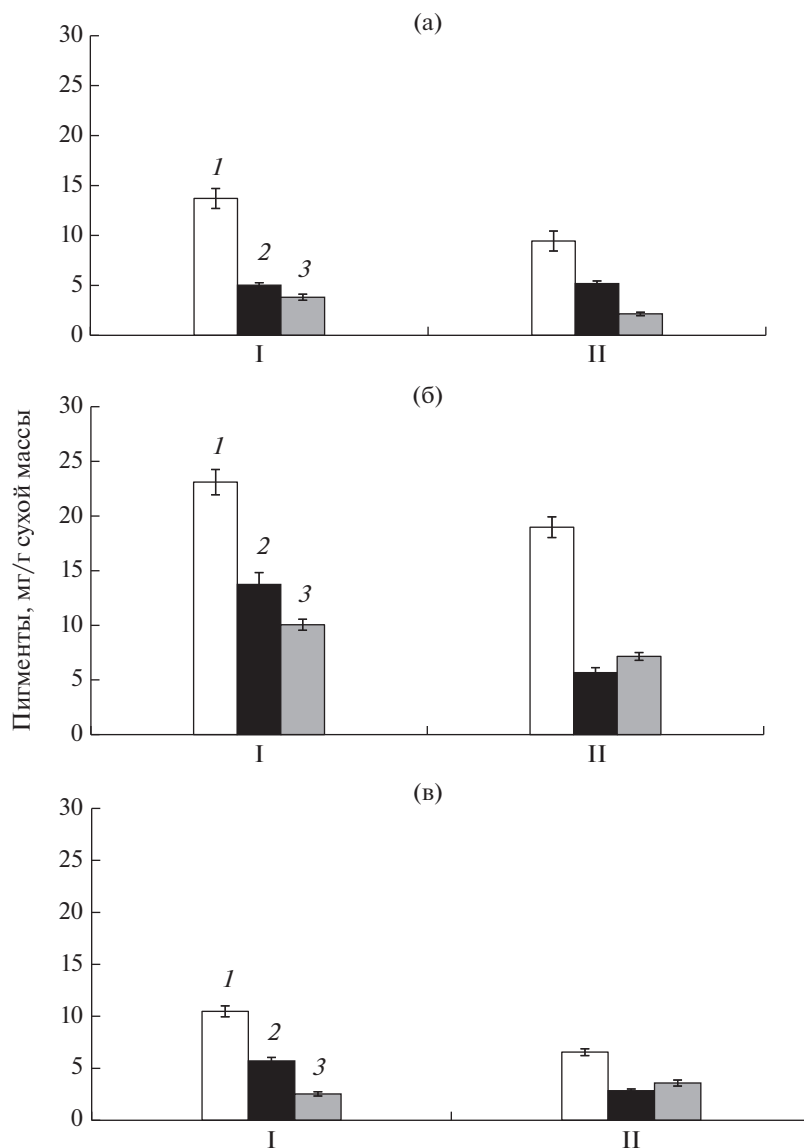


Рис. 1. Изменение пула фотосинтетических пигментов (мг/г сухой массы) в листьях табака исходного сорта (а) и трансгенных линий Cod 16 (б) и Cod 45 (в) в результате обработки перексидом водорода: 1 – хлорофилл а, 2 – хлорофилл б, 3 – каротиноиды. I – контроль, II – обработка 3 мМ Н₂О₂.

сорта (рис. 3). Под влиянием пероксида водорода содержание пролина увеличивалось в листьях линии Cod 16 в 1.9 раза, а линии Cod 45 – в 4.4 раза по сравнению с интактными растениями. В литературе уже сообщалось о способности ГБ вызывать в растениях сверхнакопление других осмолитов, включая пролин [29]. Опираясь на эти данные и собственные результаты, можно предположить, что значительные различия в содержании пролина между линиями трансформантов объяснялись более стабильной экспрессией встроенного гена у линии Cod 16 по сравнению с Cod 45. В пользу этого предположения свидетельствует также более высокая у линии Cod 16 сохранность пула фотосинтетических пигментов (рис. 1) и менее значи-

тельное, чем у линии Cod 45, накопление МДА (рис. 2).

