
ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН

УДК 581.143.577

DOI 10.31654/2786-8478-2025-BN-1-22-32

Зайцева І. О.

доктор біологічних наук, професор
старший викладач кафедри фізіології та інтродукції рослин
Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара
Irinza.ldfr@gmail.com
orsid.org/0000-0001-5789-7240

Броннікова Л. І.

аспірант кафедри фізіології та інтродукції рослин
Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара
Молодший науковий співробітник
Інститут фізіології рослин і генетики НАН України
Zlenko_lora@ukr.net
orsid.org/0000-0002-8103-0548

АКТИВНІСТЬ НІТРАТРЕДУКТАЗИ У W- ТА V-СТІЙКИХ КЛІТИННИХ ВАРІАНТІВ ТЮТЮНУ

Нітрати в рослинах відновлюються за участю ферменту нітратредуктази (НР). Методом клітинної селекції із застосуванням летальних доз вольфрамату та ванадату, що пригнічують активність НР, отримано стійкі клітинні варіанти тютюну. Ванадій та вольфрам стійкі клітинні варіанти тютюну культивували на селективних середовищах, що містять токсичні концентрації альтернативних оксианіонів та визначено активність НР в калюсній культурі. В результаті селекції відібрані клони, які володіли комплексною стійкістю до вольфрамату та ванадату. Активність НР проявляється за умов дії ванадату і вольфрамату. Також, розвиток рослин за стресових умов забезпечується не лише за рахунок особливості функціонування НР але підтримується всіма ланками засвоєння азоту. Вперше отримано W- та V-стійких клітинних ліній тютюну, які характеризувались підвищеним рівнем активності нітратредуктази при культивуванні за нормальних умов та активністю цього ферменту у присутності летальних доз аніонів-інгібіторів, що впливало на баланс клітинного нітратного пулу. В ході серій пророблених експериментів отримані стійкі до іонів важких металів клітинні варіанти тютюну, які постійно піддавали дії/змінам різноманітних летальних стресів. Вказані варіанти не просто витримували стресове навантаження але активно пристосовувались до конкретних умов життєдіяльності.

Вперше отримано стійкі до оксианіонів WO_4^{2-} і VO_3^- клітинні лінії тютюну, які активно розвивались в умовах довготривалого летального стресу та при довільному варіюванні стресових чинників. Розвиток статистичної системи (клітинної лінії) відбувалась за рахунок життєдіяльності окремих її структурних одиниць (клітин). Стійкість культур підтримувалась на кожній стадії клітинного циклу, в результаті чого здійснювалось його повне проходження.

Вперше встановлено, що генетичні зміни W- та V-стійких клітинних ліній забезпечували їхній ріст у присутності аніонів ClO_3^- , що може вказувати на загальні зміни азотного транспорту та метаболізму.

Із W- та V-стійких клітинних ліній тютюну вперше отримано рослини, які характеризувались підвищеним рівнем активності нітратредуктази при культивуванні за нормальних умов та активністю цього ферменту у присутності летальних доз аніонів-інгібіторів, що змінювало баланс клітинного нітратного пулу. Вперше висунуто припущення про можливість експериментального отримання ферменту нового типу.

Комплексна стійкість до аніонів-інгібіторів нітратредуктази проявлялась у стабільній редукції нітратів за будь-яких стресових умов та паралельній адаптації до конкретного стресового чинника. Такі особливості можуть свідчити на користь існування двох механізмів стійкості: системного та стрес-індукованого.

*Ключові слова: нітрити, нітрати, активність нітратредуктази (НРА), стійкі варіанти, *Nicotiana tabacum* L, вольфрам, ванадій, *in vitro*, стійкість.*

Вступ. Серед форм азоту, який рослини споживають із ґрунту, нітратна форма є домінуючою. На шляху перетворень азоту ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_4^+ \rightarrow \text{амінокислоти}$) першу реакцію редукції нітрату до нітриту здійснює нітратредуктаза (НР) (КФ 1.6.6.1) [1, 2, 10]. Цю реакцію вважають етапом, що регулює та лімітує процес асиміляції окислювального азоту, адже швидкість перетворення нітрату на нітрит на порядок нижча за швидкість утворення амонію з нітриту. Ця особливість запобігає накопиченню токсичних іонів NO_2^- , а також робить її більш залежною від впливів різних чинників. Виходячи з цього, багато дослідників приділяють особливу увагу вивченню особливостей і регуляції нітратредуктазної активності, зокрема вивченню залежності між НРА і господарсько-важливими показниками рослин, такими як урожайність, накопичення білка, вміст нітратів, стійкість до несприятливих чинників середовища. Хоча даних із цих питань накопичено чимало, однак не всі вони однозначні, а часто і суперечливі. Тому визначення особливостей НРА треба продовжувати з урахуванням сучасних поглядів на регуляцію метаболічних процесів у рослинах [4, 5, 6, 16].

