

N.BENTHAMIANA ӨСІМДІГІНДЕ H₂O₂ ЖИНАҚТАЛУЫНА ВОЛЬФРАМ ЖӘНЕ МОЛИБДЕННІҢ ӘСЕРІ

Бейсекова М.К.^{1*}, Жангазин С.Б.¹, Курманбаева А.Б.¹, Масалимов Ж.К.¹, Акбасова А.Ж.¹

¹Л. Н. Гумилев атындағы Еуразиялық ұлттық университеті,
Сатпаева, 2 көшесі, Нұр-Сұлтан, 010000, Қазақстан
*mk.beisekova@gmail.com

АБСТРАКТ

Топырақта ауыр металлдардың концентрациясының жоғарылауы ауылшаруашылық дақылдарының өнімділігіне теріс әсер етеді. Топырақтың ауыр металлмен ластану проблемасы Қазақстандағы ауыл шаруашылығының дамуын шектейтін негізгі факторлардың бірі болып табылады. Топырақтың ауыр металлдармен ластануы өсімдіктердің өсуі мен дамуының нашарлауына, оттегінің белсенді түрлерінің пайда болуымен жүретін тотығу стрессіне алып келеді. Зерттеуді қажет ететін ауыр металдарға, молибден және вольфрам жатады. Өсімдіктерде вольфрам (W) негізінен молибдоферменттердің ингибиторы деп саналады, себебі ол молибденді (Mo) осы ферменттердің Мо-кофакторы үшін антагонизациялайды. Ал өтпелі элемент молибден (Mo) барлық биологиялық жүйелер үшін өте маңызды, өйткені ол жасушадағы маңызды реакцияларды катализдейтін ферменттерге қажет. Алайда, егер организм Мо тым көп мөлшерде қабылдаса, уыттылық белгілері байқалады. Вольфрам және молибден әсері кезінде өсімдікте оттегінің белсенді түрлері (ОБТ) шамадан тыс жинақталады. Зерттеу нысаны *N.benthamiana* өсімдігіне молибденмен әсер еткен кезде, бақылау өсімдігімен салыстырғанда H₂O₂ жинақталуы күрт төмендейді, ал вольфрам ерітіндісімен өңделген өсімдіктерде H₂O₂ жинақталуы 2 есе жоғарылайды. Молибден және вольфрамның біріккен ерітіндісімен өңделген өсімдіктерде H₂O₂ жинақталуы бақылау өсімдігімен салыстырғанда жоғары болды. Қызықты нәтиже вольфраммен әсер еткенде H₂O₂ жинақталуы молибденмен салыстырғанда 3,5 есе жоғарылағаны айқын көрінеді.

Кілт сөздер: абиотикалық стресс, молибден, вольфрам, ОБТ, H₂O₂, *N.benthamiana* өсімдігі.

КІРІСПЕ

Топырақта ауыр металлдардың концентрациясының жоғарылауы ауылшаруашылық дақылдарының өнімділігіне теріс әсер етеді. Көптеген ауыр металдар топырақта аз мөлшерде болады. Бірақ олардың мөлшері сырттан әкелінген ластаушы заттардың әсерінен белгілі бір деңгейден асқанда топырақ ластанып, ауыл шаруашылығы өнімдеріне зиян келтіреді. Топырақтың ауыр металлмен ластану проблемасы Қазақстандағы ауыл шаруашылығының дамуын шектейтін негізгі факторлардың бірі болып табылады. Топырақтың ауыр металлдармен ластануы өсімдіктердің өсуі мен дамуының нашарлауына, оттегінің белсенді түрлерінің пайда болуымен жүретін тотығу стрессіне алып келеді. Сондай-ақ топырақтағы ауыр металлдардың концентрациясының жоғарылауы өсімдіктердің морфологиясына кері әсер етеді. Сондықтан топырақтың құнарлылығын сақтаудың заманауи әдіснамаларын жасаудың маңызы зор. Зерттеуді қажет ететін ауыр металдарға, молибден және вольфрам жатады. Вольфрам (W) – сирек кездесетін ауыр металл, өзінің бірегей физикалық қасиеттеріне байланысты бірқатар өнеркәсіптік, әскери және тұрмыстық қолданбаларда кеңінен қолданылады [1]. Өсімдіктерде осы уақытқа дейін тиісті ақпарат негізінен молибдофермент (Мо-фермент) зерттеулеріне қатысты, мұнда W Мо-ферменттердің ингибиторы ретінде пайдаланылады. Дегенмен, соңғы зерттеулер көрсеткендей, W Мо-ферменттерге әсерінен басқа, өсімдіктерде өсуді тежейді және бағдарламаланған жасуша өлімін тудырады [2]. Демек, W-ның өсімдіктерге уыттылығын тек Мо-фермент тежегіші ретінде ғана емес, сонымен қатар одан әрі әсер ететін ауыр метал ретінде зерттеу керек.