Важным механизмом поддержания гомеостаза подвергнутых окислительному стрессу клеток является активация антиоксидантных ферментов, в частности – СОД, которая превращает супероксидные анион-радикалы в Н₂О₂, и ПО, которая обезвреживает Н₂О₂ [3, 4]. У табака исходного сорта показатели активности СОД и ПО через 1 ч после индукции ОС имели значения более низкие, чем у интактных растений (рис. 4а и 4в). Лишь спустя 24 ч после обработки листьев Н₂О₂ наблюдали повышение на 64% активности СОД (рис. 4б) и на 16% активности ПО (рис. 4г). У трансформированных геном холиноксидазы рас-

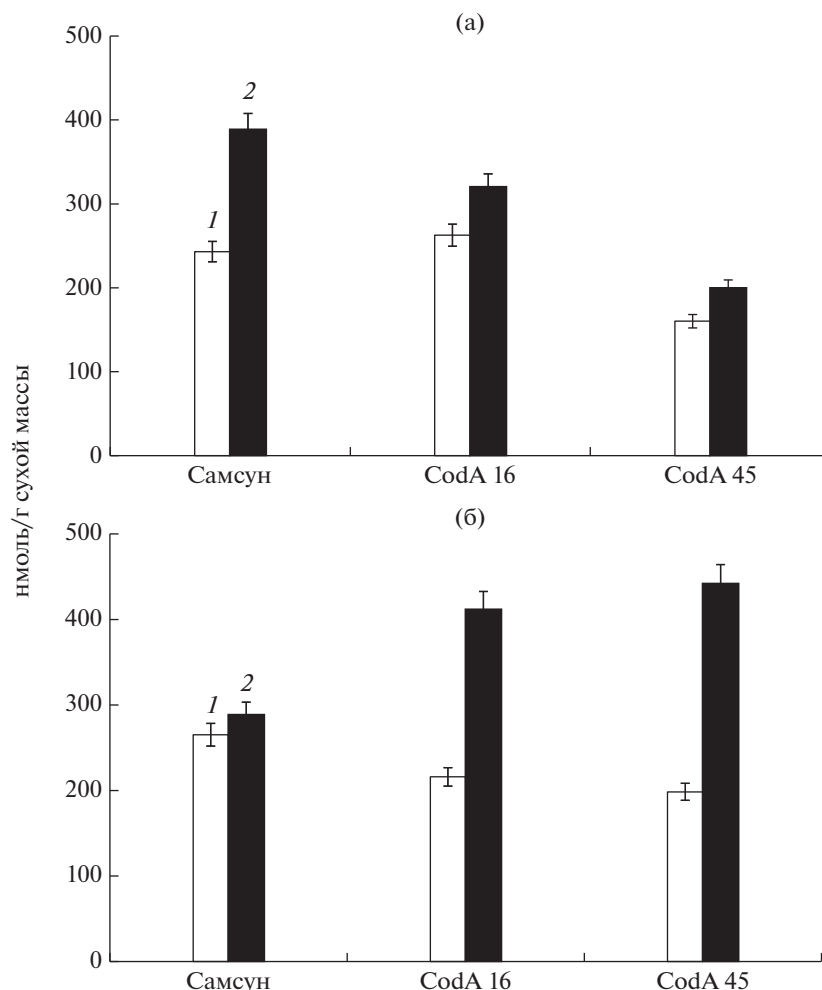


Рис. 2. Изменение содержания МДА (нмоль/г сухой массы) в листьях табака через 1 (а) и 24 ч (б) после обработки пероксидом водорода: 1 – контроль, 2 – обработка 3 мМ H₂O₂.

тений активность ПО при обработке H₂O₂ изменялась различным образом. В листьях растений линии Cod 16 ПО активировалась сразу и в течение суток сохранялась на уровне, превышающем уровень у интактных растений на 21–28%, тогда как у линии Cod 45 нарастание активности ПО было постепенным, но более значительным (рис. 4в и 4г). Через сутки уровень активности ПО в листьях линии Cod 45 был в 4.9 раза выше уровня ПО у контрольных растений. Также постепенно повышалась под воздействием агента ОС у этой линии и активность СОД, которая через 1 ч после обработки превысила на 16%, а через 24 ч – на 66% уровень контрольных растений (рис. 4а и 4б). У линии Cod 16, напротив, обработка H₂O₂ существенных изменений в активности СОД по сравнению с интактными растениями, не вызвала.