Катіони важких металів викликають в клітинах широкий спектр різноманітних реакцій-відповідей. Тому пластичність метаболізму стійкої клітинної лінії (СКЛ), адаптованого до дії конкретного стресора, є очікуваною подією. В той же час відомі іони важких металів (ІВМ), які, окрім загальної токсичної дії, мають визначену “мішень” впливу. До цієї категорії відносять вольфрамат- (WO_4^{2-}) і ванадат-аніони (VO_3^-) – відомі як інгібітори ферменту нітратредуктази. В той же час механізм репресуючої дії цих іонів суттєво різний [2, 12, 17]. Спираючись на дані друків, а також на здобуте, була запропонована гіпотеза про можливість одержання клітинних ліній рослин із зміненим типом редукції та засвоєння нітратів із застосуванням аніонів WO_4^{2-} та VO_3^- [14, 17, 18, 19].

Метою роботи було створення модельної системи *in vitro*, яка одночасно містила летальні концентрації зазначених аніонів і виключно нітратну форму азоту.

Матеріали та організація досліджень. Рослини тютюну культивували *in vitro* на середовищі Мурасіге – Скуга [2]. Укорінені рослини відмивали від агару і вміщували у водну культуру на 7 діб. Поживний розчин містив нітрат калію (єдине джерело азоту) та решту мікроелементів відповідно до складу середовища Мурасіге – Скуга. Після стабілізації метаболізму рослини ділили на три групи і переносили в експериментальні умови на 5 діб. Контрольні умови створювали поновленням поживного розчину, стресові – додаванням ванадату чи вольфрамату (1 мМ) [3].

Активність НР визначали в листках рослин. Для цього свіжу тканину гомогенізували у середовищі рідкого азоту в 0,05М натрій – фосфатному буфері (рН 7,0) і центрифугували при 20 000 об/хв. Упродовж 20 хв (клітинний екстракт). Співвідношення буфер : зразок становило 3 : 1. В ортиманій рідині визначали НРА. Реакційна суміш містила 100 мМ натрій – фосфатний буфер (рН 7,0), 10мМ NaNO₃, 0,7мМ метилвіологен, дослідний препарат (0,01 – 0,10 мл). Реакцію починали з додавання дитіоніту, проводили її при 70°C; зупиняли додаванням 500 мкл розчину 0,6% - ної сульфанілової кислоти у 20 % - ій соляній кислоті та 500 мкл 2 мМ розчину N-1-нафтилетилендіаміну. Через 15 хв, які необхідні для розвитку забарвлення, визначали поглинання за 548 нм. Контролем слугували проби (100 мкл), які кип'ятили й інкубували впродовж 30 хв в умовах, аналогічних дослідним. Отримані дані оброблено статистично.

Результати досліджень та їх обговорення. Стійкі клітинні лінії, отримані в результаті клітинної селекції, розвивались за стресових умов. Система *in vitro* вирізняється низкою особливостей, які можуть істотно ускладнювати аналіз активності НР [3, 9, 10, 13].

Застосовуючи вказану вище селективну систему, були отримані W-СКЛ і V-СКЛ тютюну. Доказом стійкості одержаних варіантів, як і випадку катіонів важких металів, було визначення відносного приросту біомаси при культивуванні за стресових умов. В таблиці 1 наведено показники Δm для W-СКЛ тютюну.

Таблиця 1

Відносний приріст біомаси (Δm) W-СКЛ тютюну при культивуванні на середовищі з вольфрамат-аніонами

Клітинна лінія	Δm	
	Середовище В5* Гамборга	Середовище В5* Гамборга + 1W
W-СКЛ №3	4,21 ± 0,45	2,12 ± 0,42
W-СКЛ №17	5,44 ± 0,87	1,98 ± 0,09
W-СКЛ №4	6,00 ± 1,00	2,81 ± 0,63
W-СКЛ №2	6,50 ± 1,95	2,26 ± 0,26
Контроль	7,18 ± 1,38	Ріст відсутній

При цьому слід нагадати, що середовище В5* Гамборга завжди містило лише нітратну форму азоту. W-СКЛ та V-СКЛ тютюну отримано вперше. СКЛ піддавали комплексному тестуванню впродовж всього культивування. В усіх експериментах застосовували іони-інгібітори НР.

