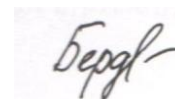


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО  
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ»

*На правах рукописи*

Бердникова Ольга Сергеевна



ВОЗДЕЙСТВИЕ ГИПОКСИИ И СРЕДЫ ВЫСОКИХ  
КОНЦЕНТРАЦИЙ CO<sub>2</sub> НА ОБРАЗОВАНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ  
КИСЛОРОДА В КЛЕТКАХ РАЗЛИЧНЫХ ПО УСТОЙЧИВОСТИ  
РАСТЕНИЙ

Специальность 03.01.04 – Биохимия

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук,  
профессор Ершова А.Н.

Воронеж 2016

## СОДЕРЖАНИЕ

Список используемых сокращений.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
ГЛАВА 1. АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА И АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ.....	12
1.1. Механизмы образования различных типов АФК.....	12
1.2. Липоксигеназы и их роль в образовании АФК в растениях.....	16
1.3. Роль различных клеточных компартментов в процессах образования активных форм кислорода .....	18
1.3.1. Митохондрии растений и их роль, как поставщиков АФК.....	18
1.3.2. Роль хлоропластов и пероксисом в образовании АФК.....	21
1.4. Биологическая роль активных радикалов в растениях.....	22
1.5. Антиоксидантная система защиты растений.....	24
1.5.1. Неферментативные антиоксиданты.....	24
1.5.2. Ферментативная антиоксидантная система.....	26
ГЛАВА 2. ГИПОКСИЧЕСКИЙ СТРЕСС И ОБРАЗОВАНИЕ АФК В РАСТЕНИЯХ.....	30
2.1. Гипоксия и ее роль в процессах жизнедеятельности растений.....	30
2.2. Адаптация растений к дефициту кислорода.....	32
2.2.1. Анатомо-морфологические механизмы адаптации растений к гипоксии.....	32
2.2.2. Метаболические механизмы адаптации растений к гипоксии.....	33
2.3. Образование АФК и активность ферментов в растениях в условиях гипоксии.....	36
2.4. Углекислый газ как составной компонент газовой среды, его влияние на метаболические процессы растений.....	39
ГЛАВА 3. ФИТОГОРМОНЫ И ИХ РОЛЬ В УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К ГИПОКСИИ.....	41

3.1. Фитогормоны и их физиологические функции в растениях.....	41
3.2. Фитогормоны в устойчивости растений к гипоксическому стрессу .....	43
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	45
ГЛАВА 4. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	45
4.1. Объекты исследования.....	45
4.2. Методы исследования.....	45
4.2.1. Условия постановки опытов.....	45
4.2.2. Интенсивность свободнорадикального окисления в растениях.....	46
4.2.3. Определение продукции супероксидного анион-радикала....	46
4.2.4. Исследование образования гидропероксида.....	47
4.2.5. Содержание пероксида водорода.....	48
4.2.6. Определение активности липоксигеназы.....	49
4.2.7. Исследование активности антиоксидантных ферментов.....	49
4.2.7.1. Определение активности супероксиддисмутазы.....	49
4.2.7.2. Выделение каталазы, общей пероксидазы и аскорбатпероксидазы.....	50
4.2.7.3. Исследование активности каталазы.....	50
4.2.7.4. Определение активности общей пероксидазы.....	51
4.2.7.5. Определение активности аскорбатпероксидазы.....	51
4.2.8. Выделение клеточных фракций.....	51
4.2.9. Определение активности маркерного фермента сукцинатдегидрогеназы.....	51
4.2.10. Определение содержания хлорофилла в клеточных фракциях.....	52
4.2.11. Электрофоретическое определение присутствия липоксигеназы в клеточных компартментах.....	52
4.2.12. Определение количества белка .....	53
4.2.13. Статистическая обработка результатов.....	53

ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ РАЗНЫХ ГАЗОВЫХ СРЕД НА ПРОЦЕССЫ ОБРАЗОВАНИЯ АФК В РАСТЕНИЯХ.....	54
5.1. Исследование скорости свободнорадикального окисления в тканях растений в условиях гипоксии и CO <sub>2</sub> — среды.....	54
5.2. Влияние гипоксии и CO <sub>2</sub> — среды на образование различных типов АФК в клетках растений.....	58
5.3. Влияние гипоксии и CO <sub>2</sub> — среды на активность липоксигеназы в растениях.....	65
ГЛАВА 6. АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ ГИПОКСИИ И CO <sub>2</sub> – СРЕДЫ НА РАСТЕНИЯ.....	70
6.1. Изучение активности СОД у растений в условиях различных газовых сред .....	70
6.2. Влияние газовых сред на активность антиоксидантных ферментов (каталаза, аскорбатпероксидаза, общая пероксидаза).....	73
ГЛАВА 7. ВЛИЯНИЕ ФИТОГОРМОНОВ НА ОБРАЗОВАНИЕ АФК В РАСТЕНИЯХ В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ И CO <sub>2</sub> -СРЕДЫ.....	79
7.1. Влияние фитогормонов кинетина и эпибрассинолида на процессы свободнорадикального окисления в растениях.....	79
7.2. Влияние фитогормонов на образование различных типов АФК в растениях.....	85
ГЛАВА 8. ПРОЦЕССЫ ОБРАЗОВАНИЯ АФК И АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ В КЛЕТОЧНЫХ ОРГАНЕЛЛАХ РАЗЛИЧНЫХ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ КРАТКОВРЕМЕННОЙ ГИПОКСИИ И CO <sub>2</sub> – СРЕДЫ.....	91
8.1. Влияние гипоксии и CO <sub>2</sub> - среды на образование АФК в митохондриях растений .....	91
8.2. Липоксигеназа и ее роль в образовании АФК в митохондриях растений в условиях гипоксии и CO <sub>2</sub> – среды.....	98
8.3. Активность митохондриальной СОД у растений в условиях гипоксии и среды CO <sub>2</sub> .....	104
8.4. Образование АФК в хлоропластах растений при действии	

гипоксии и CO <sub>2</sub> – среды .....	106
8.5. Действие гипоксии и CO <sub>2</sub> – среды на хлоропластную липоксигеназу в растениях.....	110
8.6. Влияние гипоксии и среды CO <sub>2</sub> на активность хлоропластной СОД у разных растений.....	115
8.7. Процесс образования АФК в цитоплазматической фракции клеток растений в условиях гипоксии и CO <sub>2</sub> - среды .....	117
8.8. Активность липоксигеназы в цитоплазме растений в условиях гипоксии и CO <sub>2</sub> - среды.....	121
8.9. Действие гипоксии и CO <sub>2</sub> - среды на активность цитоплазматической СОД у растений.....	126
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	128
ВЫВОДЫ.....	132
ЛИТЕРАТУРА.....	134
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	162

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АОС – антиоксидантная система

АПО - аскорбатпероксидаза

АФК – активные формы кислорода

КАТ – каталаза

МДА – малоновый диальдегид

ОП – общая пероксидаза

ПОЛ – перекисное окисление липидов

СОД – супероксиддисмутаза

СРО – свободнорадикальное окисление

СДГ – сукцинатдегидрогеназа

ФМС – феназинметасульфат

ЭБ – эпибрассинолид

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность проблемы.** Растения на разных этапах развития подвергаются воздействию различных неблагоприятных факторов внешней среды. Одним из стрессоров, оказывающих влияние на развитие растений, является дефицит кислорода (гипоксия), вызванный избыточным переувлажнением или затоплением почв [155]. Недостаток кислорода может вызывать серьезные метаболические изменения в клетках растений, поэтому изучение механизмов адаптации растений к гипоксии имеет важное научное и практическое значение [206]. В условиях дефицита кислорода в клетках растений усиливаются процессы перекисного окисления липидов [35, 215]. Повышение интенсивности пероксидации липидов может быть также следствием активации у растений процессов свободнорадикального окисления, связанных с образованием различных активных форм кислорода (АФК) [54].

Процессы образования АФК, являющихся продуктами неполного восстановления молекулярного кислорода до воды, исследуются в различных организмах на протяжении длительного времени [67]. Один из механизмов образования АФК может быть связан с работой ферментов, включая и липоксигеназу [28, 105]. Поставщиком АФК в клетках растений могут являться и митохондрии, однако механизмы их накопления в данных клеточных компартментах при гипоксическом стрессе практически не изучены. Накопление АФК может быть одним из ранних клеточных ответов растений на действие стрессовых факторов [96], включая и гипоксию [39]. Однако остаются дискуссионными многие вопросы, связанные с образованием АФК, ускорением процессов свободнорадикального окисления, изменением активности ферментов в растениях при действии гипоксического стресса. Образование АФК [140] и процессы пероксидации липидов [112] могут протекать в условиях гипо- и аноксии, но значительно возрастают при возвращении растений на воздух (условия реаэрации).

В тоже время, в других исследованиях [187] отмечено усиление процессов перекисного окисления липидов в условиях даже кратковременной (до суток) аноксии. Показано, что высокие концентрации диоксида углерода были способны усиливать все эффекты гипоксии на обменные процессы растений [36, 39, 47].

**Цель и задачи исследования.** Целью работы являлось исследование влияния условий кратковременной гипоксии и среды высоких концентраций диоксида углерода на образование активных форм кислорода и активность антиоксидантной системы в клетках различных по устойчивости растений.

В связи с поставленной целью решались следующие задачи:

1. выявить влияние гипоксии на скорость свободнорадикального окисления и продукцию различных типов АФК (супероксидного анион-радикала, гидропероксида и пероксида водорода) у растений;
2. исследовать действие фитогормонов кинетина и эпибрассинолида на процессы образования АФК в растениях в условиях разных газовых сред;
3. изучить активность антиоксидантных ферментов, таких как супероксиддисмутаза, каталаза, аскорбатпероксидаза и общая пероксидаза в растениях в разные периоды действия газовых сред;
4. выяснить роль липоксигеназы в процессах накопления отдельных типов АФК в клетках растений в условиях гипоксического стресса;
5. изучить скорость образования АФК в митохондриях различных растений при действии кратковременной гипоксии;
6. определить активность ферментов липоксигеназы и супероксиддисмутазы в отдельных клеточных компартментах растений при действии гипоксии и  $\text{CO}_2$  – среды.

**Научная новизна.** Впервые проведено исследование продукции различных типов АФК в клетках растений, различающихся по устойчивости к условиям кратковременной (3-24 часа) гипоксии и среды высоких концентраций  $\text{CO}_2$ . Исследована активность ферментов антиоксидантной системы, таких как супероксиддисмутаза, каталаза, общей пероксидазы,



аскорбатпероксидазы. Отмечено, что активность данных антиоксидантных ферментов была значительно выше у более устойчивых растений, чем у неустойчивых. Показано, что обработка растений фитогормонами кинетином и эпибрассинолидом снижали интенсивность процессов свободнорадикального окисления и продукцию АФК в растениях при действии гипоксического стресса. Впервые методом электрофореза в проростках сои обнаружено присутствие митохондриальной липоксигеназы, отличавшейся от хлоропластной и цитоплазматической форм по величине Rf. Установлено наличие прямой корреляции между степенью устойчивости растений к гипоксии, скоростью свободнорадикальных процессов, продукцией АФК и активностью антиоксидантных ферментов.

Отмечено, что высокие концентрации CO<sub>2</sub> значительно усиливали как накопление разных типов АФК, так и повышение активность антиоксидантных ферментов и липоксигеназы, в отличие от обычной гипоксии. Полученные данные подтверждают представление о том, что диоксид углерода можно отнести к группе сигнальных молекул, способных включать системы адаптации растений к условиям гипоксического стресса.

**Практическая значимость.** Оработаны методики по исследованию содержания различных типов АФК в тканях и отдельных клеточных компартментах растений с использованием методов биохимилюминесценции и спектрофотометрии. Используемые методики по изучению активности антиоксидантных ферментов могут применяться при оценке степени устойчивости растений к стрессовым факторам, включая и дефицит кислорода. Выявлена способность фитогормонов кинетина и эпибрассинолида тормозить интенсивность свободнорадикальных процессов и образование АФК в клетках растений, что позволяет рекомендовать их для использования в практике растениеводства с целью повышения устойчивости растений к действию гипоксического стресса. Результаты работы могут использоваться в учебном процессе в разных ВУЗах. Материалы исследований применяются при проведении занятий по дисциплинам

«Молекулярные основы адаптации растений к стрессам», «Гормональная система растений и ее роль в адаптации к стрессам», «Современные достижения молекулярной биологии» в Воронежском государственном педагогическом университете на отделении «Биология» для бакалавров и магистров. Кроме того, они используются при выполнении выпускных квалификационных работ и магистерских диссертаций.

**Положения, выносимые на защиту.**

1. При действии гипоксического стресса у неустойчивых проростков гороха, в отличие от сои и кукурузы, повышается интенсивность процессов свободнорадикального окисления и генерации АФК, что сопровождается снижением активности антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы, аскорбатпероксидазы и общей пероксидазы).
2. Фитогормоны кинетин и эпибрассинолид снижают интенсивность свободнорадикального окисления и образование АФК в растениях в условия гипоксии и среды высоких концентраций диоксида углерода.
3. В митохондриях растений гороха и сои обнаружено присутствие молекулярной формы липоксигеназы, отличающейся по электрофоретической подвижности от цитоплазматической и хлоропластной форм. Липоксигеназа митохондрий вносит существенный вклад в процессы накопления АФК в клетках растений в первые часы действия гипоксического стресса.
4. В различных клеточных компартментах (митохондриях, хлоропластах и цитоплазме) растений в условиях дефицита кислорода происходит изменение как содержания АФК, так и активности антиоксидантного фермента СОД, что определяется степенью устойчивости растений к гипоксии.

**Апробация работы.** Материалы диссертации докладывались и обсуждались на международной научной конференции «Проблемы

биоэкологии и пути их решения» (Саранск, 2008), XII съезде русского ботанического общества (Петрозаводск, 2008), на 13, 15-17-ой Пущинской школах конференциях молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2009, 2011-2013), на всероссийской научной конференции «Устойчивость организмов к неблагоприятным факторам внешней среды» (Иркутск, 2009), на III, IV всероссийских конгрессах «Симбиоз – Россия» (Нижний Новгород, 2010; Воронеж, 2011), на всероссийском симпозиуме «Растение и стресс» (Москва, 2010), на VII, VIII Съездах Общества физиологов растений России (Нижний Новгород, 2011; Петрозаводск, 2015), на всероссийской научной конференции «Факторы устойчивости растений в экстремальных природных условиях и техногенной среде» (Иркутск, 2013), на 18, 19, 20 конгрессах FESPВ (Spain, 2010; Germani, 2012; Ireland, 2014).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 24 работы, из которых 3 – в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК.

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы (264 источника) и приложения. Работа изложена на 170 страницах, включает 22 рисунка и 13 таблиц. В приложении содержатся 8 таблиц.

Работа выполнялась в рамках аналитической ведомственной целевой программы Министерства образования и науки РФ «Развитие научного потенциала высшей школы» (2009-2011), а также госзадания Министерства образования и науки РФ (2012-2013), регистрационный номер 4.4698.2011.

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### ГЛАВА 1. АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА И АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

#### 1.1. Механизмы образования различных типов АФК

Кислород является важным компонентом газовой среды, необходимым для дыхания большинства живых организмов [67]. В основном состоянии молекулярный кислород является относительно стабильным, не способным спонтанно реагировать с другими соединениями, что определяется его структурой [140].

В аэробных организмах многие процессы проходят с участием кислорода. Так, в дыхательной цепи митохондрий происходит полное четырехэлектронное восстановление кислорода до воды. Однако возможен процесс его неполного одно-, двух- или трехэлектронного восстановления с образованием различных активных форм кислорода (АФК), что представляет опасность для организмов [21].

Известно, что при отсутствии экстремальных факторов концентрация АФК должна сохраняться на постоянном и достаточно низком уровне, и они при этом вовлекаются в нормальный метаболизм клеток [67]. К АФК относятся свободные радикалы, такие как супероксидный  $O_2^{\cdot-}$ , гидроксильный  $OH^{\cdot}$ , гидропероксидный радикалы  $HO_2^{\cdot}$ , и нейтральные молекулы – пероксид водорода  $H_2O_2$ , синглетный кислород  $^1O_2$ , озон  $O_3$ .

В растительных клетках существует несколько механизмов образования различных типов АФК: ферментативный механизм, связанный с неполным восстановлением молекулярного кислорода, и ферментативный механизм, обусловленный повышением активности ряда ферментов – липоксигеназ, пероксидаз, ди- и полиаминоксидаз, оксалатоксидаз [125, 167, 170, 201].

При одноэлектронном восстановлении молекулярного кислорода образуется супероксидный анион-радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ), опасный для мембран клеток (рис. 1).

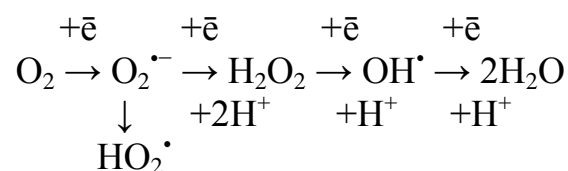


Рис. 1. Процесс образования активных форм кислорода [59].

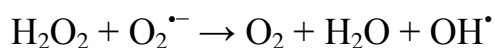
Супероксидный анион-радикал, окруженный молекулами воды, не способен свободно перемещаться через клеточные мембраны, что отличает его от кислорода [19, 25]. Супероксидный анион-радикал индицирует процессы перекисного окисления липидов [130]. Он имеет довольно большое время жизни ( $10^{-6}$  с) и становится источником других типов АФК [60]. Супероксидный анион-радикал может взаимодействовать с ненасыщенными жирными кислотами (линолевой, линоленовой, арахидоновой) с образованием нейтральных радикалов липидов.

Наиболее сильным окислителем, по сравнению с супероксидным анион-радикалом, является гидропероксидный радикал ( $\text{HO}_2^{\bullet}$ ). Он возникает при протонировании  $\text{O}_2^{\bullet-}$  в условиях кислой среды или в результате соединения различных органических радикалов с пероксидом водорода. Гидропероксидный радикал легко проходит через биологические мембраны и свободно диффундирует между всеми компартментами клетки, реагируя с различными аминокислотами, например триптофаном, гистидином, и с полиненасыщенными жирными кислотами [108].