Ал өтпелі элемент молибден (Mo) барлық биологиялық жүйелер үшін өте маңызды, өйткені ол жасуша-

дағы маңызды реакцияларды катализдейтін ферменттерге қажет. Биологиялық жағынан Мо микроэлементтер тобына жатады, яғни организм оны аз мөлшерде қажет етеді. Алайда, егер организм Мо тым көп мөлшерде қабылдаса, уыттылық белгілері байқалады. Екінші жағынан, Мо-ның болмауы организм үшін өлімге әкеледі. Өсімдіктердегі Мо мөлшері топырақтағы Мо биожетімділігіне тікелей байланысты. Топырақтың рН төмен болған сайын, Мо аз болады, осылайша өсімдіктерде Мо тапшылығын тудырады. Ал молибденнің топырақта жинақталуы плейотропты фенотиптер туындады [3].

Стресс факторларын жеңу үшін өсімдіктер әртүрлі қорғаныс стратегияларын жасады. Солардың бірі оттегі белсенді түрлері (ОБТ) сигналдық жолы көптеген физиологиялық процестерді, соның ішінде ауыр металдарға төзімділікті реттеуге қатысады. Тотығу стресі кезінде сутегі асқын тотығы (H₂O₂), синглет оттегі (¹O₂) және супероксид радикалы (O₂⁻) тез түзіледі [4]. Бұл молекулалар әдетте өсімдіктерде өте төмен концентрацияларда түзіледі, бірақ әртүрлі стресстер әсерінен ОБТ генерациясы айтарлықтай артады [5]. ОБТ ДНҚ-ның қайтымсыз зақымдалуын және жасушаның өлімін тудырып қана қоймайды, сонымен қатар өсімдіктердің қалыпты өсуін және стресске жауаптарды реттейтін маңызды сигналдық молекулалар ретінде қызмет етеді [4]. Қолайсыз жағдайларда өсімдіктер әртүрлі процестерді реттеуге қатысатын ОБТ түрлерінің үлкен санын тудырады, соның ішінде патогендік қорғаныс, бағдарламаланған жасуша өлімі процестері. Бұл реакциялар тіндер мен мүшелердің дамуына терең немесе қайтымсыз әсер етеді, көбінесе өсімдіктердің қалыпты өсуіне немесе өліміне әкеледі [6]. Шамадан тыс ОБТ жинақталуының уытты әсерінен өсімдіктер олардың зиянды әсерінен қорғау үшін ферментативті емес және

ферментативті жүйелерді дамытты [7].