Хоча W-СКЛ та V-СКЛ тютюну відзначались однаковим рівнем стійкості до вольфрамату, візуально їхні калюси суттєво відрізнялись. Так, калюсна маса W-СКЛ тютюну мала типовий (однорідний) вигляд, аналогічний калюсу дикого типу. В той же час калюс W-СКЛ тютюну складався з окремих дрібних округлих кластерів. Слід, однак, зазначити, що така морфологічна особливість калюсу W-СКЛ тютюну відзначалась виключно у присутності WO₄²⁻. При зміні культуральних умов феномен зникав. Ознака стійкості відібраних ліній не втрачалась із збільшенням строку культивування. В таблиці 2 наведено показники відносного приросту біомаси W-СКЛ тютюну 3, 5, 7 пасажів. (4 і 6 пасажі клітини культивували за нормальних умов. Тривалість пасажу 30-35 днів).

Таблиця 2

Відносний приріст біомаси (Δm) W-СКЛ тютюну різного строку культивування на середовищі з вольфрамат-аніонами

Клітинна лінія	Δm			
	3-й пасаж		5-й пасаж	7-й пасаж
	Середовище B5*Гамборга	Середовище B5*+1W	Середовище B5*+1W	Середовище B5*+1W
W-СКЛ №13	1,63 ± 0,36	0,44 ± 0,11	1,17 ± 0,42	0,99 ± 0,13
W-СКЛ №5	1,66 ± 0,08	0,58 ± 0,21	1,03 ± 0,28	1,20 ± 0,20
W-СКЛ №1	2,36 ± 0,68	0,87 ± 0,14	0,95 ± 0,18	1,13 ± 0,19
W-СКЛ №4	2,93 ± 0,42	0,63 ± 0,17	0,68 ± 0,14	0,69 ± 0,24
Контроль	3,68 ± 0,36	Ріст відсутній	Ріст відсутній	Ріст відсутній

Спостерігалися характерні генотипові особливості, властиві W-СКЛ тютюну при культивуванні норма/стрес. Збільшення показника відносного приросту біомаси на вищих пасажах (відносно 3-го) для W-СКЛ №5 і №13, на нашу думку, не можна вважати результатом адаптації, оскільки клони були переміщені з нормальних умов. З другого боку, не варто відносити цей факт і на рахунок збільшення рівня стійкості. Швидше за все ця різниця знаходиться у межах норми реакції. Працездатність запропонованого підходу підтвердилась при створенні селективної системи з ванадат-аніонами. Отримано V- СКЛ тютюну.

Стійкі до аніонів-інгібіторів клітинні лінії рослин відзначались стабільним ростом за стресових умов, не залежно від того, з якого середовища (контрольного чи селективного) вони були перенесені. За таких правил вирощування були виділені окремі клони, які зберігали життєдіяльність за умов дії двократно летальної дози стресового чинника. Таблиця 3 (а, б) ілюструє показники відносного приросту біомаси V-СКЛ (а) і W-СКЛ (б) тютюну, котрі відзначались підвищеним (відносно вихідної концентрації селекції) рівнем стійкості до стресору.

Таблиця 3

Відносний приріст біомаси (Δm) V-СКЛ (а) W-СКЛ (б) тютюну, культивованих на селективних середовищах

а.

Клітинна лінія	Δm	
	Середовище B5* + 1V	Середовище B5* + 2V
V-СКЛ №4	2,31 ± 0,42	0,68 ± 0,18
V-СКЛ №12	2,47 ± 0,14	1,69 ± 0,76
V-СКЛ №31	3,08 ± 0,67	1,46 ± 0,28
V-СКЛ №5	4,00 ± 1,92	2,55 ± 0,39

б.

Клітинна лінія	Δm	
	Середовище B5* + 1W	Середовище B5* + 2W
W-СКЛ №3	1,50 ± 0,25	1,75 ± 0,33
W-СКЛ №1	2,54 ± 1,18	1,13 ± 0,20
W-СКЛ №2	2,37 ± 0,65	3,10 ± 1,05

В той же час спостерігались особливості росту, пов'язані із типом селективного середовища, на якому здійснювався первинний відбір. У V-СКЛ тютюну (а), які культивували у присутності 2мМ ванадат-аніону, темп росту уповільнювався. З огляду на те, що 2мМ ванадат-аніону є дворазово летальною дозою стресового чинника, можна вважати останню граничною концентрацією

У W-СКЛ тютюну (б) темп росту не залежав від концентрації стресового чинника. Ми не можемо віднести цей феномен на рахунок адаптації культури, оскільки умови культивування постійно змінювались.

Тобто, очевидна подія реагування на особливості впливу кожного селективного фактору. Для перевірки такого припущення стійкі лінії культивували на селективних середовищах з аніонами-інгібіторами, які додавали окремо, а також сумісно. В таблиці 4 наведено дані відносного приросту біомаси V-СКЛ та W-СКЛ сої та тютюну, культивованих за таких умов.