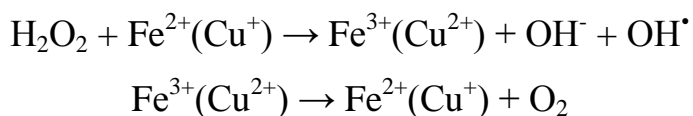
Наиболее же стабильным типом АФК является пероксид водорода, время жизни которого составляет около 1 мс. Он образуется при двухэлектронном восстановлении молекулы кислорода или в результате дисмутации супероксидного радикала. Процесс дисмутации супероксидного анион-радикала происходит чаще всего при участии супероксиддисмутазы или спонтанно [59]. Пероксид водорода может быть и продуктом пероксисомальных реакций фотодыхания [164]. Он хорошо растворим в билипидном слое, и, вследствие этого, способен свободно перемещаться через клеточные мембраны [226].

Последующее восстановление пероксида водорода может привести к образованию гидроксильного радикала  $\text{OH}^\bullet$ , который является наиболее реакционноспособным из всех типов АФК. В отличие от пероксида водорода, гидроксильный радикал, быстро взаимодействуя с различными биомолекулами, свободно не переходит через мембраны клеток. Время жизни данного радикала составляет  $10^{-9}$  с. Гидроксильный радикал, оказывая влияние на SH-группы, гистидиновые и другие аминокислотные остатки белков, вызывает их денатурацию и инактивирует ферменты. Данный радикал может вызывать повреждение и нуклеиновых кислот, разрушая связи между нуклеотидами, что приводит к разрывам молекул ДНК и РНК. Гидроксильный радикал, встраиваясь в билипидный мембранный слой, вызывает процесс пероксидации, который также способствует разрушению клеточных структур [81]. Образование гидроксильных радикалов в клетках происходит в результате нескольких реакций:

1. Реакция Хабера-Вейсса (при физиологических условиях в растениях протекает медленно):



2. Реакция Фентона – цикл реакций, включающий окисление ионов различных металлов, например железа или меди, имеющих переменную валентность:



В тоже время, образование  $\text{OH}^\bullet$  возможно и при взаимодействии  $\text{H}_2\text{O}_2$  с ферридоксином, убихиноном, в процессе радиолиза воды [135].

К представителям АФК принадлежит и синглетный кислород, процессы образования которого связаны с реакциями фотосинтеза. Синглетный кислород является одним из реакционноактивных типов АФК,

вызывает окисление белков, углеводов, липидов, фенолов, реагируя по двойной связи с образованием различных гидроперекисей [59, 67].

Образование АФК может быть связано не только с электроно-транспортными цепями хлоропластов и митохондрий, но и с работой целого ряда ферментов. Одним из таких ферментов, участвующих в образовании АФК, является НАДФН-оксидаза [24, 193]. Данный фермент локализован в основном в плазматической мембране клеток, катализирует образование супероксидного анион-радикала [210, 248, 253]. При его блокировании ингибируется процесс формирования различных типов АФК [240]. При этом показано, что индуктором экспрессии НАДФН-оксидазы может выступать пероксид водорода [76, 134]. Данный механизм активации фермента может быть связан с действием патогенов на растения, что вызывало возрастание содержания пероксида водорода и приводило к активации НАДФН-оксидазы [59]. Отмечено [24] повышение активности НАДФН-оксидазы под влиянием различных как биотических, так и абиотических факторов, связанных с потоками  $Ca^{2+}$ , активными формами кислорода, азота и передачей информации на ядерный геном.

В образовании АФК может участвовать и фермент пероксидаза, локализованный в цитозоле и отдельных структурах клетки [59]. Отмечено, что пероксидазы, окисляя различные соединения (салициловую кислоту, моноамины и хитоолигосахариды) в присутствии пероксида водорода, образуют при этом радикалы, взаимодействие которых с кислородом приводит к образованию супероксида [194]. При работе пероксидаз, а также ди-, полиаминоксидаз и оксалатоксидаз возможно накопление в клетках пероксида водорода [170].

В образовании супероксидного анион-радикала при определенных условиях может участвовать фермент ксантиноксидаза, обнаруженный в апопласте и пероксисомах растений [210].

## 1.2. Липоксигеназы и их роль в образовании АФК в растениях

Липоксигеназы обнаружены в различных организмах, включая грибы, цианобактерии, водоросли и более 60 видах высших растений [213].

Растительные липоксигеназы (линолеат: кислород-оксидоредуктаза КФ 1.13.11.12) принадлежат к классу диоксигеназ. Липоксигеназы катализируют реакцию окисления полиненасыщенных высших жирных кислот с образованием гидропероксидных производных [2, 136, 201]. Субстратами растительных липоксигеназ являются свободные, реже связанные в фосфолипидах полиненасыщенные жирные кислоты, такие как линолевая и линоленовая. Присоединение атома кислорода происходит в С-9 или С-13 положении, в связи с этим липоксигеназы делят на две группы 9-липоксигеназы и 13-липоксигеназы [64]. С меньшей скоростью фермент окисляет сложные эфиры полиненасыщенных жирных кислот, в том числе глицериды и эфиры стериннов, полиненасыщенные спирты и алкилгалогениды [203].

Липоксигеназа является мономерным белком с молекулярной массой 94-104 кДа. Фермент содержит атом железа, выполняющий важную функцию при энзиматической реакции [71]. Кроме того, были обнаружены липоксигеназы, содержащие атом марганца (Mn-липоксигеназа) [222].

Липоксигеназа может иметь разную локализацию в клетках растений. Фермент обнаружен не только в цитоплазме, вакуолях [229], хлоропластах и липидных телах [166], но также показано присутствием липоксигеназы и в митохондриях растительных клеток [137]. Показано присутствие как минимум двух изоформ липоксигеназ или в матриксе, или во внутренней мембране митохондрий этиолированных стеблей гороха [137].

Отмечено наличие как растворимых, так и мембраносвязанных липоксигеназ [234]. В настоящее время известны аминокислотные последовательности более 60 растительных липоксигеназ, для некоторых из них получены трехмерные модели [93]. Одной из первых липоксигеназ,



обнаруженных в растительных клетках, была липоксигеназа семян гороха. Высокая активность фермента обнаружена и в растениях сои [207].

Метаболизм полиненасыщенных жирных кислот с участием липоксигеназ и соответствующие реакции получили название липоксигеназного пути [139]. Липоксигеназный каскад достаточно часто активируется при действии различных стрессовых факторов [257]. Первым ферментом, начинающим такой каскад реакций, является фосфолипаза  $A_2$ . Под действием данного фермента высвобождается большое количество полиненасыщенных жирных кислот, которые далее подвергаются окислению липоксигеназами до гидропероксидов. Гидропероксиды, выполняя роль  $Ca^{2+}$ -ионофоров, способствуют поступлению кальция в клетки. Кальций же с помощью комплекса с кальмодулином может дополнительно активировать фосфолипазу  $A_2$ , которая вызывает последующую деградацию липидов [104].

Клонирование многих липоксигеназ и других ключевых ферментов липоксигеназного пути, а также анализ обратимых генетических и метаболических реакций позволили исследователям сделать предположения о механизмах действия, множественных функциях и регуляции разными факторами [167]. Предполагают участие липоксигеназ в ряде физиологических процессов растений, таких как рост и развитие [150]. Фермент способен ускорять процесс созревания плодов, который сопровождается деградацией хлоропластов и митохондрий [90]. Кроме того, липоксигеназы активируются при прорастании и хранении семян, а также используются в качестве запасного белка во время вегетативного роста [229]. Показано, что в клетках мезофилла листьев сои накапливаются вегетативные липоксигеназы, индивидуальные изоформы которых играют роль не только активных ферментов, но и временных запасных белков [158]. Липоксигеназы участвуют в формировании биологических посредников (сигнальных молекул), которые осуществляют реакции перекисного окисления, играют роль в биосинтезе травминовой, жасмоновой кислот, этилена [27, 131, 143,

202], а также играют важную роль в защите растений от различных стрессовых воздействий [50, 255].

Продукты липоксигеназного окисления играют как положительную, так и отрицательную роль в растениях [27]. Липоксигеназа может вносить вклад в процессы накопления гидропероксидов, одного из типов АФК [2, 105, 201]. С одной стороны гидроперексиды полиненасыщенных жирных кислот, синтезируемые различными высокоспециализированными формами липоксигеназ, являются субстратами 7 различных семейств ферментов. С другой стороны, они могут индуцировать процессы программированной гибели клеток [185]. Среди продуктов липоксигеназного окисления обнаружены антимикробные и антигрибные соединения, такие как альдегиды или дивинилэферы и видоспецифичные смеси летучих веществ [105, 167].

Мало изучена роль данного фермента в условиях гипоксического стресса. Так, было показано [187], что в клетках листьев картофеля в условиях аноксии увеличивалась как активность липоксигеназы, так и содержание ее м-РНК.

### 1.3. Роль различных клеточных компартментов в процессах образования активных форм кислорода

#### 1.3.1. Митохондрии растений и их роль как поставщиков АФК

Митохондрии являются клеточными органоидами, участвующими в процессе дыхания, регулирующими энергетический метаболизм. Под влиянием многих абиотических и биотических стрессов на организм растений, митохондрии выполняют важную ключевую роль. При окислительном стрессе меняется их ультраструктура и функциональная активность [117, 121].

Предполагается, что дыхательная цепь митохондрий вносит меньший вклад в процессы образования АФК по сравнению с хлоропластами и пероксисомами. Однако в темноте или в нефотосинтезирующих тканях именно митохондрии могут выступать главным источником образования

различных типов АФК [60]. В митохондриях образование супероксидрадикала, а затем и перекиси водорода сопряжено с функционированием дыхательной электроно – транспортной цепи, которая локализуется во внутренней мембране. Стрессовые факторы, как правило, ведут к нарушению функций митохондрий, что и вызывает усиление продукция супероксидрадикала и происходит накопление перекиси водорода. В дальнейшем образуется и гидроксильный радикал, который является еще более сильным окислителем. В митохондриях растений образование супероксидного радикала также связано с так называемым цианид-резистентным дыханием [209]. Показано участие альтернативной оксидазы и разобщающих белков в накоплении АФК в митохондриях. Отмечено [84], что уменьшение активности альтернативной оксидазы увеличивает вероятность образования АФК, и предполагают возможное участие разобщающих белков в удалении перекисей липидов из митохондрий.

При избыточной концентрации АФК, особенно гидроксильных радикалов, происходят процессы перекисного окисления липидов мембран митохондрий. При этом образуются липидные альдегиды, алкены и гидроксилалкены. Данные продукты перекисидации липидов способны повреждать различные биологические молекулы, включая белки, липиды, нуклеиновые кислоты. Кроме того, АФК могут влиять на белки митохондрий за счет возможного прямого окисления аминокислот, окисления, разрушающего пептидные связи, а также за счет реакции с продуктами перекисидации липидов [209].

Для поддержания определенного уровня митохондриальных АФК в клетках растений должна включаться защитная антиоксидантная система. Отмечено [171], что растения с помощью локальных механизмов способны определять и регистрировать даже незначительные изменения концентрации митохондриальных АФК.

Отмечено [141], что растительные митохондрии имеют уникальную по вариабельности окружающую среду. Митохондрии окружены обильным дыхательным субстратом и кислородом благодаря активному процессу фотосинтеза. В запасающих корнях, корневищах и плодах углеводов достаточно много, но уровень кислорода там низкий. В связи с этим специфичные комплексы ферментов митохондриальной электронно-транспортной цепи контролируют в них образование АФК.

В состав комплекса митохондриальной системы защиты входят как универсальные для растений и животных компоненты – это разобщающие белки, митохондриальные поры, АДФ/АТФ антипортер, свободные жирные кислоты, так и специфические для растений – альтернативная цианидрезистентная оксидаза, ротенон-нечувствительные НАД(Ф)Н-дегидрогеназы, АТФ-чувствительные калиевые каналы [176, 209]. Компоненты митохондриальной системы защиты позволяют снизить концентрацию АФК, образующихся при действии различных стрессовых факторов. Но если концентрации АФК превышают нормальный уровень в клетках, несмотря на работу систем защиты, то могут происходить необратимые последствия, включающие запрограммированную клеточную гибель [176, 208, 209].

Митохондриальные АФК могут выступать в качестве важных сигнальных молекул в растениях, передавая информацию в другие клеточные компартменты, например, в хлоропласты, и данный процесс может рассматриваться как митохондриальная обратная регуляция [229]. Следовательно, в митохондриях растений должна соблюдаться определенная концентрация АФК, необходимая для осуществления сигнальных реакций, и не приводящая к клеточным повреждениям [209].

При исследовании изменений ультраструктуры митохондрий и функционального состояния клеток корней пшеницы при индукции окислительного стресса паракватом и салициловой кислотой была отмечена корреляция динамики накопления пероксида водорода, усиления

перекисного окисления липидов и падением мембранного потенциала митохондрий [83]. При изменении интенсивности дыхания корней выявлен широкий спектр конформационных переходов митохондрий, отражающий процесс развития окислительного стресса.

### 1.3.2. Роль хлоропластов и пероксисом в образовании АФК

Наряду с митохондриями, образование АФК происходит и в хлоропластах растительных клеток [118, 210]. Одним из основных источников АФК являются реакционные центры фотосистем хлоропластов. В результате процесса фотосинтеза в хлоропластах постоянно образуются такие типы АФК, как синглетный кислород, супероксидный анион-радикал и пероксид водорода [128, 216, 230]. В ходе реакций световой стадии фотосинтеза возможно накопление синглетного кислорода с участием пигментов [65]. В хлоропластах в процессе электронного транспорта часть электронов может также перехватываться кислородом из ЭТЦ с образованием супероксидного радикала. Возникновение его связано с работой I и II фотосистем [81]. Представлены экспериментальные данные о роли пластохинонового пула в восстановлении молекулы кислорода, ведущем к образованию различных типов АФК [216]. Показана двойственная роль его за счет восстановления кислорода пластосемихиноном до супероксида и дальнейшее восстановление супероксида до пероксида водорода. Вторая роль состоит не только в нейтрализации супероксидного анион-радикала, но и в образовании пероксида водорода, важной сигнальной молекулы.

Образование АФК может происходить и в пероксисомах растительных клеток в результате их нормального метаболизма. Считается [220, 237], что в растительных клетках пероксисомы являются основным источником образования внутриклеточного пероксида водорода. При этом пероксид водорода образуется в процессе фотодыхания или реакциях окисления жирных кислот [171]. Кроме того, в пероксисомах обнаружены такие

ферменты, как гликолат- и уратоксидазы, которые также могут участвовать в накоплении пероксида водорода [262]. В матриксе и мембранах пероксисом растений возможно образование и супероксидного анион-радикала. Это связано с тем, что в матриксе пероксисом присутствует фермент ксантинооксидаза, который в определенных условиях способен продуцировать супероксидные радикалы [70], а в мембранах в генерации данной формы АФК может участвовать NAD(P)H оксидаза [237].

В результате целого ряда биохимических реакций возможно образование некоторых типов АФК в цитозоле клеток. Образование супероксидного анион-радикала в цитозоль может происходить за счет функционирования ферментных систем, находящихся на мембранах пероксисом. Не исключен и выброс в цитозоль супероксидного радикала, образованного на комплексах дыхательной цепи, находящихся во внутренней мембране митохондрий [101]. Кроме того, плазмалемма и сама может быть источником супероксидного анион-радикала в клетках растений [59, 109], так как на ней локализован фермент НАДФН-оксидаза, участвующий в образовании данного типа АФК.

#### 1.4. Биологическая роль активных радикалов в растениях

В клетках растений АФК образуются при нормальных метаболических процессах, составляя необходимую часть обмена веществ при работе ЭТЦ митохондрий и хлоропластов. При действии различных абиотических и биотических стрессовых факторов концентрация АФК может резко возрастать [226, 245]. Например, на процессы накопления АФК могут влиять температура, излучение, засоление и биотические стрессовые факторы – действие патогенов [157, 258].

Долгое время считалось, что АФК выполняют в основном негативную роль в клетках. Но результаты многих исследований, проводимых в последние годы, показывают важное физиологическое значение АФК в процессах онтогенеза растительных организмов [101, 197, 210]. АФК могут

участвовать в управлении процессами роста и развития, в ответе организма на действие стрессовых факторов окружающей среды [214, 216, 218]. При этом показано, что в зависимости от типа АФК или места его образования, запускаются различные биохимические, физиологические и молекулярные реакции. Для оценки специфичности АФК-запускаемых процессов использовали данные по экспрессии транскриптов [259].

Активные формы кислорода, образующиеся на поверхности клеточной стенки и в плазматической мембране, могут участвовать в метаболизме фенольных соединений, в частности в синтезе лигнина, который обеспечивает механическую прочность клеточных стенок. Образующиеся в матриксе клеточных стенок АФК способны бороться с патогенной микрофлорой, препятствуя их попаданию в клетки растений [13]. При этом предполагают и участие пероксида водорода в индукции противоионфекционных реакций растений [63].

Активные формы кислорода являются важными регуляторами роста и развития растений [174]. Показано, что пероксид водорода может способствовать прорастанию семян [180, 221] и оказывать прямое стимулирующее действие на рост растений [58]. Отмечено, что повышение уровня АФК, генерируемых НАДФН-оксидазой, обеспечивает разрыхление клеточной стенки, что и стимулирует рост корневой системы растений [204].

При действии различных стрессовых факторов АФК могут выступать в качестве вторичных мессенджеров [125, 214, 217, 241]. Выявлена способность АФК осуществлять процесс окисления редокс-чувствительных белков с участием определенных соединений (таких как глутатиона), регулирующих окислительно-восстановительный потенциал клеток. При этом АФК влияют на конформацию самих белковых молекул и, следовательно, на их функциональную активность [51].