Таким образом, степень окислительных повреждений возрастала в ряду исследованных генотипов: Самсун < Cod 16 < Cod 45. Трансформированные бактериальным геном холиноксидазы *codA* растения табака отличались меньшей устой-

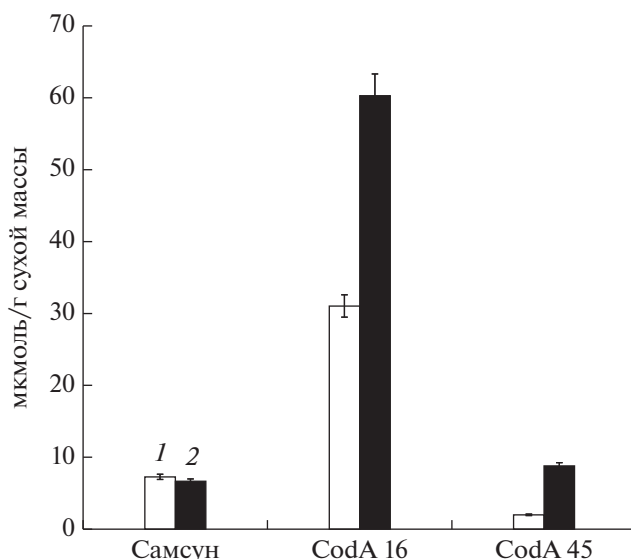


Рис. 3. Содержание пролина (мкмоль/г сухой массы) в листьях табака исходного сорта и трансгенных линий Cod 16 и Cod 45 через 24 ч после обработки пероксидом водорода: 1 – контроль, 2 – обработка 3 мМ H₂O₂.

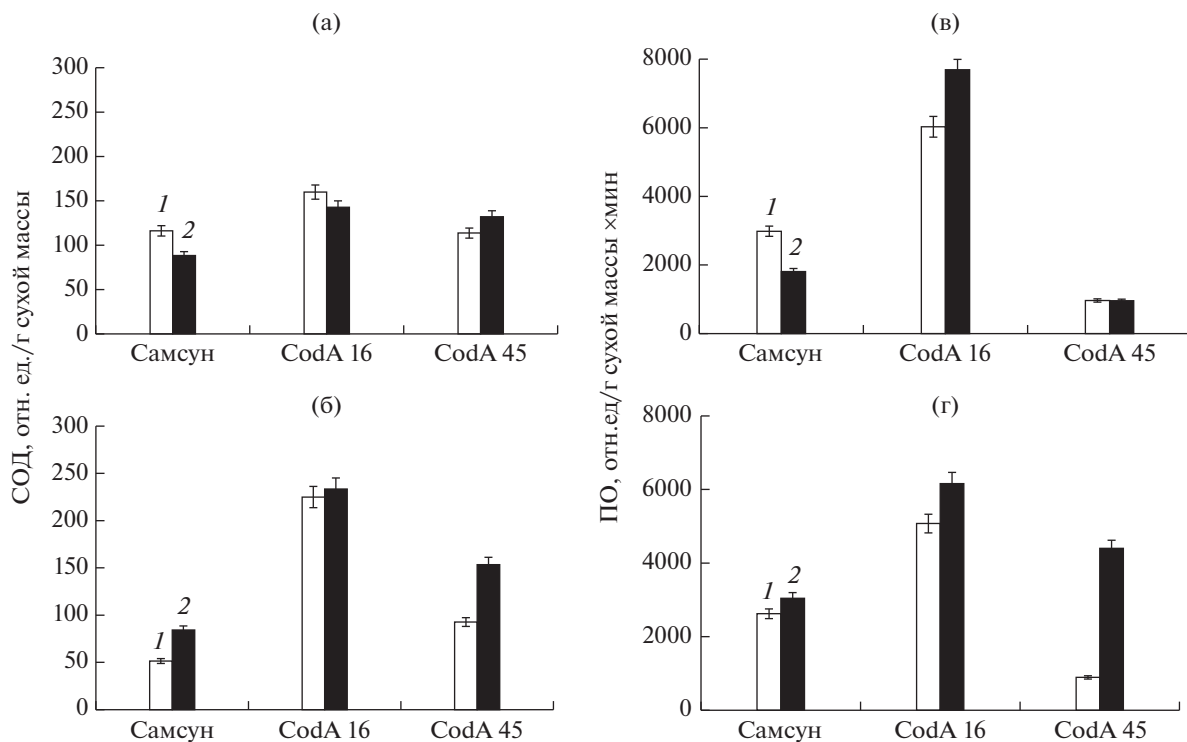


Рис. 4. Активность СОД (а, б, отн. ед./г сухой массы) и ПО (в, г, отн. ед./г сухой массы · мин) через 1 (а, в) и 24 ч (б, г) после обработки листьев табака пероксидом водорода: 1 – контроль, 2 – обработка 3 мМ Н₂О₂.