При вирощуванні клітинних варіантів в присутності одного аніона-інгібітора застосована летальна його доза; у випадку B5* Гамборга + V/W + LD₅₀ для кожного.

Таблиця 4

Відносний приріст біомаси (Δm) V-СКЛ та W-СКЛ і тютюну, культивованих на селективних середовищах з аніонами-інгібіторами нітратредуктази

СКЛ, Культура	Δm		
	Середовище B5* Гамборга + 1V	Середовище B5* Гамборга + 1W	Середовище B5* Гамборга + V+W
Тютюн; W-СКЛ №3	2,98 ± 0,13	3,75 ± 0,48	1,75 ± 0,17
Тютюн; V-СКЛ №1	1,95 ± 0,18	0,93 ± 0,35	0,54 ± 0,11
Тютюн; V-СКЛ №31	1,57 ± 0,27	0,67 ± 0,24	0,39 ± 0,11

Менший показник Δm у клітинних культур, які росли на селективному середовищі B5* Гамборга + V+W, можна пояснити різним механізмом токсичної дії аніонів V(V) і W(VI), а звідси одночасною реалізацією незалежних механізмів засвоєння нітратів. Це може бути додатковим свідченням на користь комплексної стійкості відібраних екземплярів. Комплексна стійкість відібраних клітинних ліній сої та тютюну є об'єктивною властивістю варіантів, незважаючи на різний темп розвитку клітин, залежний від умов культивування. Дана властивість проявляється у формі пластичної адаптації до середовища.

Як зрозуміло з таблиці 4, відносний приріст біомаси СКЛ залежав від середовища культивування. З огляду на це вважали показовим оцінити забезпеченість клітин нітратами, оскільки останні, як вказувалось вище, активують НР.

У таблиці 5 наведено показники загального нітратного пулу у W-СКЛ тютюну при культивуванні в присутності різних аніонів-інгібіторів НР (в % до контрольних значень).

Таблиця 5

**Вміст нітратів (%) в калюсі W-СКЛ тютюну
при культивуванні за різних умов**

Тютюн; Клітинна лінія	NO ₃ ⁻ (в % до контролю)		
	Середовище B5*	B5*+1W	B5*+1V
W-СКЛ №3	100,00	125,30 ± 13,68	200,00 ± 10,32
W-СКЛ №5	100,00	200,21 ± 5,15	253,07 ± 9,74

Дані таблиці свідчать про його зростання в калюсних клітинах СКЛ тютюну, культивованих за стресових умов. При цьому видно, що вміст нітратів в клітинах, які росли на селективному середовищі з ванадат-аніонами, суттєво вищий, хоча обидві СКЛ тютюну не припиняли росту за будь-яких стресових умов.

В нашому випадку високий загальний нітратний пул вказує на доступність екзогенного нітрату. Додатковим свідченням на користь цього припущення є культивування СКЛ на фоні дії хлорату калію (KClO₃). Якщо порівняти показник Δm , виміряний для СКЛ тютюну, культивованих на двох середовищах із хлоратом калію та різними формами азоту, видно значну різницю. У однієї лінії (W-СКЛ тютюну №3) на середовищі, яке містило KClO₃+NH₄⁺, відносний приріст біомаси калюсу значно переважав цей показник, виміряний у культури, що росла за умов KClO₃+NO₃⁻ (Рис. 1).

В той же час у W-СКЛ тютюну №5 відносний приріст біомаси калюсу у присутності іонів амонію ненабагато перевищував Δm , виміряний за умов дії нітратів. В той же час з діаграми видно, що рівень засвоєння нітратів у W-СКЛ тютюну №5 вищий ніж у СКЛ №3.

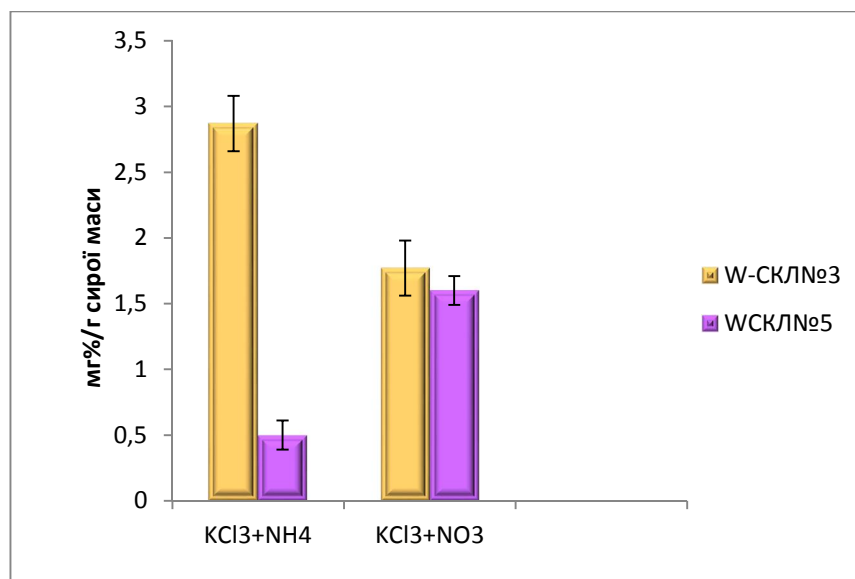


Рис. 1. Відносний приріст біомаси калюсу W-СКЛ тютюну, культивованих на середовищах з хлоратом калію та різними формами