Осы зерттеу жұмысының мақсаты ауыр металдардың *N.Benthamiana* өсімдігінің H_2O_2 жинақталуына әсерін анықтау. Біздің қорытындыларымыз өсімдіктерді молибден және вольфрам әсерінен вольфраммен әсер еткенде H_2O_2 жинақталуы молибденмен салыстырғанда 3,5 есе жоғарылағаны айқын көрінеді. Сонымен қатар, молибден және вольфрамның біріккен ерітіндісімен өңделген өсімдіктерде H_2O_2 жинақталуы бақылау өсімдігімен салыстырғанда жоғары болды. Ал, молибденмен әсер еткен кезде, бақылау өсімдігімен салыстырғанда H_2O_2 жинақталуы күрт төмендейді. Бұл зерттеудің нәтижелері ауыр металлға қарсы қорғаныс механизмінде ОБТ жинақталуы стресспен күресуде маңызды рөлін көрсетеді. Бұл өсімдіктің өнуін, өсуін және дамуын арттырады.

ЗЕРТТЕУ МАТЕРИАЛЫ МЕН ӘДІСТЕРІ

N.benthamiana өсімдіктерін зертханада өсіру

Бұл зерттеу жұмысында қолданылған *N.benthamiana* өсімдігі зертханалық жағдайда гүл табақшаларында топырақта өсірілді. Әр гүл табақшасы сәйкесінше металл ерітінділерінің белгілі бір концентрацияларында топырақта жасанды жарық жағдайында өсірілді. Алдымен *N. benthamiana* гүл табақшаларына дәндерді себіп 3 күн бойы қараңғыға қойылды, өскіндер пайда болған соң жарыққа қойылды. 10 күндік өскіндерді жеке-жеке гүл табақшаларына отырғызылды. *N.benthamiana* өскіндерін суару дистилденген судың бірдей мөлшерімен белгілі бір уақытта жүргізілді. Эксперимент үшін 30 күндік өсімдіктер қолданылды.

N.benthamiana өсімдігінің дамуы мен өсуіне оптималды жағдайларды жасау үшін зертханада 14 сағат «күн» және 10 сағат «түн» жарықтандыру периодтылығы бар 2700 және 6400 К спектрлі кезекті орнатылған шамдарды қолдану арқылы ұзақ жарық күн жағдайы жасалды. Өсімдіктер өсіру бөлмесінде тұрақты бөлме температурасы $25^{\circ}C$ және салыстырмалы ауа ылғалдылығы 75-80% сақталынды.

Зерттеу жүргізу үшін әр гүл табақшасындағы *N.benthamiana* өсімдігіне ауыр металдардың әсерін талдау жүргізу үшін тұздардың келесі концентрациялары алынды: 2.5 мМ Мо, 2.5 мМ W, 2.5 мМ Мо+W және 5 мМ Мо, 5 мМ W, 5 мМ Мо+W. Бақылау өсімдіктері ретінде тек дистилденген сумен өңделген өсімдік қолданылды. Зерттеу жұмыстарын жүргізу үшін өсімдіктер $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ және $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ ерітінділерімен 7 күн бойы 30 мл сәйкесінше концентрация ерітінділерімен суарылды.

H_2O_2 анықтауға сынамаларды дайындау

H_2O_2 анықтау үшін үлгілерді 50 мМ фосфат буфері (рН 7,5) 1:8 (салм/көлем) қатынасында алынды және 10000 айн-да екі рет 10 минуттан центрифугаланды. H_2O_2 анықтауға арналған реакция қоспасы мыналардан тұрды: 0,85 мМ 4-аминоантипирин, 3,4 мМ 3,5-дихлор-2-ги-дроксibenзол сульфонаты, 4,5 U/мл HRP 2 мл 50 мМ фосфат буфері (рН 7,5). Микропластиналдық планшете 5 минут және 10 минут бойы инкубацияланады. Абсорбция Kim32 (экрандау және қисық сызықпен сәйкестендіру) бағдарламалық құралы қолдайтын Biochrom Asys Expert 96 микропластиналдық спектрофотометрді қолдану арқылы 510

нм-де 5 минут және 10 минуттан соң үлгілер өлшенді [8]. Biochrom Asys Expert 96 - бұл стандартты 96 шұңқырлы жалпақ, дөңгелек және V-тәрізді планшеттердегі үлгілерді жылдам оқуға арналған заманауи дизайндағы көп арналы микропластиналдарды оқу құралы болып табылады.