Сигнальную роль в растительных клетках могут выполнять различные типы АФК [31, 100, 226, 250]. Например, пероксид водорода способен активировать каскадную систему, запускающую киназную реакцию [228].

Второй сигнальной молекулой может быть гидропероксильный радикал  $\text{HO}_2\cdot$ . Также АФК координируют функционирование пластид и митохондрий через регуляцию нуклеотидной транскрипции [170]. Показано, что АФК могут вступать как сигнальные молекулы и во время индуцированного растительным гормоном физиологического клеточного ответа [192]. С другой стороны, АФК, обладая высокой реакционной способностью, могут разрушать различные клеточные структуры [145, 178]. Многие активные формы кислорода вступают в реакции с различными клеточными компонентами или метаболитами [59]. Находящийся во внутренней мембране митохондрий супероксидный анион-радикал может принимать участие в повреждении молекул ДНК. Процесс окисления нуклеиновых кислот происходит и за счет реакционноактивных гидроксильных радикалов, вызывающих модификацию этих соединений, разрывы цепей и повреждение хромосом. Высокие концентрации АФК и липидных гидропероксидов также ингибируют синтез ДНК, процессы деления клеток, что в свою очередь может активировать процессы апоптоза [75].

## 1.5. Антиоксидантная система защиты растений

### 1.5.1. Неферментативные антиоксиданты

При действии различных стрессовых факторов в растениях возможно избыточное накопление различных типов АФК, что может привести к гибели организма [59]. Для защиты от негативного влияния стрессоров в растениях существует антиоксидантная система, позволяющая контролировать содержание АФК в клетках. Антиоксидантная система защиты включает в себя низкомолекулярные антиоксиданты и целый ряд ферментов (супероксиддисмутазу, каталазу, пероксидазы) [86].

Неферментативная антиоксидантная система включает жирорастворимые ( $\alpha$ -токоферол, каротиноиды) и водорастворимые антиоксиданты (аскорбиновая кислота, глутатион, фенольные соединения) [159].



В защите растений от окислительных повреждений участвует  $\alpha$ -токоферол (витамин Е), находящийся во всех мембранах клетки и обладающий способностью нейтрализовать (перехватывать) свободные радикалы. Токоферол предохраняет липиды мембран от разрушения, реагируя с радикалами жирных кислот. Антиоксидантные свойства каротиноидов обеспечивают защиту клеток растений от действия синглетного кислорода. Важную роль в этом процессе выполняет  $\beta$ -каротин [102, 124].

Низкомолекулярные антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота и глутатион, выполняют защитную функцию от окислительного действия супероксидного анион-радикала, избыточное накопление которого происходит в хлоропластах или митохондриях клеток [140]. Аскорбиновая кислота (витамин С) – является наиболее изученным метаболитом в клетках растений и ключевым антиоксидантом, действующий во всех клеточных компартментах. Аскорбиновая кислота или аскорбат участвует в нейтрализации АФК (супероксидного радикала, пероксида водорода), и регенерации токоферол-радикалов. Процесс образования аскорбиновой кислоты в большей степени происходит в листьях. Выявлено накопление данной кислоты не только в клетках, но также и в апопласте [16].

Антиоксидантными свойствами обладает и восстановленный глутатион – органическое соединение, трипептид. Содержание глутатиона в растительных клетках достаточно высокое – 0,2 – 10 мМ. Глутатион выступает в роли акцептора гидроксильного радикала и синглетного кислорода, а также служит кофактором глутатион-пероксидазы и глутатионредуктазы. Это главный восстановитель клетки. Он участвует в восстановлении АФК, перекисных соединений и обезвреживании вторичных метаболитов окисления [19].

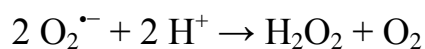
К низкомолекулярным антиоксидантам принадлежат и флавоноиды. В результате различных стрессовых факторов, активируются реакции синтеза

флавоноидов, принадлежащих к группе фенольных веществ. Предполагают, что флавоноиды меняют кинетику пероксидации липидов [211].

### 1.5.2. Ферментативная антиоксидантная система

Среди высокомолекулярных ферментов-антиоксидантов важнейшую роль играют супероксиддисмутаза, каталаза, группа пероксидаз [22]. Основную роль в снижении содержания супероксидного анион-радикала выполняет фермент супероксиддисмутаза (СОД).

Супероксиддисмутаза (КФ 1.15.1.1) катализирует реакцию дисмутации супероксидных радикалов с образованием пероксида водорода и молекулярного кислорода [7].



Фермент обнаружен в клетках живых организмов разного уровня организации (растений, животных, микроорганизмов). В клетках растений фермент представлен несколькими изоформами, отличающимися атомами металлов в составе их активных центров [86, 106]. Изоформы имеют разную локализацию в клеточных компартментах, молекулярную массу и чувствительность к ингибиторам [249, 252]. Первым был изучен фермент, содержащий ионы меди и цинка в активном центре (CuZn-СОД), впоследствии было обнаружено существование еще двух изоформ (Fe-СОД и Mn-СОД).

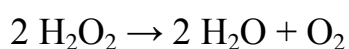
Растительная CuZn-СОД представляет собой гомодимер, каждая субъединица которой содержит один атом Cu и один атом Zn. Фермент обнаружен в цитозоле [183], митохондриях [199], хлоропластах, пероксисомах, а также в апопласте [153]. CuZn-СОД отличается по молекулярным свойствам от двух других изоформ фермента. В клетках прокариот и эукариот обнаружена Fe-СОД [205]. Данная форма присутствует в хлоропластах, пероксисомах [260] и в цитоплазме клубеньков некоторых бобовых культур [173].

В пластидах локализована Fe-СОД, представленная гомодимером, каждая субъединица которого содержит один атом железа. Следует отметить, что ген Fe-СОД был идентифицирован у многих растений, в том числе у арабидопсис и сои, но не был обнаружен в геноме риса и кукурузы. У арабидопсис в хлоропластах обнаружены три изоформы Fe-СОД [54].

За ликвидацию супероксидрадикала в митохондриях [199] и пероксисомах [224] отвечает Mn-СОД. Фермент может быть представлен гомодимером или тетрамером с одним атомом марганца на субъединицу белка. В клетках растений кукурузы обнаружено четыре изоформы Mn-СОД [6]. Выявлен и новый митохондриальный белок, способный играть важную роль в активации Mn-СОД у арабидопсиса [129].

Супероксиддисмутаза защищает клетки и ткани растений от окислительных повреждений, действия неблагоприятных факторов внешней среды. Ингибитором СОД может выступать пероксид водорода, образующийся при дисмутации супероксидного анион-радикала, в связи с этим эффективная работа фермента будет зависеть от функционирования других компонентов антиоксидантной системы защиты.

В детоксикации образующегося пероксида водорода важную роль играет фермент каталаза. Каталаза (КФ 1.11.1.1) является гемсодержащим ферментом, участвующим в нейтрализации пероксида водорода до воды и молекулярного кислорода:



Реакция нейтрализации пероксида водорода происходит с высокой скоростью, но фермент начинает работать только при высокой концентрации пероксида водорода [21]. В связи с этим важно участие и ряда других ферментов, участвующих в процессе превращения пероксида водорода [15]. Каталаза локализована преимущественно в цитоплазме, глиоксисомах или пероксисомах. Кроме того, особая изоформа каталазы обнаружена также в митохондриях и хлоропластах растений [86].

Ферменты пероксидазы ускоряют реакции восстановления пероксида водорода с использованием различных субстратов. Они присутствуют в различных компартментах клетки: хлоропластах, митохондриях, пероксисомах, цитозоле.

Аскорбатпероксидаза (КФ 1.11.1.11) является основным ферментом, задействованным в детоксикации пероксида водорода. Реакция разложения пероксида происходит в результате окисления аскорбиновой кислоты. Аскорбатпероксидаза локализована в хлоропластах, катализирует разрушение пероксида водорода даже при низких его концентрациях в клетке. Также фермент обнаружен в цитозоле, пероксисомах, глиоксисомах [127, 188]. Только при достаточно высоком содержании аскорбиновой кислоты в клетках активность фермента в клетках сохраняется. Для этого работают ферменты, относящиеся к антиоксидантам (дегидроаскорбатредуктаза, монодегидроаскорбатредуктаза) [172].

Гваяколпероксидаза (КФ 1.11.1.7) обнаружена в клеточных стенках и вакуолях. Фермент участвует в восстановлении пероксида водорода путем окисления ароматических фенольных соединений, таких как гваякол и пирогаллол. При этом аскорбат используется ферментом с крайне низкой скоростью. Известно, что гваяколпероксидазы участвуют в сложном процессе биосинтеза лигнина. Активация гваяколпероксидаз обычно наблюдается при заражении различных растений при участии патогенных микроорганизмов, а также под действием ультрафиолетового излучения, то есть в случаях, когда есть необходимость укрепления клеточных стенок путем лигнификации.

Глутатионпероксидаза (КФ 1.11.1.9) локализована в цитоплазме, матриксе митохондрий или плазмалемме. Этот фермент участвует в детоксикации различных органических или неорганических пероксидов, нуклеиновых кислот, белковых молекул. Для процесса восстановления пероксида водорода фермент глутатионпероксидаза может использовать глутатион [227].

Антиоксидантные ферменты также могут оказывать влияние на уровень хемилюминесценции в растениях. Например, показано [168], что каталаза и СОД способны ингибировать хемилюминесценцию в клетках растений сои. Антиоксидантные ферменты способны удерживать на более низком уровне интенсивность процессов пероксидации липидов в растениях в условиях почвенной гипоксии [56].

## ГЛАВА 2. ГИПОКСИЧЕСКИЙ СТРЕСС И ОБРАЗОВАНИЕ АФК В РАСТЕНИЯХ

### 2.1. Гипоксия и ее роль в процессах жизнедеятельности растений

Растения в различные периоды онтогенеза часто подвергаются воздействию различных неблагоприятных условий внешней среды. Одним из факторов, оказывающих значительное влияние на растения, является содержание кислорода, важного компонента газовой среды, необходимого для дыхания живых организмов. Недостаток кислорода может вызывать серьезные метаболические изменения в организме растений, поэтому изучение механизмов адаптации растений к условиям гипоксии имеет важное научное и практическое значение [206]. Изучению проблемы адаптации растений к дефициту кислорода посвящены работы как отечественных, так и зарубежных ученых – работы Г.М. Гринёвой [28, 29], Б.Б. Вартапетяна [11, 138], Т.В. Чирковой [110-113], А.А. Землянухина [44-47], А.Н. Ершовой [34-40], R.M.M. Crawford [154, 155].

Растения достаточно часто оказываются в условиях дефицита кислорода, что может быть связано с избыточным переувлажнением, затоплением или уплотнением почвы, образованием ледяной корки [38, 155, 206]. Концентрация кислорода в окружающей растения среде может отличаться от нормы, возможен его недостаток – гипоксия, или полное отсутствие – аноксия.

В условиях гипоксического стресса в тканях некоторых растений возникает дефицит кислорода [132]. Одни растения при переувлажнении или затоплении могут расти более длительное время, а другие погибают даже при кратковременном недостатке кислорода. В результате процесса затопления в почве нарушаются условия аэрации: снижается доступ газов к корневой системе растений, повышается содержание углекислого газа и может наступить аноксия – отсутствие кислорода [47]. Это приводит к замедлению или полному прекращению транспорта электронов, снижению

окислительного фосфорилирования и наступлению процессов брожения (спиртового или молочнокислого) [160].

При гипоксии в результате окисления субстратов дыхания образуются спирты или органические кислоты [9]. Повышается проницаемость мембран клеток, что приводит к изменению гомеостаза растений [23]. Изменения ультраструктуры клеточных мембран сопровождаются деградацией цитоплазмы и органелл в корнях растений, подвергнутых гипоксии [233]. При дефиците кислорода возможны процессы перекисного окисления мембран клеток [43, 46, 223].

Дефицит кислорода может оказывать влияние на корневую систему растений и косвенно. В результате нарушения работы аэробных почвенных бактерий прекращаются окислительные реакции, возрастает доля анаэробных процессов. Происходит увеличение концентрации диоксида углерода, различных органических кислот, имеющих токсичное действие на корневую систему растений, что и может привести к гибели побегов [29, 82]. Было показано, что снижение концентрации кислорода до 0,3-0,05 %, вызванное длительным затоплением, вызывает отмирание сеянцев риса [243].

Исследовано влияние недостатка кислорода или его полного отсутствия [52] на строение и функции хлоропластов в листьях чувствительных растений гороха и устойчивых растений сои к дефициту кислорода. Показано, что в листьях обоих видов растений снижалось содержание пигментов и интенсивность фотосинтеза, а интенсивность темнового дыхания при этом усиливалась. При длительной аноксии, как предполагают, может наблюдаться и частичная деструкция мембранной системы тилакоидов. При корневой гипоксии отмечена также редукция комплексов реакционных центров фотосистем, что приводит к хлорозу листьев [62].

## 2.2. Адаптация растений к дефициту кислорода

### 2.2.1. Анатомо-морфологические механизмы адаптации растений к гипоксии

При недостатке кислорода, вызванным избыточным переувлажнением или процессом затопления почв, растениям необходимо сохранить определенную его концентрацию в тканях. Это становится возможным благодаря различным анатомо-морфологическим механизмам адаптации [191].

При гипоксии происходит изменение корневой системы растений. При этом корни могут становиться короткими и утолщаться, а также возможно уменьшение числа корневых волосков. Приспособление растений к условиям затопления возможно за счет образования поверхностной системы корней, развивающихся дополнительными корнями [28].

У растений гидрофитов основным приспособлением к перенесению гипоксических условий становится аэренхима, представляющая собой основную ткань, содержащую очень крупные межклетники. В результате реакций фотосинтеза образующийся кислород может накачиваться по полостям в корни и поддерживать их дыхание в таких условиях. Развитие аэренхимы и наличие в листьях и черешках полостей, заполненных воздухом, обеспечивает возможность растениям плавать на поверхности водоемов. У растений гидрофитов отсутствуют механические ткани, но это и компенсируется возможностью их листьев размещаться на поверхности воды. У тех органов растений, которые погружены в воду, не происходят процессы образования суберина и кутина. Это дает им возможность осуществлять поглощение веществ не только корневой системой, но и остальной поверхностью [28].

На достаточно сильно увлажненных почвах расти способны не все культурные виды. Одним из таких представителей, приспособившихся к условиям переизбыточного увлажнения, является рис. У данного растения происходит дифференцировка тканей первичной коры стебля и корня в аэренхиму, что обеспечивает перемещение достаточного количества



кислорода ко всем тканям. Поступление кислорода в образующиеся воздушные полости корневой системы происходит из надземной части растения [4].

У растений мезофитов не только дефицит воды, но и ее избыток может вызывать серьезные изменения в росте и развитии. Кратковременное затопление приводит к снижению скорости ростовых процессов. Поэтому в нормальных условиях аэрации у растений мезофитов аэренхима отсутствует. Процесс ее образования может происходить у основания стебля или в молодых корнях лишь в условиях дефицита кислорода в тканях. Формирование этой ткани в стебле вызывает этилен. Процесс накопления этилена в клетках первичной коры корневой системы или стебля служит сигналом для их гибели. Далее на месте этих клеток образуются полости, необходимые для транспорта кислорода в корневую систему. Также одним из сигналов для гибели клеток могут быть ионы кальция [10]. Данный процесс был назван апоптозом, или программированной клеточной смертью. Благодаря апоптозу погибает лишь небольшая часть клеток растений, давая возможно выжить целому организму [161].

### 2.2.2. Метаболические механизмы адаптации растений к гипоксии

Метаболическая адаптация включает в себя различные процессы, связанные с приспособлением растительных организмов к условиям недостатка кислорода [12]. К метаболическим способам адаптации растений к дефициту кислорода относятся трансформация дыхательных путей, торможение распада белков и липидов, синтез стрессовых белков, сдвиги в гормональном балансе, стабилизация мембран, метаболизация продуктов анаэробного обмена и снижение интенсивности обмена веществ [29, 35, 39, 111].

В условиях гипоксии меняется интенсивность дыхания. Так, у неустойчивых растений интенсивность может снижаться или подавляться полностью. Для устойчивых растений свойственна низкая интенсивность

дыхания, которая, вероятно, отражает пониженную интенсивность обменных процессов [94].

Трансформация дыхательных путей включает в себя увеличение доли гликолиза при аноксии [48, 69], возрастание доли пентозофосфатного пути (ПФП) дыхания и использование альтернативных путей окисления восстановленных коферментов [28, 111, 169]. В первые часы кратковременного дефицита кислорода у неустойчивых растений возможно резкое и кратковременное повышение реакций гликолиза. У более устойчивых растений гликолиз осуществляется более продолжительное время при меньшей его интенсивности. Это обеспечивает растения необходимой энергией [4]. При недостатке кислорода возможно увеличение доли пентозофосфатного пути дыхания, но если интенсивность действия стрессора возрастает, данный путь замедляется. У менее устойчивых растений непродолжительное увеличение пентозофосфатного пути происходит вслед за увеличением гликолиза. При этом у более устойчивых растений это происходит при некотором ограничении кислорода.

Метаболическая адаптация включает также альтернативные пути окисления восстановленных коферментов с последующим накоплением сукцината, аспартата или малата. Такие альтернативные пути окисления в большей степени отмечены у более устойчивых растений, они дополняют реакции гликолиза, что позволяет не только окислять коферменты, но и участвовать в накоплении интермедиатов. Например, было показано [177], что в растениях лотоса (*Lotus japonicus* L.) в результате гипоксии, вызванной затоплением корневой системы, происходила аккумуляция аланина и сукцината.

Сдвиги в обмене веществ у растений включает также торможение распада белков и липидов, синтез стрессовых белков. Так, при гипо- и аноксии изменяется количественное содержание и качественный состав белков. В анаэробных условиях в растениях активируется синтез стрессовых белков, отмечают специфичность аноксических белков по сравнению со

стрессовыми белками, синтезируемыми при действии других факторов внешней среды на растение [113]. Предполагается, что сигналом для образования этих белков является кальций, концентрация которого возрастает уже через несколько минут после начала гипоксии. Также индуцируется синтез белков-ферментов гликолиза, спиртового брожения, азотного обмена [66, 103, 107]. При распаде белков, вызванных аноксией, образуются свободные аминокислоты, что позволяет поддерживать осмотический потенциал клеток, подвергнутых стрессовому воздействию [45, 92].