Цей феномен, на нашу думку, можливо пояснити наступним чином. Перший варіант: імовірно в присутності аміачної форми азоту метаболізм цього елементу обмежувався кінцевою ланкою переамінування, синтезу амінокислот та білків. Відбувалось швидке збільшення біомаси. Каталітична активність НР спрямовувалась лише на редукцію хлоратів. Далі мав здійснюватись ланцюг реакцій детоксикації різноманітних сполук хлору. Є факти, що хлорит перетворюється на диоксид хлору, а в

подальшому в хлорид [7, 8, 15, 19]. Хоча ці перетворення не можна вважати однозначними (незворотними), оскільки лише 43% хлориту відновлюється до хлориду. Решта 57% знову окислюється до небажаного хлорату, тому що додатковим продуктом реакції є кисень. Такий перебіг подій, на нашу думку, мав би суттєво негативно впливати на весь клітинний гомеостаз.

Процес засвоєння нітратів W-СКП та V-СКП здійснювався по всіх ділянках ланцюга: переніс, акумуляція, редукція. Отже, збереження функціональності метаболізму (активний обмін) є ключовим показником який забезпечує резистентність. Стійкість клітинних культур до токсичних аніонів здійснювалась через реалізацію при первинній селекції, незалежна від типу стресового чинника та відіграє ключову роль, обумовлює системну стійкість клітини, що спрямована на обслуговування реакції азотного обміну.

Таким чином, спостерігається аналогія між стійкістю клітинних культур як для катіонів так і для аніонів важких металів. Отже, за допомогою IBM можна отримувати клітинні культури із крос-стійкістю до широкого спектру стресорів.

Клітинні культури завжди представляють собою гетерогенні популяції. Такі системи є найбільш потенційно витривалими при раптовій зміні умов культивування. В нашому випадку клітинна система постійно вирощується на фоні кардинальних змін стресових чинників. В той же час вона проходить всі стадії, властиві культурі *in vitro*. При цьому всі складові системи (окремі клітини) функціонують однотипно, про що свідчить стабільний відносний приріст біомаси за будь-яких умов. Починаючи із фази стаціонарного росту і далі пропорційно старінню культури вичерпання ресурсів створює додаткове стресове навантаження.

Висновки. 1. Вперше отримано стійкі до оксіаніонів WO_4^{2-} і VO_3^- клітинні лінії тютюну, які активно розвивались в умовах довготривалого летального стресу та при довільному варіюванні стресових чинників. Розвиток статистичної системи (клітинної лінії) відбувалась за рахунок життєдіяльності окремих її структурних одиниць (клітин). Стійкість культур підтримувалась на кожній стадії клітинного циклу, в результаті чого здійснювалось його повне проходження.

2. Вперше виділені стійкі клітинні лінії тютюну, здатні розвиватись в присутності летальних концентрацій аніонів WO_4^{2-} і VO_3^- – чинників, котрі інактивують нітратредуктазу – перший фермент ланцюга засвоєння нітратів у відомих мікроорганізмів, рослин, а також клітинних культур дикого типу. Варіанти відзначались універсальною стійкістю до вольфрамат- і ванадат-аніонів.

3. Вперше встановлено, що генетичні зміни W- та V-стійких клітинних ліній забезпечували їхній ріст у присутності аніонів ClO_3^- , що може вказувати на загальні зміни азотного транспорту та метаболізму.

4. Комплексна стійкість до аніонів-інгібіторів нітратредуктази проявлялась у стабільній редукції нітратів за будь-яких стресових умов та паралельній адаптації до конкретного стресового чинника. Такі особливості можуть свідчити на користь існування двох механізмів стійкості: системного та стрес-індукованого.

5. Клітинна селекція із застосуванням летальних доз іонів важких металів – напрямок виділення нових генетично змінених форм рослин, які не були виявлені до цього часу.

6. Вперше встановлено, що генетичні зміни W- та V-стійких клітинних ліній забезпечували їхній ріст у присутності аніонів ClO_3^- , що може вказувати на загальні зміни азотного транспорту та метаболізму.