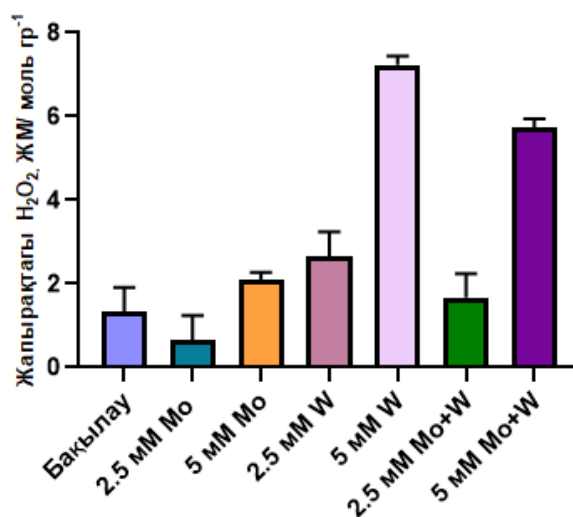
Статистикалық талдау

Әрбір өңдеу нұсқасы әр өсімдіктен алынған үлгілерінің үш нұсқаларында талданды. Статистикалық талдау Windows бағдарламалық пакетіне арналған StatPlus Professional 5.8.4.3 2009 нұсқасын (AnalystSoft Inc., www.analystsoft.com/ru/) пайдаланып дисперсияның бір факторлық талдауы (бір жақты ANOVA Tukey HSD Test) арқылы орындалды. Мәндер орташа $\pm SE$ ретінде көрсетілді. 0,05-тен төмен p мәндері статистикалық маңызды деп саналды. Дисперсиондық анализдің мақсаты – топтардың дисперсиясы көмегімен әр түрлі топтар арасындағы ерекшеліктердің маңызын тексеру болып табылады. Нөлдік гипотезаның растығында, топ ішілік өзгерістерге ие дисперсияны бағалау топ аралық дисперсияны бағалауға жақын болуы керек. Жалғандығында – әлдеқайда ұқсас болмауы тиіс.

ЗЕРТТЕУ НӘТИЖЕЛЕРІ

N.benthamiana өсімдігінде H_2O_2 жинақталуының көрсеткіші (мкмоль/млгр бастапқы/таза масса): бақылау өсімдігінде 1,3 мкмоль/млгр, 2,5 мМ Мо ерітіндісімен өңделген өсімдікте 0,6 мкмоль/млгр, 2,5 мМ W ерітіндісімен өңделген өсімдікте 2,6 мкмоль/млгр, 2,5 мМ Мо+W біріккен ерітінділерімен өңделген өсімдікте 1,8 мкмоль/млгр тең болды.

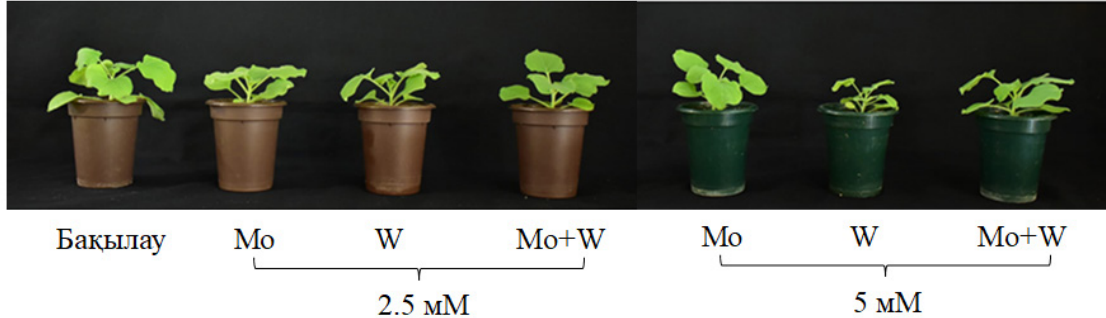
Келесі зерттеу 5 мМ концентрациялы металлдармен өңдеу әсерінің өсімдік жапырақтарында H_2O_2 жинақталуы анықталды. *N.benthamiana* өсімдігінде H_2O_2 жинақталуының көрсеткіші (мкмоль/млгр балғын/жаңа масса): бақылау өсімдігінде 3,3 мкмоль/млгр, 5 мМ Мо ерітіндісімен өңделген өсімдікте 2 мкмоль/млгр, 5 мМ W ерітіндісімен өңделген өсімдікте 7 мкмоль/млгр, 5 мМ Мо+W біріккен ерітінділерімен өңделген өсімдікте 5,5 мкмоль/млгр тең болды (1-ші суретте көрсетілген).