Наряду с изменением белкового, важным в адаптации растений к дефициту кислорода является изменение липидного обмена. Важную роль в этих процессах играют фосфолипиды мембран. Показано, что под действие гипоксии и аноксии снижается интенсивность обмена и содержание липидов, а также фосфолипидов растений [46, 47]. При этом в результате распада липидов возрастает количество свободных жирных кислот. У более устойчивых к гипоксии растений липидный метаболизм нарушается в меньшей степени, чем у неустойчивых. Деградация жирных кислот способствует процессу ПОЛ, интенсивность которого возрастает [35, 154].

Метаболические механизмы адаптации растений к дефициту кислорода включают также изменения в гормональном балансе. Изменение содержания гормонов будет зависеть от содержания кислорода в окружающей среде, а также степени устойчивости растения [242]. При аноксии уровень стимуляторов роста растений падает, а ингибиторов – возрастает. Отмечено накопление АБК в условиях гипоксии [242] и аноксии [26]. У неустойчивых к дефициту кислорода растений, в отличие от более устойчивых, корневая гипоксия может приводить к увеличению содержания этилена.

Результаты исследований по определению содержания цитокининов и гиббереллинов различаются у разных по устойчивости видов растений, а также в зависимости от органов. Например, показано снижение содержания цитокининов в растениях при аноксии [26]. При гипоксическом стрессе

возможно изменение содержания этилена. Было показано увеличение выделения этилена в растениях в условиях гипоксии [9].

Не менее важным механизмом защиты растений от действия гипоксии является метаболизация продуктов анаэробного обмена (этилового спирта, молочной кислоты, ацетальдегида), образующихся в результате процесса брожения [28, 112, 122].

В условиях гипоксии и аноксии возможно изменение и регулирование уровня рН. Обнаружено [198], что гипоксия у злаковых растений (риса и пшеницы) сначала вызывала быстрое снижение рН цитоплазмы, а затем наблюдали его медленное и частичное восстановление. Отмечено, что акклиматизированные и устойчивые к аноксии ткани растений могут показывать более высокий уровень цитоплазматической рН, чем не акклиматизированные [161, 181]. Отмечено положительное влияние нитратов на регуляцию рН цитоплазмы при аноксии, несмотря на ограничение метаболизма [219]. Таким образом, помимо приспособления к сохранению близкого к нормальному содержанию кислорода в корнях при затоплении растения должны использовать и приспособления к функционированию при недостатке или полном отсутствии кислорода. Такими приспособлениями могут быть изменения в обмене веществ или метаболические способы адаптации [110].

### 2.3. Образование АФК и активность ферментов в растениях в условиях гипоксии

Действие гипоксии, аноксии и реаэрации на процессы образования активных радикалов и активность ферментов антиоксидантов является дискуссионным вопросом. Показано, что в условиях дефицита кислорода в клетках растений изменяется содержание различных типов АФК [54, 74, 78, 206, 261] и активность антиоксидантных ферментов [4, 123]. Но влияние гипоксического стресса изучено лишь для небольшого количества растений и при достаточно длительных сроках инкубации [112, 140, 154].

Так, в исследованиях [54] обнаружено накопление пероксида водорода и повышение содержания МДА в клетках корней ячменя при действии почвенной гипоксии. Считается, что появление АФК при гипоксии является спецификой вида и не зависит от возраста растения [261]. Отмечено, что образование АФК может быть одним из ранних клеточных ответов при действии гипоксического стресса [96].

В тоже время, отмечено [78, 140, 187], что процессы образования АФК возрастают при возобновлении аэрации. Так, в первые часы аноксии в кончиках корней проростков сои (среднеустойчивого растения) обнаружено значительное количество супероксидных анион-радикалов, что сопровождалось активацией фермента СОД. При аноксии у устойчивого к затоплению вида касатика (*Iris pseudacorus*) не наблюдалось образования свободных радикалов, тогда как у неустойчивого к затоплению вида (*Iris germanica*) в корневищах отмечали генерацию свободных радикалов [154]. Показано, что у неустойчивых проростков пшеницы, так же как и у устойчивых растений риса, содержание супероксидного анион-радикала увеличивалось при реаэрации. Однако более заметным это было у неустойчивых проростков пшеницы [78]. В культуре клеток клубней картофеля, растения, неустойчивого к затоплению, после 18-часовой аноксии также резко увеличивалось содержание супероксидного анион-радикала, а через час после последующей реаэрации оно увеличивалось еще вдвое [187]. При этом содержание пероксида водорода при возобновлении аэрации снижалось. Было показано [35], что в проростках гороха даже в условиях кратковременной гипоксии происходила активация процессов пероксидации липидов. У более устойчивых проростков кукурузы при этом в первые часы гипоксии содержание диенов и МДА, промежуточных и конечных продуктов ПОЛ, было существенно ниже, чем у контрольных растений.

В условиях гипоксии изменяется и активность антиоксидантных ферментов. Литературные данные по влиянию дефицита кислорода на изменение активности супероксиддисмутазы, участвующей в детоксикации

супероксидного анион-радикала, достаточно разноречивы. С одной стороны, показано, что в условиях гипоксии активность СОД повышалась в клетках устойчивого вида ириса [215] и в условиях аноксии в корнях пшеницы [165]. При действии длительной гипоксии в корнях и листьях ячменя была установлена индукция активности СОД [54, 74]. В исследованиях [56, 242] гипоксический стресс вызывал повышение активности фермента только в начальный период действия стрессора. В тоже время в других работах отмечено, что ни условия гипоксии, ни последующая реэрация не влияли на активность супероксиддисмутазы, однако аноксия приводила к увеличению общей активности фермента [165]. С другой стороны, в условиях аноксии для устойчивых растений риса и ячменя вообще не отмечалось изменения активности фермента [112], или даже было обнаружено [53] резкое снижение его активности при почвенной гипоксии в корнях растений ячменя.

В процессах детоксикации различных типов АФК в клетках растений может участвовать и целый ряд других антиоксидантных ферментов, таких как каталаза, пероксидаза, аскорбатпероксидаза, глутатионредуктаза. Показано [242, 264], что при гипоксическом стрессе происходило повышение активности пероксидазы, каталазы и глутатионредуктазы. Отмечено [123], что активность антиоксидантных ферментов зависила от степени устойчивости растений. Показано, в клетках более устойчивых сортов риса активность каталазы, аскорбатпероксидазы и пероксидазы была выше, чем у неустойчивых сортов. Установлено, что активность антиоксидантных ферментов каталазы, гваяколпероксидазы, аскорбатпероксидазы у устойчивых растений риса, в отличие от растений пшеницы, сохранялась на высоком уровне при аноксии и затем возрастала при постаноксической реэрации [68]. В последнее время обнаружено, что суммарная экспрессия генов семейства аскорбатпероксидазы у растений риса даже резко возрастала при реэрации особенно через 12-24 часа аноксии [87].

В условиях гипоксического стресса было обнаружено повышение активности каталазы в проростках ячменя [53] и аскорбатпероксидазы в

растениях рапса [56]. Повышение активности основных антиоксидантных ферментов было отмечено в растениях кукурузы в условиях избыточного увлажнения почв [212, 231] и в растениях нута при затоплении [264]. Однако в работе [163] отмечали, что при гипоксии активность ферментов сукцинатдегидрогеназы и изоцитратдегидрогеназа снижалась, а пируватдекарбоксилазы и алкогольдегидрогеназы возрастала.

#### 2.4. Углекислый газ как составной компонент газовой среды, его влияние на метаболические процессы растений

В естественных условиях обитания растений недостаток кислорода сопровождается повышением содержания углекислого газа (до 20 % и более) [7]. Высокие концентрации  $\text{CO}_2$  обнаружены в стеблях древесных растений (6-10 %), плодах и клубнях (2-20 %) в условиях «внутреннего анаэробноза» [251]. Отмечено, что под ледяной коркой у растений озимой пшеницы во внутритканевой атмосфере растений концентрация  $\text{CO}_2$  достигала 27,0 %, а кислорода – падала до 11,0 % [44]. При помещении растений в среду инертного газа азота при отрицательных температурах в темноте содержание углекислоты повышалось до 45 – 50 % [35, 38, 54].

Повышение содержания углекислого газа в окружающей среде оказывает влияние на все процессы жизнедеятельности растений [99, 244]. Избыточная концентрация углекислоты в воздухе может оказывать действие на рост, синтез белка, активность физиологических процессов растений, снижение биомассы органов и содержание хлорофилла [142, 175, 254]. Показано, что при увеличении концентрации  $\text{CO}_2$  в атмосфере часто снижает дыхание растений, что может изменять ход физиологических процессов независимо от улучшения углеродного баланса растения [146]. Даже при оптимальном содержании кислорода в почвенном растворе повышение уровня углекислоты нарушало жизнедеятельность корней растений [89]. В условиях высоких концентраций диоксида углерода происходило уменьшение поглощения воды, минеральных солей корневой системой

растений, что связывают с изменением проницаемости мембран клеток при гипоксии [28].

В целом ряде работ [35-38, 45-47] было показано, что эффекты действия гипоксии на обмен углеводов, аминокислот, липидов и процессы их перекисного окисления усиливались при повышенном содержании  $\text{CO}_2$  в среде что являлось результатом специфического действия диоксида углерода на обменные процессы растений.

В отличие от исследований действия углекислого газа на организм человека и животных, которые ведутся достаточно широко, изучение роли  $\text{CO}_2$  в процессах нефотосинтетического метаболизма растений проводилось в меньшей степени [35-37, 39, 47]. Одной из причин этого является установившееся мнение, что действие углекислого газа связано с его влиянием на внутриклеточный уровень рН растений, сдвигая его в кислую сторону. Однако было обнаружено, что в среде с 30 % содержанием углекислого газа величина рН менялась мало [263]. В  $\text{CO}_2$  – среде (100 %) величина рН у проростков гороха и кукурузы могла после небольшого снижения даже увеличиваться до величины рН 6,8-7,2 [39].

В тоже время было установлено специфическое действие  $\text{CO}_2$  на ферментные системы, связанные с катаболизмом углеводов, ферменты цикла трикарбоновых кислот [48] и глиоксилатного пути [33]. Известно [39], что высокие концентрации диоксида углерода влияют на активность и свойства различных ферментов. Показано [41], что  $\text{CO}_2$  – среда в большей степени, чем гипоксия, увеличивала стабильность связанного с клеточной стенкой фермента  $\beta$  – глюкозидазы к высоким концентрациям пероксида водорода, накапливающегося в клетках при данных условиях, увеличивала сродство фермента к субстратам, но при этом значение оптимума рН фермента оставалось на уровне аэрируемых растений. Одновременно более существенно изменялась и трансгликозидазная активность для цитоплазматической формы данного фермента [40] у проростков гороха в условиях кратковременного действия среды  $\text{CO}_2$ , чем при обычной гипоксии.



## ГЛАВА 3. ФИТОГОРМОНЫ И РОЛЬ В УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К ГИПОКСИИ

### 3.1. Фитогормоны и их физиологические функции в растениях

Целостность растительного организма, его устойчивость к неблагоприятным условиям внешней среды обеспечивается различными системами регуляции, в том числе и гормональной. Регуляторы роста оказывают разностороннее действие на растения. Они участвуют в регуляции деления, роста и дифференцировки клеток [95, 97, 126], обеспечивают поддержание гомеостаза, создают условия для приспособления растений к различным стрессовым условиям окружающей среды [144, 149, 247].

Стероидные гормоны растений – brassinosteroids относятся к многофункциональным биорегуляторам, имеющим высокую активность [115, 196]. Brassinosteroids обнаружены почти во всех тканях растения, но их концентрация наиболее высока в молодых тканях: этиолированных проростках, меристемах, развивающейся пыльце. По-видимому, такое распределение brassinosteroids вызвано процессами дальнего и ближнего их транспорта по растению [17, 133].

Brassinosteroids – регулируют деление и растяжение клеток, активность ферментов, синтез белков и нуклеиновых кислот. Они способны повышать устойчивость растений к стрессовым условиям произрастания [1, 88, 151]. Известно, что стероидные фитогормоны изменяют качественный состав цитокининов, влияют на синтез этилена и абсцизовой кислоты, а также воздействуют на активность генетического аппарата и белоксинтезирующей системы [55, 116, 238]. Показано, что brassinosteroids синергистично повышают прорастание семян, чувствительное к ауксину [190].

Фитогормоны цитокинины также принимают активное участие в физиологических реакциях растений, связанных с действием различных стрессовых факторов [119]. В последнее время накапливается все больше данных, показывающих, что цитокинины обладают определенным защитным

действием. Показано, что цитокинины влияют на различные стороны обмена в клетке, в частности при их действии возрастает активность целого ряда ферментов, играющих ключевую роль в метаболизме. Обнаружено, что у высших растений и агробактерий первичные продукты процесса биосинтеза цитокининов *de novo* отличаются [184]. Цитокинины способны снимать отрицательное влияние на растения рентгеновского облучения, повышать холодо- и теплоустойчивость, замедлять старение и развитие вирусной инфекции.

Предполагается, что разнообразные проявления физиологической активности цитокининов связаны с их способностью влиять на структурную организацию и функциональную активность мембран растительных клеток. Обнаружено, что защитное действие кинетина на растения, испытывающих воздействие различных неблагоприятных факторов внешней среды, связано именно со способностью поддерживать оптимальное, свойственное данному типу тканей соотношение фосфолипидных компонентов в мембранах. Предполагается, что фитогормоны могут выполнять роль медиаторов, воспринимающих изменения в окружающей среде. Идентифицированы различные белки, участвующие в фитогормональной сигнализации, включая рецепторы многих из основных гормонов. Согласно современным исследованиям гормональная сигнализация интегрирована на нескольких уровнях в течение роста и развития растений [91, 247].

Фитогормоны выполняют важные физиологические функции в растениях. Одним из механизмов действия фитогормонов в частности цитокининов, может быть влияние их на структурную организацию и функциональную активность мембран растительных клеток. Кроме того, фитогормоны влияют на активность ферментов. Так, цитокинины значительно активируют фермент антирадикальной защиты СОД, что снижает количество свободных радикалов, таких как супероксидный радикал. Обработка растений томата эпибрассинолидом повышала активность различных антиоксидантных ферментов – СОД, аскорбатпероксидазы и глутатионредуктазы [12] и

активность низкомолекулярных антиоксидантов [162, 189]. Показано, что эпибрассинолид повышал активность нециклического фотофосфорилирования хлоропластов, что приводило к активации антиоксидантных ферментов пероксидаз [57].

Подавление процессов пероксидации липидов у растений под действием кинетина наблюдали и по снижению уровня липофусцинподобных продуктов, аналогичных таковым в тканях животных, накапливающимся в процессе старения. Предполагается, что действие регуляторов роста растений может быть опосредовано образованием свободных радикалов в клетках [42]. Проведенные исследования показали, что обработка растений кинетином влияет на липидный состав мембран митохондрий, вызывая снижение ненасыщенности жирнокислотных компонентов фосфолипидов их мембран. Это, в свою очередь, приводило к увеличению проницаемости мембран органоидов растительной клетке, что улучшало условия для внутриклеточного транспорта веществ и биосинтетических реакций [57].

### 3.2. Фитогормоны в устойчивости растений к гипоксическому стрессу

Участие фитогормонов в реакции растений на стресс складывается из двух этапов: они смягчают стрессовое воздействие и индуцируют физиологические изменения, ведущие к успешной выработке защитных реакций и повышению устойчивости к стрессу. При этом в них принимают участие все типы гормонов, хотя на различных этапах их участие проявляется неодинаково.

Брассиностероиды выполняют важную регуляторную роль в клетках, обеспечивая устойчивость растений к стрессовым условиям окружающей среды [88]. Брассиностероиды повышают термоустойчивость растений при тепловом шоке [10], оказывают положительное влияние на устойчивость растений к низким температурам [8], действию засухи и засоления [80, 114], действию гипоксии [35] и влиянию патогенов [195].

Показано защитное действие фитогормонов кинетина и эпибрасинолида на проростки растений в условиях гипоксического стресса благодаря снижению содержания не только первичных, но и конечных продуктов перекисного окисления липидов [35]. Было установлено [34], что фитогормон кинетин повышал степень ненасыщенности фосфолипидных компонентов клеток растений при дефиците кислорода и в  $\text{CO}_2$  – среде. Обнаружено [162], что при гипоксическом стрессе уровень АФК и процессы перекисного окисления липидов в корнях проростков огурца значительно возрастали, но это увеличение ингибировалось при добавлении эпибрасинолида. Обработка фитогормонов также существенно повышала активность ферментов СОД, АПО и глутатионредуктазы. Однако для большинства растений роль фитогормонов в процессах адаптации растений к гипоксии и влияние их на процессы образования АФК изучены крайне мало. В связи с этим необходимо выяснить влияние фитогормонов (кинетина и эпибрасинолида) на процессы образования активных форм кислорода в растениях в условиях гипоксического стресса.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### ГЛАВА 4. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 4.1. Объекты исследования

Объектами исследования служили 10–12-дневные растения гороха (*Pisum sativum* L.) сорта «Рамонский 77», сои (*Glycine max* L.) сорта «Белгородская 48» и кукурузы (*Zea mays* L.) сорта «Воронежская 76». Выбор культур был связан с тем, что данные растения имеют разную степень устойчивости к условиям дефицита кислорода. Растения гороха являются неустойчивыми к дефициту кислорода, соя и кукуруза относятся к среднеустойчивым культурам [43]. Семена растений были получены из ВНИИСС им. А.Л. Мазлумова (Рамонский район). Растения выращивали на свету методом гидропоники на водопроводной воде при 25°C и 12-часовом фотопериоде.