Література

1. Колісник А.В., Мусієнко М.М. Особливості нітратредуктазної активності у вищих рослинах. Фізіологія та біохімія культурних рослин. 2009. Т.41.№1, С.16 – 27
2. Сергеева Л.С. Активність нітратредуктази у біотехнологічних рослин тютюну за дії інгібіторів ферментів. Фізіологія рослин і генетика. 2017. Т.49. №2, С.2, С.129 – 133
3. Murasige T., Scoog F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 1962.15. №13, P.473 – 497
4. Klimenko S.V., Peshkova A.A., Dorofeev, N.V. Nitrate reductase activity during heat shock in winter wheat. *J.stress physiol.biochem.* 2006. 2(1), P.50-55
5. Rajasekhar V.K., Oelmuller R. Regulation of induction of nitrate reductase and nitrite reductase in higher plants. *Physiological plant.* 1987. 71(4), 517 – 521
6. Barbosa M.P., Do Bonfim P.A.A., Da Silva K.D., Souza M.O., DeAouza Soares P.P., Sa M.C., Cairo P.A. Nitrate reductase activity in *Eucalyptus urophylla* and *Khauza senegalensis* seedlings: optimization of the *in vivo* Assay. *Journal of Ecological engineering.* 2022. 23(2), 204-211 <https://doi.org/10.12911/22998993>
7. Hao L., Wang X., Shi J., Li L., Hao X. Vanadium (V) bio-detoxification based on washing water of vise as microbial and carbon sourus. *Front. Environ Sci.* 2023. 11 <https://doi.org/fenvs.2023.1096845>
8. Chen L., Liu J – R., Hu W – F., Gao J., Yan L – Y. Vanadium in soil plant system: sourse, fate, toxicity and bioremediation. *Journal of hazardous materials.* 2021. 405(5), 124200. <https://doi.org/10.1016/j.hazamat.2020.124200>
9. Tejada – Jimenez M., Llamas A., Galván A., Fernández E. Role of Nitrate reductase in NO production in photosintetic Eukaryotes. *Journals Plants.* 2019. 8(3), 56 <https://doi.org/10.3390/plants8030056>
10. Koyama L.A., Terai M., Tokuchi N. Nitrate reductase actives in plants from different ecological and taxonomic groups grown in Japan. *Ecological Research.* 2020. 35(5), 708 – 712 <https://doi.org/10.1111/1440-1703.12083>
11. Inomata Y., Kubota H., Hata S., Kiyuna E., Toyao T., Morita K., Yoshida K., Sakaguchi N., Ueda W., Haruta M., Murayama T. Bulk tungsten – substituted vanadium oxide for low – temperature NOx removal in the presence of water. *Nature communication.* 2021. 12(557) <https://doi.org/10.1038/s4167-020-20867-w>
12. Kaufoldt D., Baillie C-K., Meinen R., Mendel R.R., Hänsch R. The molybdenum cofactor biosynthesis Network: *in vitro* protein – protein interaction of an actin associated multi – protein complex. *Front. Plant Sci.* 2017. 8 <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01946>
13. Joo Y.K., Hak S.S. *In vitro* nitrate reduktase activity assay from *Arabidopsis* crude extracts. *Bio Protoc.* 2018. 8(7), 2785 <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2785>
14. Hames – Fajerska E., Wiszniewska A., Kamińska I. Adual role of vanadium in environmental systems – beneficial and detrimental effect on terrestrial plants and humans. *Plants.* 2021. 10(6), 1110 <https://doi.org/10.3390/plants10061110>
15. Chen Z – H., Wang Y., Wang J – W., Babla M., Zhao C., Garcia – Mata C., Sani E., Differ C., Mak M., Hills A., Amtmann A., Blatt M.R. Nitrate reductase mutation alters potassium nutrition as wel as nitric oxide – mediated control of guard cell ion channel in *Arabidopsis*. *New Phytologist.* 2015. 209(4), P.1456 – 1469. <https://doi.org/10.1111/nph.137114>
16. Berger A., Boscarì A., Araújo N.H., Maucourt M., Hanchi M., Bernillon S., Rolin D., Puppo A., Brouquisse R. Plant nitrate reductases regulate nitric oxide production and nitrogen – fixing metabolism during the *Medicago truncatula* – *Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *Frontiers in Plant Science.* 2020. 11, 1313 <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01313>
17. Sergeeva L.E., Mykhalska S.I. Cell selection with heavy metal ion for obtaining salt tolerant plant cell cultures. *Fiziology plants and genetics.* 2019. 51(4), 315 – 323 <https://doi.org/10.150407/fr2019.04.315>
18. Adamadis I. – D.S., Panteris E., Eleftheniou P. Tungsten toxicity in plants. *Plants.* 2012. 1(2), 82 – 99.