Сурет 1 – *N.benthamiana* өсімдігі жапырақтарында H_2O_2 жинақталуының диаграммасы

2.5 мМ Мо ерітіндісімен өңделген *N.benthamiana* өсімдігінде H_2O_2 жинақталуы 53%-ға төмендейді. Ал 2.5 мМ W ерітіндісімен өңделген өсімдікте H_2O_2 жинақталуы 100%-ға жоғарылайды. 2.5 мМ Мо+W біріккен ерітінділерімен өңделген өсімдікте 38%-ға жоғарылайды.

5 мМ Мо ерітіндісімен өңделген *N.benthamiana* өсімдігінде H_2O_2 жинақталуы 39%-ға төмендейді. Ал 5 мМ W ерітіндісімен өңделген өсімдікте H_2O_2 жинақталуы 112%-ға жоғарылайды. Сонымен қатар 5 мМ Мо+W біріккен ерітінділерімен өңделген өсімдікте 66%-ға жоғарылайды. *N.benthamiana* өсімдігіне 2.5 және 5 мМ концентрациялы молибден және вольфрам ерітінділерінің әсерінің көрінісі 2-ші суретте көрсетілген.



Сурет 2 – *N.benthamiana* өсімдігіне 2.5 және 5 мМ концентрациялы молибден және вольфрам ерітінділерінің әсерінің көрінісі

N.benthamiana Мо әсер еткен кезде, бақылау өсімдігімен салыстырғанда H_2O_2 жинақталуы күрт төмендейді, ал W ерітіндісімен өңделген өсімдіктерде H_2O_2 жинақталуы 2 есе жоғарылайды. Мо+W біріккен ерітіндісімен өңделген өсімдіктерде H_2O_2 жинақталуы бақылау өсімдігімен салыстырғанда жоғары болды.

ҚОРЫТЫНДЫ

N.benthamiana өсімдігіндегі H_2O_2 жинақталуы бақылаумен салыстырғанда Мо ерітіндісімен өңделген өсімдікте төмендеді, W ерітіндісімен өңделген өсімдікте H_2O_2 жинақталуы айтарлықтай жоғарылады, Мо+W біріккен ерітінділерімен өңделген өсімдікте H_2O_2 жинақталуы аздап жоғарылады. Қызықты нәтиже вольфраммен әсер еткенде H_2O_2 жинақталуы молибденмен салыстырғанда 3,5 есе жоғарылағаны айқын көрінеді. Мо ерітіндісімен өңделген *N.benthamiana* өсімдігінің H_2O_2 жинақталуы мүлдем төмендеді. Вольфрам өсімдік үшін стресс болып табылады, нәтижесінде ОБТ жинақталуын жоғарылатты. Осыған сәйкес ОБТ жинақталуы вольфрам әсерімен күресуде көмектеседі деп қорытынды жасауға болады. Бұл өсімдіктің өнуін, өсуін және дамуын арттырады.