#### 4.2. Методы исследования

##### 4.2.1. Условия постановки опытов

Проростки растений в возрасте 10-12 дней без корней и семядолей помещали в стаканчики с 0,05 М трис-НСl-буфером (рН 7,2), ставили на 3-24 часа в затемненные вакуум-эксикаторы объемом 5 л, через которые пропускали разные газовые среды – воздух (контроль), азот или углекислый газ из баллонов со скоростью 25 см<sup>3</sup>/сек<sup>-1</sup> по ранее разработанной методике [35, 36]. Присутствие кислорода в баллоне с азотом составляло не более 0,5 % (по сертификату), что позволяет считать используемые в опытах условия гипоксическими.

В ряде опытов использовали регуляторы роста кинетин и эпибрасинолид. Растворы фитогормонов (10 мг/л в 0,05 М трис-НСl-буфере рН 7,2) вводили в надземную часть проростков методом насасывания с транспирационным током в течение 12 часов в темновых условиях, после чего растения переносили в условия разных газовых сред.

#### 4.2.2. Интенсивность свободнорадикального окисления в растениях

Интенсивность свободнорадикального окисления определяли методом железо-индуцированной хемилюминесценции [14]. Навеску растительного материала (0,5-1,5 г) растирали в ступке с 0,05 М К-фосфатным буфером (рН 7,0) в соотношении 1 : 4, фильтровали и центрифугировали (15 мин, 8000 об/мин). В кювету вносили: 0,4 мл 0,02 М К-фосфатный буфер (рН 7,5), 0,4 мл 0,01 мМ FeSO<sub>4</sub>, 0,1 мл тканевого гомогената, 0,2 мл 2% раствора H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и через 30 с регистрировали интенсивность максимальной вспышки ( $I_{\max}$ ) и светосумму медленной вспышки ( $S$ ) на биохемилюминометре БХЛ-07 (“Медозонс”, Россия) с программным обеспечением.

#### 4.2.3. Определение продукции супероксидного анион-радикала

Содержание супероксидного анион-радикала определяли по накоплению адренохрома, продукта взаимодействия супероксида с эпинефрином (адреналином) по методике [79] в нашей модификации. Навеску растительного материала (1,5 г) растирали в фарфоровой ступке с трис-НСl буфером (рН 7,8) в соотношении 1 : 4, фильтровали через несколько слоев марли и центрифугировали (15 мин, 8000 об/мин). Содержание супероксидного анион-радикала в ряде опытов определяли в полученном гомогенате. В других опытах использовали выделенные и очищенные фракции митохондрий, хлоропластов или цитоплазму. Для определения супероксидного анион-радикала в кювету вносили 0,6 мл 1 мМ адреналина и 0,1 мл исследуемой фракции. Через 15 мин экспозиции в темноте реакцию останавливали внесением 50 мкл 0,05 М НСl. Оптическую плотность растворов измеряли на спектрофотометре СФ-56 (“ЛОМО”, Россия) при длине волны 480 нм. Содержание супероксидного анион-радикала рассчитывали с учетом коэффициента экстинкции  $\epsilon = 4020 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

Использование данного метода для определения супероксидного анион-радикала было подтверждено в предварительных опытах с помощью

ингибирования реакции его образования в присутствии фермента супероксиддисмутазы. Было показано, что при внесении 70 или 170 единиц фермента СОД («Sigma», США) в пробу, содержащую адреналин и 0,1 мл растительной фракции, продукция супероксидного анион-радикала блокировалась на 80-95 % (рис. 2).

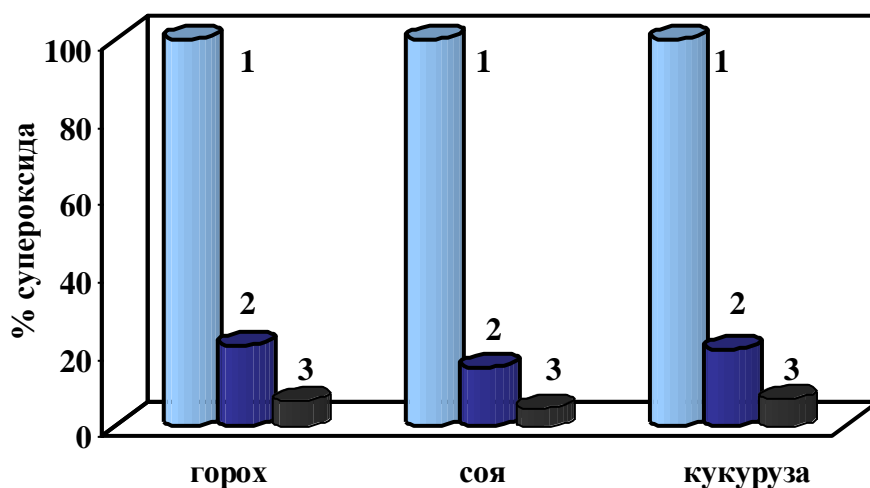


Рис. 2. Влияние СОД на продукцию супероксидного анион-радикала в модельном опыте.

1 – содержание супероксида без СОД; 2 – содержание супероксида в присутствии 70 ед. СОД; 3 – содержание супероксида в присутствии 170 ед. СОД

#### 4.2.4. Исследование образования гидропероксидов

Содержание гидропероксидов в тканях растений определяли, согласно методике [98] в нашей модификации. Навеску растительного материала (1,5 г) растирали в фарфоровой ступке с трис-НСI буфером (рН 7,8) в соотношении 1 : 4, фильтровали и центрифугировали (15 мин, 8000 об/мин). Надосадочную жидкость (гомогенат) использовали для определения гидропероксидов. К 2 мл полученного гомогената добавляли 50% раствор трихлоруксусной кислоты для осаждения белка, который удаляли центрифугированием. К 1 мл супернатанта последовательно добавляли: 5 мл

96% этанола, 0,2 мл концентрированной HCl, 0,012 мл 5% раствора соли Мора в 3% HCl и через 30 с 0,5 мл 20% раствора роданистого аммония. Через 10 мин определяли оптическую плотность на СФ-56 при 480 нм. Для расчета содержания гидропероксидов в тканях растений использовали калибровочную кривую, построенную для различных концентраций H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (рис. 3), и рассчитывали на мг белка.

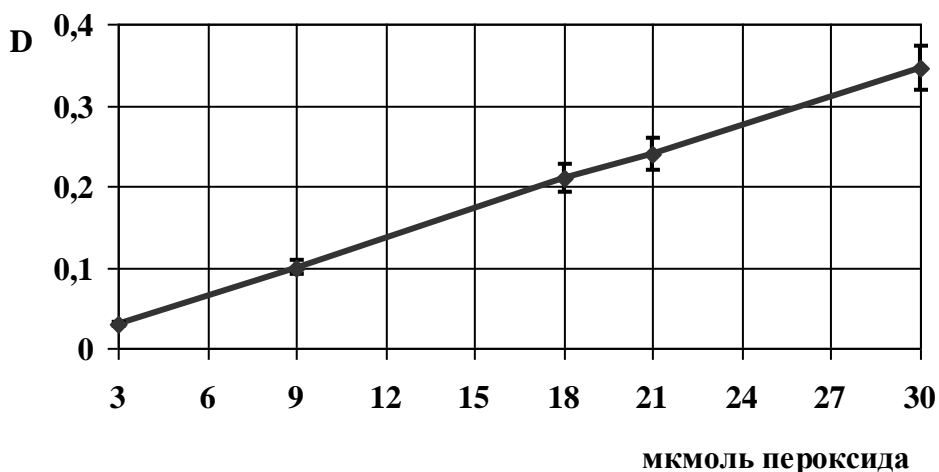


Рис. 3. Калибровочная кривая для расчета содержания гидропероксидов в растениях.

#### 4.2.5. Содержание пероксида водорода

Содержания пероксида водорода в исследуемых пробах определяли энзиматическим методом с использованием пероксидазы и *o*-дианизидина [3]. Для этого растительную навеску (1,5 г) растирали в ступке с 5% уксусной кислотой (1 : 4) с добавлением активированного угля. Гомогенат центрифугировали 5 мин при 8000 об/мин, затем доводили pH до 8,0 и снова центрифугировали. Супернатант использовали для определения содержания H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Реакционная среда содержала: 1 мкМ раствор пероксидазы хрена в 0,12 М Na-ацетатном буфере (pH 5,2), 0,5% водный раствор *o*-дианизидина и 0,1-0,2 мл супернатанта. Оптическую плотность измеряли при 460 нм. Для расчета содержания H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> использовали коэффициент экстинкции  $\epsilon = 11,3 \text{ M}^{-1}$



$l \cdot \text{cm}^{-1}$ . В случае определения содержания пероксида водорода в клеточных компартментах вносили 0,1-0,2 мл соответствующей клеточной фракции.

#### 4.2.6. Определение активности липоксигеназы

Активность липоксигеназы определяли спектрофотометрическим методом, используя в качестве субстрата линолевую кислоту по методике [2] в нашей модификации. Растительную навеску (1,5-2 г) растирали в ступке с 0,05М К-фосфатным буфером pH 7,0, содержащим 1% поливинилпирролидон, 1% Тритон X-100 и 0,04% метабисульфит натрия, фильтровали и центрифугировали (15 мин, 8000 об/мин). Полученный супернатант использовали для определения активности фермента. Для этого готовили стандартный раствор субстрата, содержащий 0,03 мл 99% линолевой кислоты и 0,1 мл Твин-20 в 20 мл 0,05 М К-фосфатного буфера (pH 7,0). Для определения активности фермента смешивали 1 мл стандартного раствора и 2 мл К-фосфатного буфера (pH 7,0), вносили пробу объемом 0,1 мл и определяли изменение оптической плотности при 234 нм. Активность фермента рассчитывали с использованием коэффициента экстинкции ( $\epsilon = 25000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Активность липоксигеназы пересчитывали на мг белка, содержание которого определяли по Lowry. При определении активности фермента в клеточных компартментах (митохондриях, хлоропластах и цитоплазме) использовали ту же методику, при этом в среду инкубации вносили по 0,1 мл полученной фракции клеточных компартментов.

Все процедуры по выделению ферментов проводили при 4<sup>0</sup>С.

#### 4.2.7. Исследование активности антиоксидантных ферментов

##### 4.2.7.1. Определение активности супероксиддисмутазы

Активность фермента определяли спектрофотометрически по скорости окисления NADH в присутствии нитросинего тетразолия и феназинметасульфата по методике [85] в нашей модификации. Для этого

растительную навеску (1,5-2 г) растирали с экстрагирующей средой, содержащей 150 мМ Na,K-фосфатный буфер pH 7,8, 1 мМ EDTA и 1% ПВП, фильтровали и центрифугировали (15 мин, 8000 об/мин). Полученный супернатант использовали для определения активности фермента. Реакционная среда для определения активности СОД содержала: 3,5 мл 150 мМ Na,K-фосфатный буфер (pH 7,8), 0,1 мл 0,01 мМ EDTA, 0,1 мл 0,186 мМ ФМС, 0,1 мл 0,4 мМ нитросинего тетразолия и 0,1 мл 1 мМ NADH. В опытный образец вносили 0,1 мл пробы. Затем образцы инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре, и определяли содержание бисформаза на спектрофотометре СФ-56 при длине волны 560 нм. Активность фермента рассчитывали с использованием коэффициента экстинкции бисформаза ( $3,98 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ) и рассчитывали на мг белка. При определении активности фермента в клеточных компартментах (митохондриях, хлоропластах и цитоплазме) использовали ту же методику, при этом в среду инкубации вносили по 0,1 мл полученной фракции клеточных компартментов.

#### 4.2.7.2. Выделение каталазы, общей пероксидазы, аскорбатпероксидазы

Для выделения каталазы, а также общей пероксидазы и аскорбатпероксидазы использовали экстрагирующую среду, которая содержала: 50 мМ K-фосфатный буфер (pH 7,5), 1 мМ ЭДТА, 0,3% Тритон X-100, 1 мМ аскорбиновую кислоту [156]. После фильтрования и центрифугирования (15 мин, 8000 об/мин) в полученном супернатанте определяли активность данных ферментов.

#### 4.2.7.3. Исследование активности каталазы

Реакционная среда для определения активности каталазы содержала: 100 мМ K-фосфатного буфера (pH 7,0), 15 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  и 0,1 мл пробы. Реакцию начинали добавлением  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Изменение оптической плотности проводили при 240 нм и рассчитывали активность фермента с использованием коэффициент экстинкции  $\epsilon = 0.036 \text{ (мМ см)}^{-1}$  и выражали в единицах акт/мг белка.

#### 4.2.7.4. Определение активности общей пероксидазы

Активность общей пероксидазы определяли с использованием *o*-дианизидина по методике. Реакционная среда содержала: 50 мМ Na-ацетатный буфер (рН 5,2), 0,5 мМ *o*-дианизидина, 2 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и 0,1 мл пробы. Изменение оптической плотности проводили при 460 нм и рассчитывали активность с использованием коэффициента экстинкции  $\epsilon = 11,3 \text{ (мМ см)}^{-1}$ .

#### 4.2.7.5. Определение активности аскорбатпероксидазы

Активность аскорбатпероксидазы определяли в среде следующего состава: 50 мМ К-фосфатный буфер рН 7,0, 0,5 мМ аскорбат, 0,2 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Реакцию начинали добавлением 0,1 мл пробы. Изменение оптической плотности определяли при 290 нм. Активность фермента рассчитывали, используя коэффициент экстинкции  $\epsilon = 2,8 \text{ (мМ см)}^{-1}$  и выражали на мг белка.

#### 4.2.8. Выделение клеточных фракций

Клеточные фракции получали методом дифференциального центрифугирования [20] в нашей модификации. Растительную навеску гомогенизировали с пятикратным объемом 0,4 М раствора сахарозы в трис-НСl буфере, рН 7,8, содержащим 2 мМ раствор ЭТДА и 0,1% альбумин. Гомогенат фильтровали и центрифугировали при 1000 об/мин 10 мин. Далее супернатант центрифугировали при 8000 об/мин 7 мин. Полученный обогащенный хлоропластами осадок разрушали с помощью осмотического шока, инкубируя его в течение 3-5 мин в буфере. Для получения митохондриальной фракции надосадочную жидкость снова центрифугируют при более высокой скорости – 14500 об/мин в течение 15 минут. Образовавшийся осадок митохондрий промывался буфером с сахарозой и повторно центрифугировался при 14500 об/мин.

#### 4.2.9. Определение активности маркерного фермента

##### сукцинатдегидрогеназы

Сукцинатдегидрогеназа (СДГ) является маркерным ферментом, используемым для определения чистоты фракций митохондрий. Метод основан на восстановлении дихлорфенолиндофенол в присутствии ФМС при

ферментативном окислении сукцината [152]. Среда определения активности СДГ содержала: 30 мМ К-фосфатный буфер pH 7,8; 0,033% ФМС, 0,002% дихлорфенолиндофенол; 2 мМ азид натрия, сукцинат натрия и 0,1 мл клеточной фракции митохондрий, полученной методом дифференциального центрифугирования. Контролем ему служила среда без сукцината натрия. Измеряли снижение оптической плотности при длине волны 600 нм на СФ-56. Для расчета активности использовали коэффициент экстинкции  $20 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  и рассчитывали на мг белка.

#### 4.2.10. Определение содержания хлорофилла в клеточных фракциях

Для определения чистоты выделенных фракций хлоропластов исследовали содержание хлорофилла, используя методику [30]. Хлорофилл извлекали из клеточной фракции с помощью 96% этанола и определяли оптическую плотность на СФ-56 при 652 нм. Содержание пигментов рассчитывали по формуле:

$$C_{(a+b)} = 25,1 \cdot D_{652}$$

#### 4.2.11. Электрофоретическое определение присутствия липоксигеназы в клеточных компартментах

Электрофоретическое определение липоксигеназы проводили методом вертикального электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) по Дэвису [32]. Для концентрирования белковых растворов применяли крупнопористый 2,0 % ПААГ; для разделения – мелкопористый – 7,5 % гель. Для выявления зон локализации молекулярных форм липоксигеназ использовали метод Хейдека [178]. Данный метод основан на образовании йод-крахмального комплекса в присутствии йодистого калия и гидроперекисей линолевой кислоты. С этой целью перед началом полимеризации в нижний ПААГ вносили растворимый крахмал («Медлекс», Россия) до конечной концентрации 1%. В ячейки геля вносили анализируемые фракции

митохондрий, хлоропластов и цитоплазмы в объеме 50 мкл (не более 200 мкг белка). В качестве маркера электрофоретического фронта использовали краситель бромфеноловый синий. Сила тока при прохождении белковых образцов составляла не более 12 мА. В качестве маркерных белков использовали каталазу и альбумин бычий сывороточный («Sigma», США). Электрофорез проводили в камере для вертикального электрофореза белков при температуре 0...+4<sup>0</sup>С в течение 2-3 часов.

После окончания электрофореза пластинки геля разрезались на части. На одной находились маркерные ферменты, которые проявлялись с помощью кумасси R-250. Оставшуюся часть электрофоретической пластинки для определения присутствия липоксигеназы помещали на 30 мин в раствор, содержащий 0,5% линолевую кислоту в 0,1 М трис-НСl-буфере, рН 6,8. Линолевую кислоту предварительно растворяли в буфере в течение 40 минут. Затем оставшуюся часть пластинки геля тщательно отмывали дистиллированной водой и помещали в проявляющую смесь, состоящую из 100 мл 7% уксусной кислоты и 5 мл свежеприготовленного 0,1 М раствора йодистого калия. Специфическая окраска гелей проявляется через 15-20 мин в виде коричневых пятен на желтом фоне. Окраска пластинок геля является нестабильной, поэтому результаты электрофоретического разделения сразу переводились в цифровой формат.

#### 4.2.12. Определение количества белка

Содержание белка во всех пробах определяли с помощью метода Lowry [232] при длине волны 750 нм. Метод основан на образовании комплексного окрашенного соединения, сочетает в себе биуретовую реакцию и реакцию Фолина (на тирозин и триптофан).

#### 4.2.13. Статистическая обработка результатов

Все определения проводили в двух биологических и двух аналитических повторностях. В таблицах и на графиках представлены данные одного из типичных опытов в виде средних арифметических значение и их стандартных отклонений.

## ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ РАЗНЫХ ГАЗОВЫХ СРЕД НА ПРОЦЕССЫ ОБРАЗОВАНИЯ АФК В РАСТЕНИЯХ

### 5.1. Исследование скорости свободнорадикального окисления в растениях в условиях гипоксии и $\text{CO}_2$ — среды

Ранее было обнаружено [54, 56], что интенсивность свободнорадикального окисления в клетках может отражать скорость процессов перекисного окисления их липидов.

Для изучения процессов свободнорадикального окисления в биологических и химических системах используют метод железо-индуцированной хемилюминесценции [14]. Метод основан на каталитическом разложении пероксида водорода ионами  $\text{Fe}^{2+}$  по реакции Фентона. В отличие от метода ЭПР, показатели хемилюминесценции не зависят от природы радикалов, поэтому регистрируются даже самые активные радикалы. Наиболее распространенные реакции, сопровождаемые хемилюминесценцией, – это реакции перекисного окисления липидов. При этом в биологических системах отмечают быструю вспышку свечения ( $I_{\text{max}}$ ), которая затем переходит в стационарное состояние, а затем и медленное свечение (светосумма,  $S$ ). Интенсивность свечения и показывает концентрацию свободных радикалов в системе, при этом, чем выше интенсивность свечения, тем больше радикалов обнаружено и тем интенсивнее протекают реакции окисления в клетках.

В опытах исследовали влияние условий кратковременной гипоксии и  $\text{CO}_2$  - среды на процессы свободнорадикального окисления в различных растениях. При этом регистрировали следующие показатели: интенсивность максимальной фотовспышки –  $I_{\text{max}}$ , светосумму медленной вспышки –  $S$ , и рассчитывали коэффициент  $k$ , показывающий отношение  $I_{\text{max}}/S$ . Данные опытов, приведенные в таблице 1 показали, что интенсивность процессов свободнорадикального окисления была значительно выше в клетках менее устойчивых проростков гороха, чем у более устойчивых растений сои и

кукурузы. Об этом свидетельствовали более высокие показатели  $I_{\max}$ . В условиях гипоксии в проростках гороха скорость этих процессов возрастала при всех сроках экспонирования на 20–25%. У более устойчивых проростков сои такое увеличение  $I_{\max}$  было отмечено только в первые 3–6 ч действия гипоксии. Однако затем эти процессы тормозились, о чем свидетельствовало снижение величины  $k$  до контрольного уровня. В клетках проростков кукурузы в условиях гипоксии показатели  $I_{\max}$ ,  $S$  были выше уровня контроля, но только в первые часы опыта, как и у проростков сои. Далее интенсивность процессов свободнорадикального окисления в клетках этих растений снижалась и оставалась до конца опыта на уровне аэрируемого контроля.

Высокие концентрации  $CO_2$  вызывали такое же значительное повышение скорости процессов свободнорадикального окисления в клетках растений, как и гипоксия, но в разной степени. Величина  $I_{\max}$  возрастала через 6 часов действия  $CO_2$  – среды на 30% в проростках гороха и на 45% в проростках сои. В клетках растений кукурузы среда  $CO_2$  не вызывала повышение скорости процессов свободнорадикального окисления в этот период. В первые 3 часа опыта показатели  $I_{\max}$  и  $S$  в тканях проростков кукурузы были на 21-30% выше уровня контроля. Однако к концу опыта данные показатели снижались во всех исследуемых растениях. В растениях гороха и сои они падали практически до уровня аэрируемого контроля. В клетках же проростков кукурузы показатели интенсивности процессов свободнорадикального окисления снижались еще более значительно и к концу опыта были на 20-26% ниже уровня аэрируемых растений. Коэффициент  $k$  при этом возрастал более значительно при всех сроках  $CO_2$  в растениях гороха, особенно через 6 часов действия. В проростках сои данный показатель в первые 6 часов опыта оставался на уровне контроля и лишь незначительно увеличивался к концу опыта.

Таблица 1

Показатели свободнорадикального окисления в тканях проростков гороха, сои и кукурузы  
при действии гипоксии и CO<sub>2</sub> среды

Показатель	Экспозиция, ч								
	3			6			24		
	горох	соя	кукуруза	горох	соя	кукуруза	горох	соя	кукуруза
<b>воздух (контроль)</b>									
I <sub>max</sub> , mV	265,7 ± 9,09 (100%)	139,0 ± 12,7 (100%)	127,7 ± 9,6 (100%)	265,7 ± 49,0 (100%)	110,7 ± 13,7 (100%)	205,4 ± 3,7 (100%)	265,7 ± 49,0 (100%)	129,0 ± 14,2 (100%)	184,5 ± 27,5 (100%)
S, mV*с	2052,9 ± 203,6 (100%)	1246,2 ± 17,2 (100%)	1222,2 ± 76,8 (100%)	2052,9 ± 203,6 (100%)	963,0 ± 55,8 (100%)	1734,8 ± 55,8 (100%)	2052,9 ± 203,6 (100%)	1100,0 ± 119,0 (100%)	1578,9 ± 119,1 (100%)
k	0,13 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01
<b>гипоксия</b>									
I <sub>max</sub> , mV	335,5 ± 13,8 (126%)	199,0 ± 11,3 (143%)	210,7 ± 11,3 (165%)	319,5 ± 9,8 (120%)	180,0 ± 12,0 (163%)	214,5 ± 29,5 (104%)	332,2 ± 31,5 (125%)	150,7 ± 11,7 (117%)	208,2 ± 16,5 (113%)
S, mV*с	2074,7 ± 71,0 (101%)	1745,0 ± 120,9 (140%)	1900,9 ± 45,1 (155%)	1895,5 ± 110,2 (92%)	1329,2 ± 120,2 (138%)	1837,7 ± 212,4 (106%)	2033,3 ± 152,0 (99%)	1335,9 ± 48,9 (121%)	1665,2 ± 164,5 (105%)
k	0,16 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,13 ± 0,01
<b>CO<sub>2</sub> – среда</b>									
I <sub>max</sub> , mV	280,5 ± 6,8 (106%)	173,7 ± 5,6 (125%)	166,1 ± 7,2 (130%)	350,2 ± 5,1 (131%)	163,8 ± 3,3 (145%)	183,7 ± 21,1 (89%)	280,0 ± 15,7 (106%)	149,2 ± 10,9 (116%)	136,3 ± 28,0 (74%)
S, mV*с	1969,0 ± 90,7 (96%)	1648,9 ± 134,0 (132%)	1480,9 ± 88,1 (121%)	2104,8 ± 172,3 (103%)	1510,2 ± 56,9 (157%)	1355,2 ± 215,5 (78%)	1742,8 ± 151,5 (84%)	1221,4 ± 192,1 (111%)	1214,7 ± 172,0 (77%)
k	0,14 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,01



В растениях же кукурузы этот показатель возрастал в условиях гипоксии на протяжении опыта, а в условиях  $\text{CO}_2$  – среды после повышения к концу опыта возвращался до уровня контроля. Данные изменения показателей хемилюминесценции указывают на более интенсивные процессы свободнорадикального окисления в тканях неустойчивых к гипоксии проростков гороха в условиях дефицита кислорода, в отличие от среднеустойчивых растений сои и кукурузы.

Полученные результаты совпадают с данными, приведенными в работе [54], где отмечено увеличение содержания МДА, одного из продуктов перекисидации липидов, в условиях почвенной гипоксии в корнях растений.

Подобное повышение процессов перекисидации липидов было обнаружено и в растениях яблони при гипоксическом стрессе [242]. В тоже время скорость процессов ПОЛ зависела и от степени устойчивости растений к действию стрессового фактора [35]. Так у неустойчивых проростков гороха происходила активация процессов перекисидации липидов, а у более устойчивых проростков кукурузы – торможение процессов ПОЛ в условиях дефицита кислорода. Показано [56], что на ранних стадиях гипоксического стресса в растениях рапса интенсивность процессов перекисидации удерживалась на более низком уровне, но со временем начинала существенно возрастать. В тоже время в других работах [112, 140, 154, 182] отмечено, что процессы перекисидации липидов, происходящие при гипо- и аноксии, значительно увеличиваются в постаноксический период. Однако полученные нами данные по исследованию скорости свободнорадикального окисления методом хемилюминесценции показали, что именно у неустойчивых растений эти процессы протекали в условиях гипоксии более интенсивно, чем у более устойчивых проростков сои и кукурузы. С течением времени у этих растений отмечалась нормализация интенсивности процессов свободнорадикального окисления при гипоксическом стрессе, что вероятно свидетельствует о большей активности антиоксидантных ферментов в их клетках, или о повышении содержания в них низкомолекулярных

антиоксидантов. При этом действие  $\text{CO}_2$  – среды отличалось от условий обычной гипоксии, что ранее уже отмечалось для различных процессов в клетках, включая скорость пероксидации липидов [35] и активность ферментов цикла трикарбоновых кислот [33].

## 5.2. Действие гипоксии и $\text{CO}_2$ — среды на образование различных типов АФК в клетках растений

Как известно [4], при неполном одноэлектронном восстановлении кислорода возможно образование супероксидного анион-радикала, являющегося источником других типов АФК в клетках растений. Было показано, что в условиях дефицита кислорода возможно изменение содержания отдельных типов АФК [123, 242]. Это можно отнести к одним из ранних клеточных ответов при действии данного стрессового фактора на растения [96].

В связи с этим в дальнейших опытах изучали влияние кратковременной (до суток) гипоксии и  $\text{CO}_2$  - среды на образование супероксидного анион-радикала в клетках растений, которые отличаются устойчивостью к условиям дефицита кислорода. В опытах использовали те же растения: неустойчивые – проростки гороха и среднеустойчивые – проростки сои и кукурузы, которые подвергали действию разных газовых сред.

Как видно из полученных результатов (рис. 4, приложение табл. 1) в тканях проростков растений гороха содержание супероксидного анион-радикала в разных газовых средах значительно менялось. В первые три часа действия гипоксии количество супероксидного анион-радикала увеличилось на 23 % и далее оставалось на том же уровне до конца опыта.

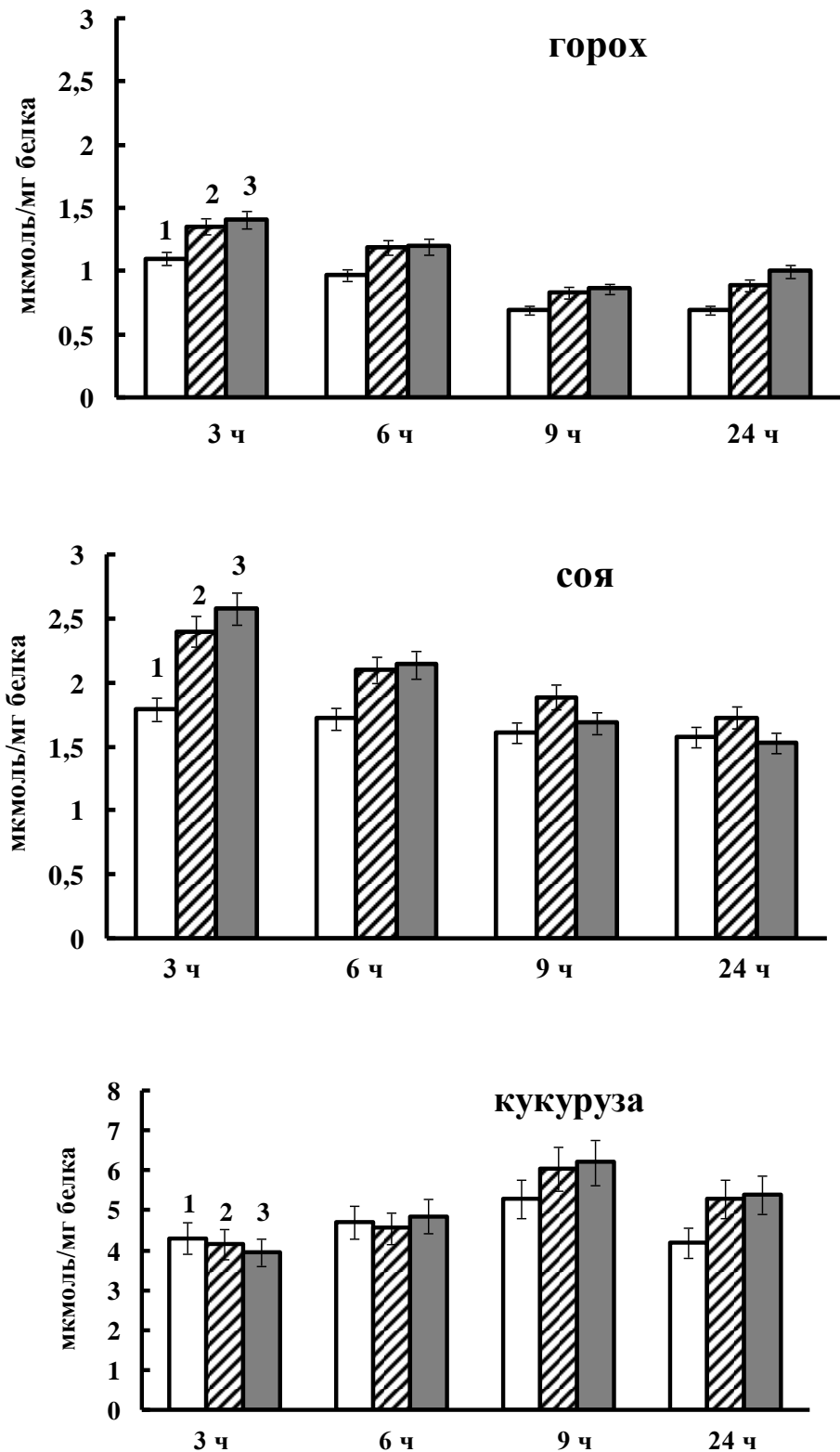


Рис. 4. Содержание супероксидного анион-радикала в тканях гороха, сои и кукурузы при действии гипоксии и  $\text{CO}_2$  – среды (1 – контроль, 2 – гипоксия, 3 –  $\text{CO}_2$ -среда)

При действии высоких концентраций  $\text{CO}_2$  – среды образование супероксидных анион-радикалов в тканях этого растения было еще более значительным. В первые 3 часа опыта содержание супероксида увеличилось на 27% и к концу опыта оно было уже на 45% выше, чем в клетках аэрируемых растений. У более устойчивых растений сои в начале действия гипоксии и  $\text{CO}_2$  – среды содержание супероксида возрастало до 134-144 % от аэрируемого контроля. Но в дальнейшем оно начинало снижаться. Особенно значительно это происходило у проростков гороха, находящихся в  $\text{CO}_2$  – среде. К 24 часам экспозиции содержание супероксидного анион-радикала в их клетках в условиях гипоксии лишь немного превышало уровень аэрируемых растений, а в среде диоксида углерода была даже ниже контрольного уровня. В тканях среднеустойчивых растений кукурузы вообще не наблюдали накопления данного типа АФК в первые 3-6 часов действия газовых сред. Только через 9 часов действия гипоксии и  $\text{CO}_2$  – среды, происходило небольшое повышение содержания супероксида, которое сохранялось и до конца опыта.

Таким образом, проведенные исследования показали, что при дефиците кислорода накопление супероксидного анион-радикала в растениях гороха происходило во все периоды экспозиции. У сои содержание АФК к концу экспозиции снижалось до уровня аэрируемых растений. В проростках кукурузы большую часть опыта уровень супероксида не превышал контроля, и только к концу опыта происходило некоторое увеличение его содержания.

Результаты наших исследований совпадают с данными для растений яблони [242], у которой также было показано значительное увеличение содержания супероксидных анион-радикалов при гипоксическом стрессе, но только при более длительных сроках гипоксии. Как известно [108], при протонировании супероксидного анион-радикала в клетках растений могут возникать гидропероксидные радикалы, являющиеся наиболее сильными окислителями из рассматриваемых типов АФК. В связи с этим в дальнейших исследованиях мы провели определение влияния газовых сред на содержание

гидропероксидов в клетках разных растений. Было обнаружено, что в условиях дефицита кислорода у исследуемых растений содержание гидропероксидов менялось более существенно, чем супероксидных анион-радикалов (рис. 5, приложение табл. 2). Так, в первые 3 часа действия гипоксии содержание гидропероксидов в тканях растений гороха оставалось близким к контролю. Однако с увеличением сроков экспозиции отмечалось их значительное накопление. К концу опыта количество гидропероксидов возросло до 163% по сравнению с аэрируемыми растениями гороха. В то же время при действии  $\text{CO}_2$  – среды содержание гидропероксидов в растениях гороха изменялось более значительно. Даже трехчасовое действия высоких концентраций диоксида углерода вызвало такое же увеличение содержания гидропероксидов в тканях этих растений, как и условия 9-часовой гипоксии. В первые часы действия среды  $\text{CO}_2$  содержание гидропероксидов в тканях проростков гороха возросло на 35%. К концу же опыта содержание гидропероксидов было уже выше уровня контрольных растений на 77%.

В тканях более устойчивых растений сои в первые три часа опыта концентрация гидропероксидов была близкой к норме, а к 9 часам даже снижалась на 30% по отношению к контрольному уровню. При действии среды высоких концентраций углекислого газа в растениях сои содержание гидропероксидов было ниже уровня контроля в первые часы опыта, но к концу экспозиции несколько возрастало.

У проростков кукурузы в первые 3 часа опыта отмечали увеличение содержания гидропероксидов на 35% при действии гипоксии и на 20% в  $\text{CO}_2$  – среде. Но при увеличении сроков экспозиции происходило снижение уровня данного типа АФК до контрольных значений. К концу опыта содержание гидропероксидов в тканях проростков кукурузы при действии гипоксии было ниже уровня аэрируемых растений, а при действии  $\text{CO}_2$  – среды несколько превышала его.