19. Sing V., Ahmed G., Vedika S., Kumar P., Chaturvedi S.K., Rai S.N., Vamanu E., Kumar A. Toxic heavy metal ions contamination in water and their sustainable reduction by ecofriendly methods: isotherms, thermodynamics and kinetics study. *Scientific Reports*. 2024. 14, 7595 <https://doi.org/10.1038/s41598-024-58061-3>

References

1. Kolisnik, A.V., Musienko, M.M. (2009). Osoblivosti nitratreduktazniyi aktivnosti u vischih roslinach. *Fiziologiya ta biohimiya kulturnih roslin*. [Kolisnyk A.V., Misienko M.M. Features of nitrate reductase activity in higher plants. *Physiology and biochemistry of cultivated plants*. 2009. 41(1), C.16 – 27 [in Ukrainian]
2. Sergeeva, L.E. (2017). Aktivnist nitratreduktazy u biotekhnologichnih roslin tyutyunu za dii inhibitoryv fermentiv. *Fiziologiya roslin i genetika*. [Sergeyeva L.E. Nitrate reductase activity in biotechnological tobacco plants under the influence of enzyme inhibitors. *Plant Physiology and Genetics*. 49(2), C.2, C.129 – 133 [in Ukrainian].
3. Murasige, T., Scoog, F.A. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*. 15. №13, P.473 – 497
4. Klimenko, S.V., Peshkova, A.A., Dorofeev, N.V. (2006). Nitrate reductase activity during heat shock in winter wheat. *J.stress physiol.biochem*. 2(1), P.50-55
5. Rajasekhar, V.K., Oelmuller, R. (1987). Regulation of induction of nitrate reductase and nitrite reductase in higher plants. *Physiological plant*. 71(4), 517 – 521
6. Barbosa, M.P., Do Bonfim, P.A.A., Da Silva, K.D., Souza, M.O., DeAouza Soares, P.P., Sa, M.C., Cairo, P.A. (2022). Nitrate reductase activity in *Eucalyptus urophylla* and *Khauza senegalensis* seedlings: optimization of the *in vivo* Assay. *Journal of Ecological engineering*. 23(2), 204-211 <https://doi.org/10.12911/22998993>
7. Hao, L., Wang, X., Shi, J., Li, L., Hao, X. (2023). Vanadium (V) bio-detoxification based on washing water of vine as microbial and carbon sources. *Front. Environ Sci*. 11 <https://doi.org/10.3389/fenvs.2023.1096845>
8. Chen, L., Liu, J – R., Hu, W – F., Gao, J., Yan, L – Y. (2021). Vanadium in soil plant system: source, fate, toxicity and bioremediation. *Journal of hazardous materials*. 405(5), 124200. <https://doi.org/10.1016/j.hazamat.2020.124200>
9. Tejada – Jimenez, M., Llamas, A., Galván, A., Fernández, E. (2019). Role of Nitrate reductase in NO production in photosintetic Eukaryotes. *Journals Plants*. 8(3), 56 <https://doi.org/10.3390/plants8030056>
10. Koyama, L.A., Terai, M., Tokuchi, N. (2020). Nitrate reductase activities in plants from different ecological and taxonomic groups grown in Japan. *Ecological Research*. 35(5), 708 – 712 <https://doi.org/10.1111/1440-1703.12083>
11. Inomata, Y., Kubota, H., Hata, S., Kiyuna, E., Toyao, T., Morita, K., Yoshida, K., Sakaguchi, N., Ueda, W., Haruta, M., Murayama, T. (2021). Bulk tungsten – substituted vanadium oxide for low – temperature NOx removal in the presence of water. *Nature communication*. 12(557) <https://doi.org/10.1038/s4167-020-20867-w>
12. Kaufoldt, D., Baillie, C-K., Meinen, R., Mendel, R.R., Hänsch, R. (2017). The molybdenum cofactor biosynthesis Network: *in vitro* protein – protein interaction of an actin associated multi – protein complex. *Front. Plant Sci*. 8 <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01946>
13. Joo, Y.K., Hak, S.S. (2018). *In vitro* nitrate reductase activity assay from *Arabidopsis* crude extracts. *Bio Protoc*. 8(7), 2785 <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2785>
14. Hames – Fajerska, E., Wiszniewska, A., Kamińska, I. (2021). Actual role of vanadium in environmental systems – beneficial and detrimental effect on terrestrial plants and humans. *Plants*. 10(6), 1110 <https://doi.org/10.3390/plants10061110>
15. Chen, Z – H., Wang, Y., Wang, J – W., Babla, M., Zhao, C., Garcia – Mata, C., Sani, E., Differ, C., Mak, M., Hills, A., Amtmann, A., Blatt, M.R. (2015). Nitrate reductase mutation alters potassium nutrition as well as nitric oxide – mediated control of guard cell ion channel in *Arabidopsis*. *New Phytologist*. 209(4), P.1456 – 1469. <https://doi.org/10.1111/nph.137114>