Қаржыландыру

Ұсынылып отырған зерттеу жұмысы Қазақстан Республикасы Ғылым және жоғарғы білім министрлігі қаржыландыруымен ғылыми жоба аясында жүргізілген (AP09058098).

ӘДЕБИЕТТЕР

1. Коутсоспирос А., Брайда В. сосын т.б. Вольфрамға шолу: қоршаған ортаның күнгірттенуінен бақылау зерттеуіне дейін // Қауіпті материалдар журналы, 2006, т.

136, №1, б. 1–19.

2. Адамакис И.-Д.С., Пантерис Э., Элефтериу Э.П. Вольфрамның *Pisum sativum* L. тамыр жасушаларына өлімге әкелетін әсері: эндоплазмалық ретикулумның стресстен туындаған бағдарламаланған жасуша өлімінің көрсеткіштері // *Planta*, 2011, т. 234, №1, б. 21–34.

3. Ватанабэ С., Сато М сосын т.б. Арабидопсис молибден кофактор сульфуразасы АВА3 антоцианиннің жинақталуына және АВА-тәуелді және тәуелсіз жолдармен тотығу стрессіне төзімділікке ықпал етеді // Ғылыми есептер, Табиғат баспа тобы, 2018, т. 8, №1, б. 16592.

4. Миттлер Р. ОБТ жақсы // Өсімдіктер ғылымын-

дағы тенденциялар, 2017, т. 22, №1, б.11–19.

5. Ергалиев Т.М., Нурбекова Ж., сосын т.б. ОБТ өндіретін альдегидоксидазаның өсімдіктің томбус вирустық инфекциясына реакциясына қатысуы // Өсімдік физиологиясы және биохимиясы, 2016, т. 109, б. 36–44.

6. Каур Г., Астир Б. Пролин: өсімдіктің абиотикалық стресске төзімділігінің қатысушы негізгі ойыншысы // Өсімдіктер биологиясы, 2015, т. 59, №4, б. 609–619.

7. Ли Б.-Р., Ван Хиен Ла сосын т.б. H_2O_2 -жауапты гормоналды статус рапс жапырақтарындағы тотығу жарылу сигналын және пролин метаболизмін қамтиды // Антиоксиданттар (Базель), 2022, т. 11, № 3, б. 566.

8. Жанасова К., Курманбаева А. сосын т.б. Арпадағы аралас температура мен құрғақшылық стресстеріне жауап ретінде ОБТ статусы және антиоксиданттық ферменттердің белсенділігі // Өсімдіктер физиология ақтасы, 2021, т. 43, №114, б. 7.

REFERENCES

1. Koutsospyros, A., Braid, W. et al. A review of tungsten: From environmental obscurity to scrutiny // *Journal of Hazardous Materials*, 2006, vol. 136, no. 1, pp. 1–19.

2. Adamakis, I.-D.S., Panteris, E., Eleftheriou, E.P. The fatal effect of tungsten on *Pisum sativum* L. root cells: indications for endoplasmic reticulum stress-induced programmed cell death // *Planta*, 2011, vol. 234, no. 1, pp. 21–34.

3. Watanabe, S., Sato, M et al. Arabidopsis molybdenum cofactor sulfurase ABA3 contributes to anthocyanin accumulation and oxidative stress tolerance in ABA-dependent and independent ways: 1 // *Scientific Reports*, Nature Publishing Group, 2018, vol. 8, no. 1, pp.

16592.

4. Mittler, R. ROS Are Good // Trends in Plant Science, 2017, vol. 22, no. 1, pp. 11–19.

5. Yergaliyev, T.M., Nurbekova, Zh. et al. The involvement of ROS producing aldehyde oxidase in plant response to Tombusvirus infection // Plant Physiology and Biochemistry, 2016, vol. 109, pp. 36–44.

6. Kaur, G., Asthir, B. Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance // Biol Plant, 2015, vol. 59, no. 4, pp. 609–619.