чивостью к действию пероксида водорода по сравнению с растениями исходного сорта, что выразилось в более значительном снижении пула фотосинтетических пигментов и накоплении продуктов ПОЛ, изменении активностей ПО и СОД после обработки агентом ОС. Различия в ответных реакциях на воздействие Н₂О₂ между линиями трансформантов были не менее существенными, чем различия между ними и исходным сортом. У растений линии Cod 16 активность ПО и содержание пролина повышались в ответ на действие агента ОС гораздо раньше (через 1 ч после обработки), чем у линии Cod 45, и имели более выраженный характер, тогда как изменений в активности СОД у данной линии не выявлено. У линии Cod 45 в ответ на индукцию ОС повышалось содержание пролина и происходило значительное увеличение активности как ПО, так и СОД, но только спустя 24 ч после обработки, и сопровождалось, в отличие от исходного сорта и линии Cod 16, существенным повышением (на 41%) содержания в листьях каротиноидов, выполняющих у растений, наряду с фотосинтетической функцией, функцию низкомолекулярных антиоксидантов.

Существенные различия между двумя линиями трансформантов, очевидно, связаны с местом встраивания транслоцируемого участка ДНК. Дифференциальная локализация трансгена в различных линиях табака, может объяснить разницу как в накоплении ГБ, так и в его участии в сиг-

нальных путях трансдукции [30] и активации некоторых связанных со стрессом генов [27].

Полученные результаты позволили сделать вывод о различном вкладе в ответную реакцию табака на действие агента ОС отдельных компонентов антиоксидантной системы (ферментов ПО и СОД) и низкомолекулярных протекторов (пролина и каротиноидов), в зависимости от генотипических особенностей растения, связанных с наличием и стабильностью экспрессии гетерологичного гена холиноксидазы и накоплением ГБ. Функциональное взаимодействие классических антиоксидантов и осмопротектора ГБ необходимо учитывать при повышении стрессоустойчивости растений путем генетической инженерии, а также при регуляции их роста физиологически активными соединениями.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 19-016-00207_а “Влияние измененного окислительного и осмотического статуса клеток на морфологические особенности надземной и подземной части растений и на преобразование микробиоты, ассоциированной с корневой системой”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. FAO World Resources Report 90. Land Resource Potential and Constraints at Regional and Country Levels. Rome, 2000. 122 p.
2. Bellard C., Bertelsmeier C., Leadley P., Thuiller W., Courchamp F. // Ecology Letters. 2012. V. 15. № 4. P. 365–377.