16. Berger, A., Boscari, A., Araújo, N.H., Maucourt, M., Hanchi, M., Bernillon, S., Rolin, D., Puppo, A., Brouquisse, R. (2020). Plant nitrate reductases regulate nitric oxide production and nitrogen – fixing metabolism during the *Medicago truncatula* – *Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *Frontiers in Plant Science*. 11, 1313 <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01313>
 17. Sergeeva, L.E., Mykhalska, S.I. (2019). Cell selection with heavy metal ion for obtaining salt tolerant plant cell cultures. *Fiziology plants and genetics*. 51(4), 315 – 323 <https://doi.org/10.150407/fr2019.04.315>
 18. Adamadis, I. – D.S., Panteris, E., Eleftheniou P. (2012). Tungsten toxicity in plants. *Plants*. 1(2), 82 – 99.
 19. Sing, V., Ahmed, G., Vedika, S., Kumar, P., Chaturvedi, S.K., Rai, S.N., Vamanu, E., Kumar, A. (2024). Toxic heavy metal ions contamination in water and their sustainable reduction by ecofriendly methods: isotherms, thermodynamics and kinetics study. *Scientific Reports*. 14, 7595 <https://doi.org/10.1038/s41598-024-58061-3>
-

Zaitseva I.

Doctor of Biological Sciences, Professor
Senior Lecturer at the Department of Plant Physiology and Introduction
Oles Honchar Dnipro National University
Irinza.ldfr@gmail.com
orcid.org/0000-0001-5789-7240

Bronnikova L.

Postgraduate student of the Department of Plant Physiology and Introduction
Oles Honchar Dnipro National University
Junior Researcher
Institute of Plant Physiology and Genetics of the National Academy
of Sciences of Ukraine
Zlenko_lora@ukr.net
orcid.org/0000-0002-8103-0548

NITRATE REDUCTASE ACTIVITY IN W- AND V-RESISTANT TOBACCO CELLULAR VARIANTS

Nitrates in plants are reduced by the enzyme nitrate reductase (NR). Resistant tobacco cellular variants were obtained by cellular selection using lethal doses of tungstate and vanadate, which inhibit the activity of NR. Vanadium- and tungsten-resistant tobacco cellular variants were cultured on selective media containing toxic concentrations of alternative oxyanions and the activity of NR in callus culture was determined. As a result of the selection, clones with complex resistance to tungstate and vanadate were selected. NR activity is manifested under the influence of vanadate and tungstate. Also, plant development under stressful conditions is ensured not only by the peculiarity of NR functioning but is supported by all the links of nitrogen assimilation. For the first time, W- and V-resistant tobacco cell lines were obtained, characterised by an increased level of nitrate reductase activity when grown under normal conditions and the activity of this enzyme in the presence of lethal doses of inhibitor anions, which affected the balance of the cellular nitrate pool. In the course of a series of experiments, we obtained cellular variants of tobacco resistant to heavy metal ions, which were constantly exposed to various lethal stresses. These variants not only withstood the stress load, but also actively adapted to specific conditions of life. For the first time, oxyanion-resistant WO_4^{2-} and VO_3^- cell lines of tobacco were obtained, which actively developed under conditions of long-term lethal stress and under arbitrary

variation of stress factors. The development of the statistical system (cell line) was driven by the vital activity of its individual structural units (cells). The stability of the cultures was maintained at each stage of the cell cycle, resulting in its complete passage.

For the first time, it was found that genetic changes in W- and V-resistant cell lines ensured their growth in the presence of ClO_3^- anions, which may indicate general changes in nitrogen transport and metabolism.

Plants characterised by an increased level of nitrate reductase activity under normal conditions and the activity of this enzyme in the presence of lethal doses of inhibitory anions, which changed the balance of the cellular nitrate pool, were obtained from W- and V-resistant tobacco cell lines for the first time. For the first time, it was suggested that a new type of enzyme could be experimentally produced.

The complex resistance to nitrate reductase anion inhibitors was manifested in the stable reduction of nitrate under any stressful conditions and parallel adaptation to a specific stress factor. These features may indicate the existence of two resistance mechanisms: systemic and stress-induced.

*Key words: nitrites, nitrates, nitrate reductase activity (NRA), resistant variants, *Nicotiana tabacum* L., tungsten, vanadium, in vitro, resistance.*

**Стаття до редакції надійшла 05.02.2025 року
Рецензія на статтю надійшла 21.02.2025 року**