7. Lee, B.-R., Van Hien, La et al. H₂O₂ -Responsive Hormonal Status Involves Oxidative Burst Signaling and Proline Metabolism in Rapeseed Leaves // Antioxidants (Basel), 2022, vol. 11, no. 3, pp. 566.

8. Zhanassova, K., Kurmanbayeva, A. et al. ROS status and antioxidant enzyme activities in response to combined temperature and drought stresses in barley // Acta Physiol Plant, 2021, vol. 43, no. 114, pp. 7.

ВЛИЯНИЕ ВОЛЬФРАМА И МОЛИБДЕНА НА НАКОПЛЕНИЕ H_2O_2 В РАСТЕНИИ
N.BENTHAMIANA

Бейсекова М.К.^{1*}, Жангазин С.Б.¹, Курманбаева А.Б.¹, Масалимов Ж.К.¹, Акбасова А.Ж.¹

¹Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, ул. Сатпаева, 2, Нур-Султан, 010000, Казахстан
*mk.beisekova@gmail.com

АБСТРАКТ

Проблема загрязнения почв тяжелыми металлами является одним из основных факторов, сдерживающих развитие сельского хозяйства Казахстана. Загрязнение почв тяжелыми металлами, в особенности вольфрамом, приводит к ухудшению роста и развития растений, образованию активных радикалов кислорода, окислительному стрессу. В растениях вольфрам (W) выступает в качестве ингибитора молибдоферментов, замещая молибден (Mo) в структуре Мо-кофактора. В то же время сам Mo при высоких концентрациях также негативно влияет на клетки растения. При воздействии вольфрама и молибдена в растении избыточно накапливаются активные формы кислорода (АФК). При воздействии молибдена на испытываемое растение *N. benthamiana* накопление H_2O_2 резко снижается по сравнению с контрольным растением, а у растений, обработанных раствором вольфрама, накопление H_2O_2 увеличивается в 2 раза. Накопление H_2O_2 у растений, обработанных комбинированным раствором молибдена и вольфрама, было выше по сравнению с контрольным растением. Интересным результатом является увеличение накопления H_2O_2 в 3,5 раза при воздействии вольфрама по сравнению с молибденом.

Ключевые слова: абиотический стресс, молибден, вольфрам, АФК, H_2O_2 , растение *N. benthamiana*.

INFLUENCE OF TUNGSTEN AND MOLYBDENUM ON H_2O_2 ACCUMULATION IN *N.BENTHAMIANA*
PLANT

Beisekova M.K.^{1*}, Zhangazin S.B.¹, Kurmanbayeva A.B.¹, Masalimov Zh.K.¹, Akbassova A.Zh.¹

¹L.N. Gumilyov Eurasian National University, 2, Satpayev str., Nur-Sultan, 010000, Kazakhstan
*mk.beisekova@gmail.com

ABSTRACT

The problem of soil pollution with heavy metals is one of the main factors hindering the development of agriculture in Kazakhstan. Soil pollution with heavy metals, especially tungsten, leads to a deterioration in plant growth and development, the formation of active oxygen radicals, and oxidative stress. In plants, tungsten (W) acts as an inhibitor of molybdoenzymes, replacing molybdenum (Mo) in the Mo-cofactor structure. At the same time, Mo itself at high concentrations also negatively affects plant cells. When exposed to tungsten and molybdenum, reactive oxygen species (ROS) accumulate excessively in the plant. When the test plant *N. benthamiana* is exposed to molybdenum, the accumulation of H_2O_2 is sharply reduced compared to the control plant, and in plants treated with a solution of tungsten, the accumulation of H_2O_2 is increased by 2 times. The accumulation of H_2O_2 in plants treated with a combined solution of molybdenum and tungsten was higher compared to the control plant. An interesting result is an increase in the accumulation of H_2O_2 by 3.5 times when exposed to tungsten compared to molybdenum.

Keywords: abiotic stress, molybdenum, tungsten, ROS, H_2O_2 , *N. benthamiana*