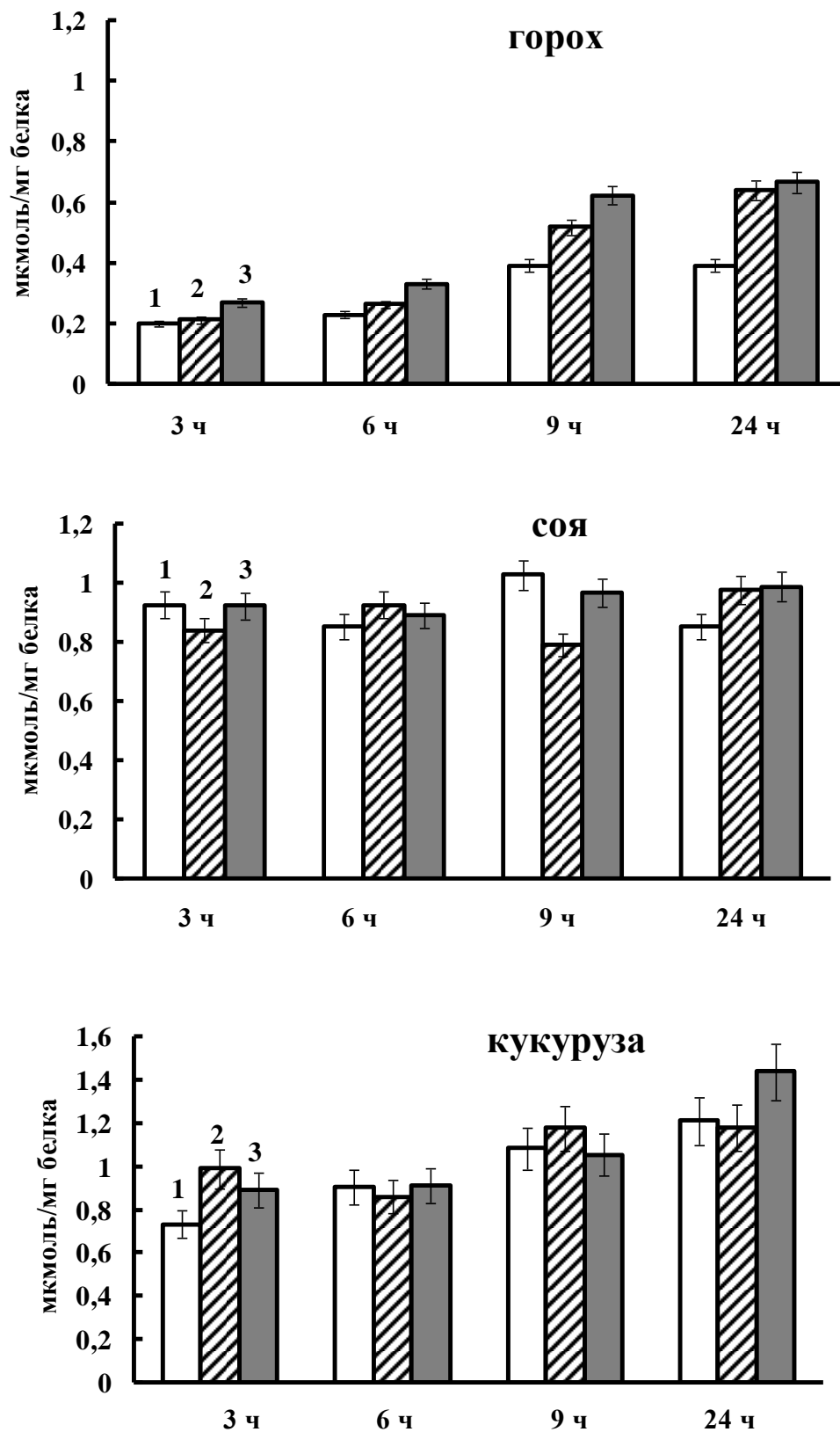


Рис. 5. Содержание гидропероксидов в растениях при действии гипоксии и CO<sub>2</sub> – среды (1 – контроль, 2 – гипоксия, 3 – CO<sub>2</sub>-среда)

Таким образом, проведенные нами исследования показали, что несмотря на более высокое исходное содержание гидропероксидных радикалов в тканях растений сои и кукурузы по сравнению с неустойчивыми проростками гороха, нами не было обнаружено существенного накопления данной АФК у этих растений в условиях кратковременной (до суток) гипоксии и  $\text{CO}_2$  – среды. В растениях же гороха оно возросло к концу опыта в 1,7 раза.

Как известно [60], наиболее стабильной и долгоживущей формой АФК в тканях растений является пероксид водорода, образующийся в результате двухэлектронного восстановления молекулы кислорода или при дисмутации супероксидного анион-радикала. В связи с этим, в дальнейших опытах мы исследовали влияние условий гипоксии и  $\text{CO}_2$  – среды на процессы образования пероксида водорода в тканях исследуемых растений, которые различаются степенью устойчивости к дефициту кислорода.

При определении содержания пероксида водорода (рис. 6, приложение табл. 3) в проростках гороха было обнаружено, что в первые 3 часа действия газовых сред его количество возросло почти в 2 раза, и в условиях среды  $\text{CO}_2$  - в 2,3 раза по отношению к уровню контрольных растений. В последующие часы опыта значительного изменения содержания пероксида водорода в анализируемых газовых средах не происходило. К концу опыта (24 часа) в условиях гипоксии количество пероксида водорода составило 183% от уровня аэрируемых растений. Еще более значительное накопление данного типа АФК происходило в тканях этого растения в условиях высоких концентраций углекислого газа, где оно возросло более чем в 4 раза к концу экспозиции. Нужно отметить, что в растениях сои и кукурузы, в отличие от неустойчивых проростков гороха, не происходило такого значительного накопления пероксида водорода. В первые часы опыта количество пероксида водорода в тканях этих растений было близким к аэрируемым проросткам или даже ниже (особенно у кукурузы).

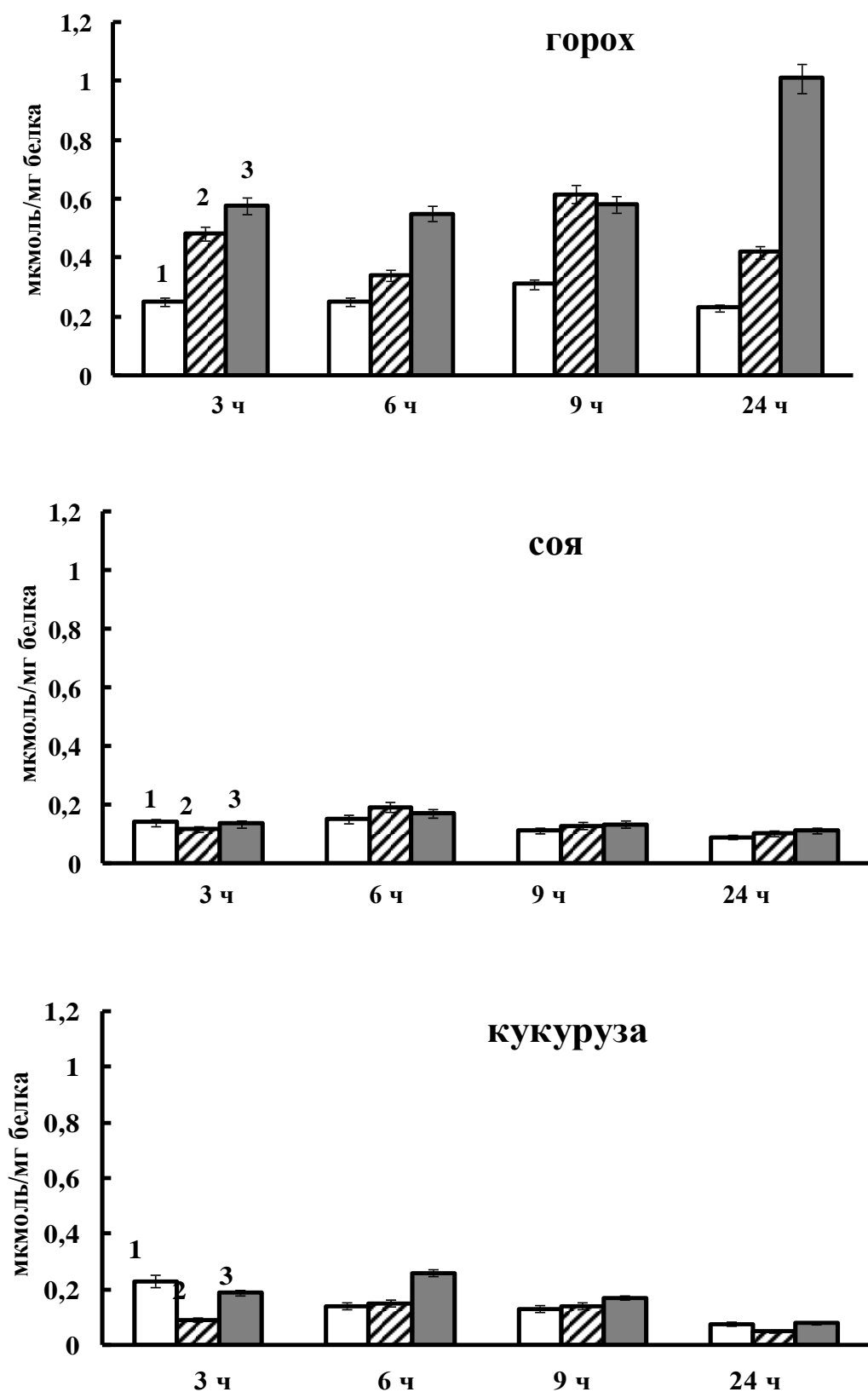


Рис. 6. Содержание пероксида водорода в растениях при действии гипоксии и CO<sub>2</sub> – среды (1 – контроль, 2 – гипоксия, 3 – CO<sub>2</sub>-среда)



С увеличением сроков экспозиций в условиях гипоксии и  $\text{CO}_2$  – среды не отмечалось резкого увеличения продукции пероксида водорода в тканях проростков как сои, так и кукурузы. К концу опыта в тканях этих растений в условиях гипоксии содержание пероксида водорода было близким к контролю, а в условиях действия высоких концентраций углекислого газа незначительно превышало эту величину.

Полученные нами данные согласуются с имеющимися в литературе сведениями об изменении содержания пероксида водорода в других растениях, находящихся в условиях гипоксического стресса. Было показано значительное накопление пероксида водорода в листьях [53] и корнях растений ячменя [54], а также в корнях пшеницы в условиях почвенной гипоксии [165]. Обнаружено и значительное увеличение содержания пероксида водорода в растениях яблони при действии гипоксического стресса [242]. Усиление образования данного типа АФК было обнаружено у растений, как при гипоксии, но особенно оно увеличивалось при возвращении их в условия аэрации [140]. Однако в других работах [74] отмечалось накопление пероксида водорода при действии почвенной гипоксии в растениях ячменя, но при их возвращении на воздух происходило снижение его содержания до уровня контроля.

### 5.3. Влияние гипоксии и $\text{CO}_2$ — среды на активность липоксигеназы в растениях

Как известно [105], одним из путей образования различных типов АФК в клетках растений наряду с неферментативным может быть и ферментативный путь, связанный с работой липоксигеназы. При этом липоксигеназа, окисляя полиненасыщенные жирные кислоты до гидропероксидов, может вносить существенный вклад в процесс их накопления [2, 201]. Было обнаружено [187], что активность фермента липоксигеназы возрастала в клетках листьев картофеля и в условиях аноксии. Однако эти данные единичны и для других растений подобных исследований

определения роли липоксигеназного пути образования АФК в условиях гипоксии не проводились. В связи с этим нами были проведены исследования по влиянию условий кратковременной гипоксии и среды высоких концентраций диоксида углерода на активность липоксигеназы в проростках гороха, сои и кукурузы.

В результате проведенных опытов было обнаружено (рис. 7), что активность липоксигеназы в тканях растений гороха, неустойчивых к гипоксии, в первые часы опыта возрастала на 40 %. При действии среды высоких концентраций диоксида углерода активность фермента возрастала лишь на 20 %. С увеличением сроков экспозиции до 6 – 9 часов в условиях разных газовых сред активность липоксигеназы в растениях начинала снижаться, и через 6 часов упала на 20 % у растений при гипоксии и на 12 % в условиях  $\text{CO}_2$  - среды. К концу опыта (24 часа) активность липоксигеназы в тканях данного растения снижалась в 3 раза в условиях гипоксии, и практически в 6 раз в среде  $\text{CO}_2$ , становясь ниже, чем у контрольных аэрируемых проростков.

В клетках среднеустойчивых растений сои наблюдалась другая тенденция. Активность липоксигеназы у растений в условиях гипоксии в первые 3 – 6 часов опыта существенно превышала уровень контрольных растений (в 1,6 раза), в условиях же  $\text{CO}_2$  – среды становилась выше контроля на 72%. При увеличении сроков экспозиции проростков сои как в условиях гипоксии, так и в среде диоксида углерода, активность фермента постепенно снижалась до уровня контрольных растений. К 9 часам опыта активность липоксигеназы в проростках сои была близкой к контрольному варианту, в отличие от растений гороха, в которых активность фермента к концу опыта резко падала как при действии гипоксии, так и в среде высоких концентраций диоксида углерода.

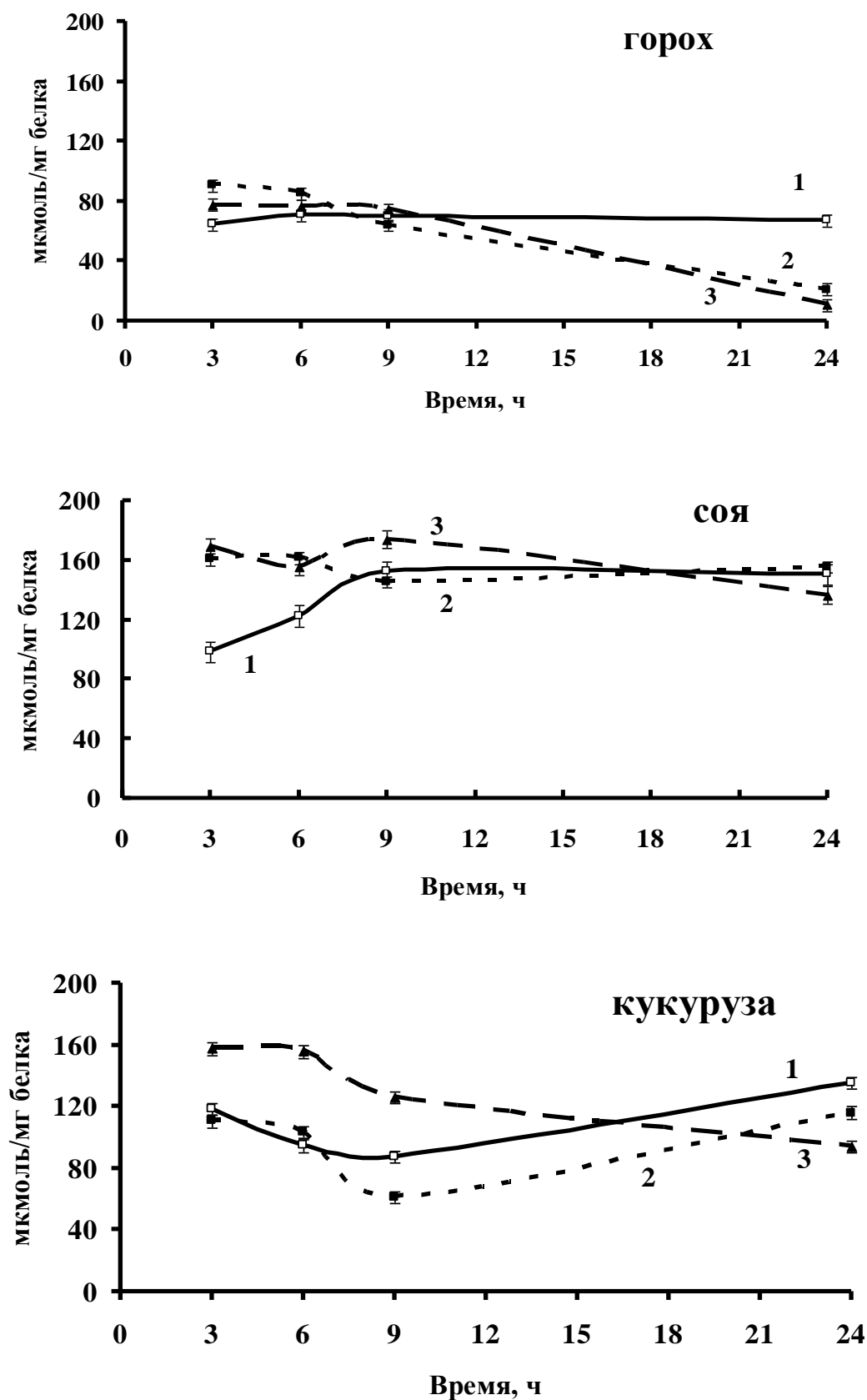


Рис. 7. Активность липоксигеназы в растениях в условиях гипоксии и CO<sub>2</sub> – среды (1 – контроль, 2 – гипоксия, 3 – CO<sub>2</sub>-среда)

В растениях кукурузы в условиях гипоксического стресса активность фермента была ниже уровня контрольных растений на протяжении практически всего опыта. В тоже время у растений, находящихся в  $\text{CO}_2$  – среде активность липоксигеназы сначала возрастала на 65%, но затем к 24 часам резко падала, становясь ниже уровня аэрируемых растений.

Таким образом, проведенные исследования показали, что в тканях неустойчивых проростков гороха после небольшого повышения происходило значительное снижение активности липоксигеназы. В то же время у более устойчивых проростков сои и кукурузы активность фермента после некоторого возрастания, сохранялась близкой к контролю.