3. Kolupaev Yu.E., Karpets Yu.V., Kabashnikova L.F. // Appl. Biochem. Microbiol. 2019. V. 55. № 5. P. 441–459.
4. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В., Ястреб Т.О. // Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія: Біологія. 2017. № 3. С. 23–45.
5. Zhao X., Wei P., Liu Z., Yu B., Shi H. // Acta Physiologiae Plantarum. 2017. V. 39. P. 19.
6. Shahzad B., Fahad S., Tanveer M., Saud S., Khan I.A. Approaches for Enhancing Abiotic Stress Tolerance in Plants. / Ed. M. Hasanuzzaman, K. Nahar, M. Fujita, H. Oku, T. Islam Boca Raton: CRC Press, 2019. P. 61–77.
7. Sakamoto A., Murata N. // Plant Cell and Environment. 2002. V. 25. P. 163–171.
8. Tran N.H.T., Oguchi T., Matsunaga E., Kawaoka A., Watanabe K.N., Kikuchi A. // Plant Biotechnology. 2018. V. 35. № 3. P. 215–224.
9. You L., Song Q., Wu Y., Li S., Jiang C., Chang L., Zhang J. // Planta. 2019. V. 249. № 6. P. 1963–1975.
10. Zhang T., Li Z., Li D., Li C., Wei D., Li S., Yang X. // Plant Cell Reports. 2020. P. 1–14. doi.org/https://doi.org/10.1007/s00299-020-02581-5
11. Chen T.H.H., Murata N. // Plant Cell and Environment. 2011. V. 34. № 1. P. 1–20.
12. Вайнер А.А., Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О. // Вісник Харківського національного аграрного університету. Сер.: Біологія. 2013. № 2. С. 32–38.
13. Yastreb T.O., Kolupaev Y.E., Lugovaya A.A., Dmitriev A.P. // Appl. Biochem. Microbiol. 2017. V. 53. № 6. P. 719–724.
14. Gulevich A.A., Kurenina L.V., Baranova E.N. // Russian Agricultural Sciences. 2018. № 1. P. 7–12.
15. Murachige T., Skoog F.A. // Physiologia Plantarum. 1962. V. 15. № 3. P. 473–497.
16. Широких И.Г., Назарова Я.И., Огородникова С.Ю., Шуплецова О.Н., Блинова А.Л., Ралдугина Г.Н., Евсюков С.В., Баранова Е.Н. // Теоретическая и прикладная экология. 2020. № 2. С. 72–79.
17. Шлык А.А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев / Биохимические методы в физиологии растений. М.: Наука, 1971. С. 154–171.
18. Cromwell B.T., Rennie S.D. // Biochem J. 1954. V. 58. № 2. P. 322–326.
19. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище. Руководство Р 4.1.1672-03. М.: Минздрав РФ 2003. https://www.rosпотребнадзор.ru/upload/iblock/33e/r-4.1.1678_03.pdf
20. Лукаткин А.С., Голованова В.С. // Физиология растений. 1988. Т. 35. № 4. С. 773–780.
21. Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. // Plant and Soil. 1973. V. 39. P. 205–207.
22. Beauchamp C., Fridovich J. // Anal. Biochem. 1971. V. 44. № 1. P. 276–287.
23. Живетьев М.А., Граскова И.А., Войников В.К. // Журн. стресс-физиологии и биохимии. 2013. Т. 9. № 3. С. 326–332.
24. Giri J. // Plant Signaling and Behavior. 2011. V. 6. № 11. P. 1746–1751.
25. Einset J., Nielsen E., Connolly E. L., Bones A., Sparstad T., Winge P., Zhu J. K. // Physiol. Plant. 2007. V. 130. № 4. P. 511–518.
26. Park E.J., Jeknic Z., Chen T.H., Murata N. // Plant Biotechnol. J. 2007. V. 5. P. 422–430.
27. Kathuria H., Giri J., Nataraja K.N., Murata N., Udayakumar M., Tyagi A.K. // Plant Biotechnol. J. 2009. V. 7. P. 512–526.
28. Zhang T., Liang J., Wang M., Li D., Liu Y., Chen T. H., Yang X. // Plant Sci. 2019. V. 280. P. 355–366.
29. Лян К., Чжан С.Я., Ло И., Ван Г.П., Цзо Ц., Ван В. // Физиология растений. 2009. Т. 56. № 3. С. 410–417.
30. Subbarao G.V., Nam N.H., Chauhan Y.S., Johansen C. // J. Plant Physiol. 2000. V. 157. P. 651–659.

Reaction to the Action of Hydrogen Peroxide in Plants of *Nicotiana tabacum* Transformed by the Gene of Cholinoxidase (*codA*)

I. G. Shirokikh^{a, b, *}, S. Yu. Ogorodnikova^b, Ya. I. Nazarova^a, and O. N. Shupletsova^a

^aFederal Agricultural Research Center of the North-East named N.V. Rudnitsky, Kirov, 610007 Russia

^bInstitute of Biology of the Komi Science Centre of the Ural Branch of RAS, Syktyvkar, 167982 Russia

*e-mail: irgenal@mail.ru

Genetic engineering of glycine betaine (GB) synthesis offers a new approach to improving the productivity and stress resistance of cultivated plants. The possible effect of the bacterial heterologous sequence on the reaction of plants under oxidative stress (OS) induced by 3 mM hydrogen peroxide (H₂O₂) was determined. Independent transgenic tobacco lines (*Nicotiana tabacum* L.) Cod 16 and Cod 45 with the choline oxidase (*codA*) gene from *Arthrobacter gloiformis* responsible for GB synthesis were used. Transgenic lines differed from wild type plants with lower resistance to H₂O₂, which led to a more significant decrease in the pool of photosynthetic pigments, a greater intensity of lipid peroxidation, and dynamics of superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (PO) activity. In terms of OS manifestation, transgenic lines with initially similar values of GB accumulation (0.825–0.910 mmol/g) had significant differences among themselves. In the Cod 16 line, the reaction to OS induction was earlier (1 h after H₂O₂ treatment) and a more significant increase in PO activity and proline content than in the Cod 45 line and the original variety. In the Cod 45 line, there is a significant increase in SOD activity and proline content in response to OS induction 24 h after treatment, and, in contrast to the wild type plants and the Cod 16 line, it is accompanied by a significantly higher content of carotenoids in the leaves. When using genetic engineering methods to increase the productivity and resistance of plants to stress, it is necessary to take into account the functional interaction of antioxidants and osmoprotectors.

Keywords: oxidative stress, glycinbetain, malondialdehyde, proline, antioxidant enzymes, plastid pigment