Полученные данные свидетельствуют о том, что липоксигеназный путь накопления АФК мог быть одинаково эффективным как у неустойчивых растений гороха, так и у более устойчивых растений сои и кукурузы, но только в первые часы действия условий гипоксии и  $\text{CO}_2$  – среды. С увеличением сроков экспозиции этот путь образования АФК в клетках растений гороха тормозился, и тогда, вероятно, начинали включаться другие механизмы их накопления, о чем свидетельствует значительное повышение содержания гидропероксидов к 9 и 24 часам в клетках данного растения (рис. 4). Ранее участие липоксигеназного пути в процессах накопления АФК при гипоксии подвергались сомнению. Это связано с тем, что для липоксигеназ (КФ 1.13.11.12), как и всех диоксигеназ, для процесса окисления полиненасыщенных жирных кислот необходимо участие кислорода, содержание которого в клетках растений при гипоксии резко снижается [27]. Однако в клетках клубней картофеля в условиях аноксии также было обнаружено как увеличение активности липоксигеназы, так и содержание ее м-РНК [187]. Как известно [201], липоксигеназы окисляют не только свободные, но и связанные жирные кислоты различных липидов, включая и фосфолипиды мембран. Более значительное снижение ненасыщенности фосфолипидов мембран митохондрий растений при действии среды  $\text{CO}_2$  было уже показано ранее [37, 47]. Полученные результаты подтверждают и

высказанное ранее предположение о специфическом действии данного компонента газовой среды на растения, включая изменение активности ферментов цикла трикарбоновых кислот [33] и ферментов конечных этапов брожения алкогольдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы [39].

## ГЛАВА 6. АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ ГИПОКСИИ И CO<sub>2</sub> – СРЕДЫ НА РАСТЕНИЯ

### 6.1. Изменение активности СОД у растений в условиях различных газовых сред

Известно, что фермент супероксиддисмутаза участвует в детоксикации АФК, образующихся в клетках растений [85], что позволяет контролировать их содержание в стрессовых условиях. Супероксиддисмутаза катализирует превращение супероксидного анион-радикала до пероксида водорода. В связи с этим данному ферменту отводится важная роль в защите клеток и тканей растений от окислительной деструкции [6, 199].

В литературе приводятся разноречивые данные по изменению активности СОД в растениях в условиях дефицита кислорода в среде. Так, в клетках устойчивого к аноксии вида ириса (*Iris pseudacorus*) активность СОД в условиях гипоксии возрастала, а у менее устойчивого растения манника (*Glyceria maxima*) наоборот, снижалась [215]. Показано [165], что в корнях пшеницы в условиях аноксии происходило повышение активности супероксиддисмутаза относительно общего содержания белка. Была установлена индукция активности СОД при действии длительной гипоксии в корнях и листьях ячменя [54, 74]. Гипоксический стресс вызывал повышение активности СОД у растений только в начальный период действия стрессового фактора, хотя позднее по мере инактивации активность фермента падала [56, 242]. В тоже время в других работах отмечено, что ни условия гипоксии, ни последующая реэрация не влияли на активность супероксиддисмутаза, однако аноксия приводила к увеличению общей активности фермента [165]. В клетках же устойчивых растений риса и ячменя в условиях аноксии вообще не отмечалось изменения активности фермента СОД [112]. В работе [53] было обнаружено даже резкое снижение активности фермента в условиях почвенной гипоксии в корнях растений ячменя. Такие разноречивые данные вызвали необходимость проведения исследований по выяснению влияния кратковременного дефицита кислорода (до суток) на

активность фермента супероксиддисмутазы в растениях с различной устойчивостью к данному фактору. При этом действие  $\text{CO}_2$  – среды ранее на активность данного фермента не изучалось.

В результате проведенных исследований было обнаружено (табл. 2), что активность фермента СОД в проростках гороха, сои и кукурузы при действии гипоксии имела различную величину. В проростках неустойчивого растения гороха активность СОД через 6 часов действия гипоксического стресса возрастала на 75 %, однако затем начинала снижаться, но оставалась выше контроля на 33 %. При действии среды высоких концентраций диоксида углерода на растения активность фермента возрастала в 1,5 раза, но только к 9 часам. Однако к концу опыта активность фермента снижалась практически до уровня контроля.

В тоже время в клетках среднеустойчивых проростков сои активность фермента СОД возрастала уже через три часа действия гипоксии в 1,5 раза, и далее продолжала повышаться, достигая 342 %, и оставалась достаточно значительной и до конца опыта. Под влиянием  $\text{CO}_2$  – среды у сои наблюдалось еще большее повышение активности данного фермента. Активность СОД возрастала в первые три часа до 163 %, а далее к девяти часам экспозиции увеличивалась в 4 раза по сравнению с аэрируемыми растениями. Вероятно такое повышение активности антиоксидантного фермента СОД в условиях гипоксии и  $\text{CO}_2$  – среды позволяло сдерживать в клетках среднеустойчивых проростков сои процессы образования АФК.

В клетках проростков кукурузы активность СОД возросла еще более значительно. Она почти в 6 раз превышала контроль уже в первые часы действия гипоксии, и затем постепенно снижалась.

Таблица 2

Влияние гипоксии и CO<sub>2</sub> – среды на активность фермента СОД в растениях

Вариант	3 ч		6 ч		9 ч		24 ч	
	Удельная активность (мкМоль/ мг белка)	%	Удельная активность (мкМоль/ мг белка)	%	Удельная активность (мкМоль/ мг белка)	%	Удельная активность (мкМоль/ мг белка)	%
горох								
контроль	0,084 ± 0,009	100	0,076 ± 0,013	100	0,102 ± 0,009	100	0,048 ± 0,005	100
гипоксия	0,098 ± 0,017	117	0,133 ± 0,012	175	0,143 ± 0,013	140	0,064 ± 0,006	133
CO <sub>2</sub> - среда	0,102 ± 0,010	121	0,087 ± 0,008	113	0,159 ± 0,009	156	0,053 ± 0,005	109
соя								
контроль	0,084 ± 0,016	100	0,042 ± 0,001	100	0,022 ± 0,002	100	0,027 ± 0,003	100
гипоксия	0,122 ± 0,013	145	0,108 ± 0,008	254	0,076 ± 0,006	342	0,061 ± 0,003	228
CO <sub>2</sub> - среда	0,137 ± 0,032	163	0,129 ± 0,013	305	0,087 ± 0,008	396	0,077 ± 0,004	288
кукуруза								
контроль	0,0048 ± 0,0001	100	0,0249 ± 0,007	100	0,013 ± 0,0001	100	0,019 ± 0,0003	100
гипоксия	0,028 ± 0,001	583	0,0458 ± 0,017	184	0,039 ± 0,007	304	0,021 ± 0,0012	111
CO <sub>2</sub> - среда	0,043 ± 0,007	896	0,0758 ± 0,01	304	0,043 ± 0,005	331	0,044 ± 0,002	232



В условиях  $\text{CO}_2$  – среды активность СОД достигала до 900 % у проростков по отношению к аэрируемым растениям. С увеличением сроков экспозиции активность фермента падала, но оставалась при этом вдвое выше, чем у аэрируемых растений.

Полученные нами данные по изменению активности СОД у исследуемых растений подтверждаются и результатами проведенных ранее исследований (приложение табл. 1-3), в которых был отмечен более низкий уровень накопления всех типов АФК в клетках более устойчивых проростков сои и кукурузы при действии гипоксии, чем у менее устойчивых проростков гороха. Это может указывать на наличие определенной корреляции между степенью устойчивости растений к гипоксии и активностью антиоксидантного фермента СОД, что ранее уже было отмечено и для разных сортов риса, отличающихся степенью устойчивости к затоплению [123]. Кроме этого в наших опытах было отмечено, что высокие концентрации  $\text{CO}_2$ , в отличие от обычной гипоксии, оказывали более существенное влияние на активность СОД у всех анализируемых растениях, что проявлялось в более значительном повышении активности данного фермента в их клетках. Полученные данные также подтверждают и ранее высказанное предположение [35, 40, 47] о том, что влияние диоксида углерода может включать его непосредственное воздействие на ферменты растений в роли аллостерического регулятора их активности, и это не связано со сдвигом рН цитоплазмы, как ранее предполагалось.

## 6.2. Влияние газовых сред на активность антиоксидантных ферментов каталазы, аскорбатпероксидазы и общей пероксидазы

Как известно [188], кроме супероксиддисмутазы в процессах детоксикации различных типов АФК в клетках растений может участвовать и целый ряд других антиоксидантных ферментов, таких как каталаза, пероксидаза, аскорбатпероксидаза. При этом даже предполагается [140], что повышение активности ферментов антиоксидантной защиты может быть

связано как раз с избыточным накоплением АФК в клетках растений, находящихся в условиях гипоксии. В ряде литературных источников [123] отмечено, что активность антиоксидантных ферментов как раз и зависит от степени устойчивости растений. Так, в клетках более устойчивых сортов риса в условиях гипоксии активность антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы, каталазы, аскорбатпероксидазы и пероксидазы была выше, чем у неустойчивых сортов. Было обнаружено и повышение активности ферментов каталазы и аскорбатпероксидазы в условиях гипоксического стресса в проростках ячменя [53]. Возрастание активности ферментов аскорбатпероксидазы и супероксиддисмутазы было характерно и для растений рапса при действии гипоксии, что, как предполагают, и сдерживало интенсивность процессов пероксидации липидов на ранних стадиях развития стресса [56]. Повышение активности основных антиоксидантных ферментов было отмечено в растениях кукурузы в условиях избыточного увлажнения почв [231] и в растениях нута при затоплении [264]. В клетках соевых бобов в условиях аноксии показано возрастание активности пероксидазы [120].

Таким образом, были обнаружены изменения активности антиоксидантных ферментов у растений, подвергнутых действию гипоксии, однако для условий кратковременной экспозиции (до 24 часов) такие исследования не проводились, а для растений гороха и сои вообще не ставились. В связи с этим, в дальнейших опытах нами были проведены исследования по определению активности ряда ферментов, таких как каталазы, аскорбатпероксидазы и общей пероксидазы, участвующих в детоксикации АФК, в исследуемых растениях при действии дефицита кислорода и среды высоких концентраций  $\text{CO}_2$  (рис. 8, 9).

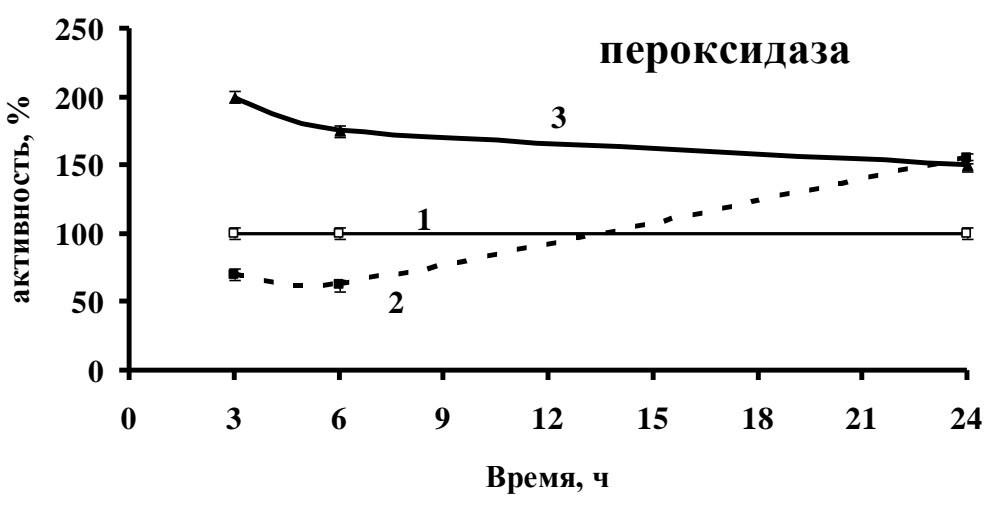
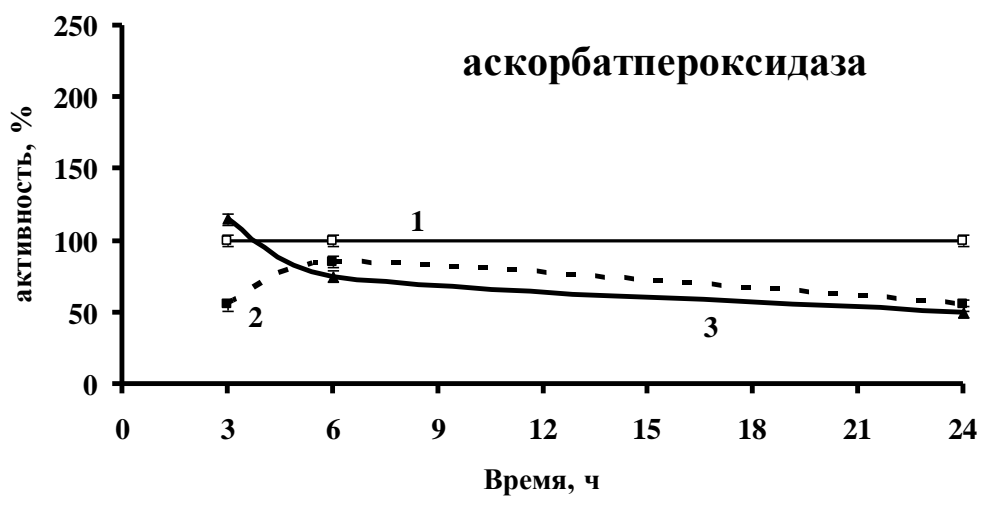
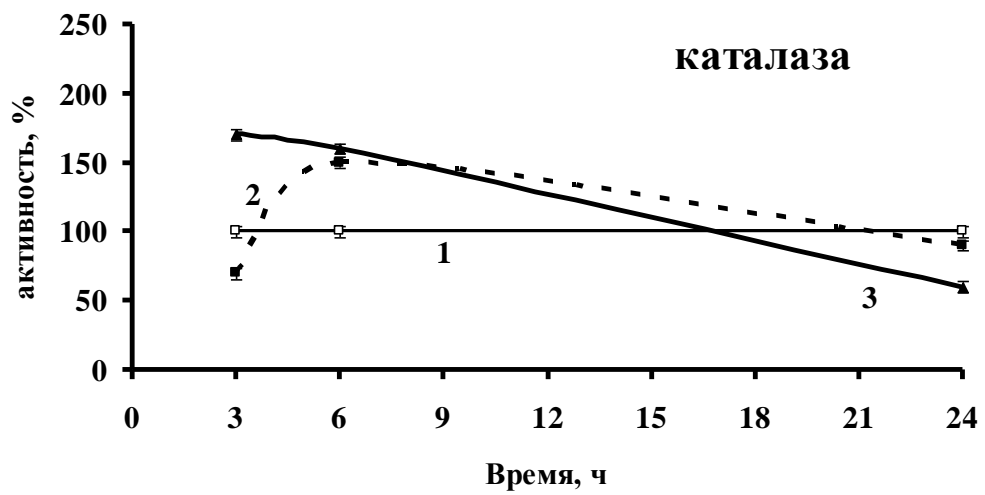


Рис. 8. Активность ферментов антиоксидантной системы клеток растений гороха при разных сроках действия гипоксии и CO<sub>2</sub> – среды (1 – контроль, 2 – гипоксия, 3 – CO<sub>2</sub>-среда)

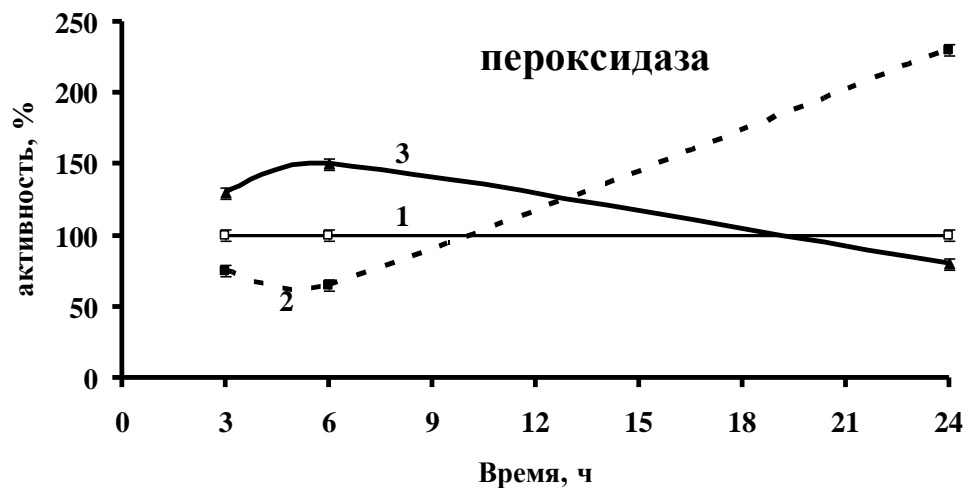
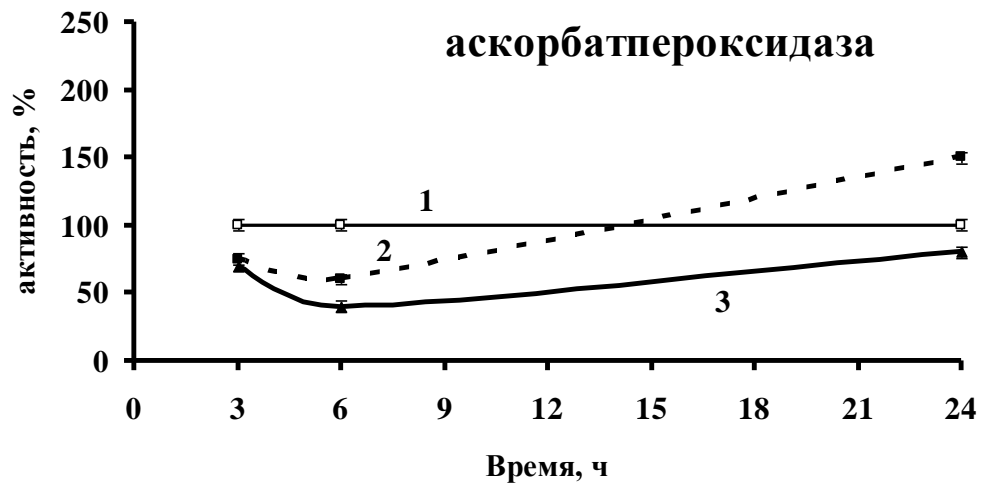
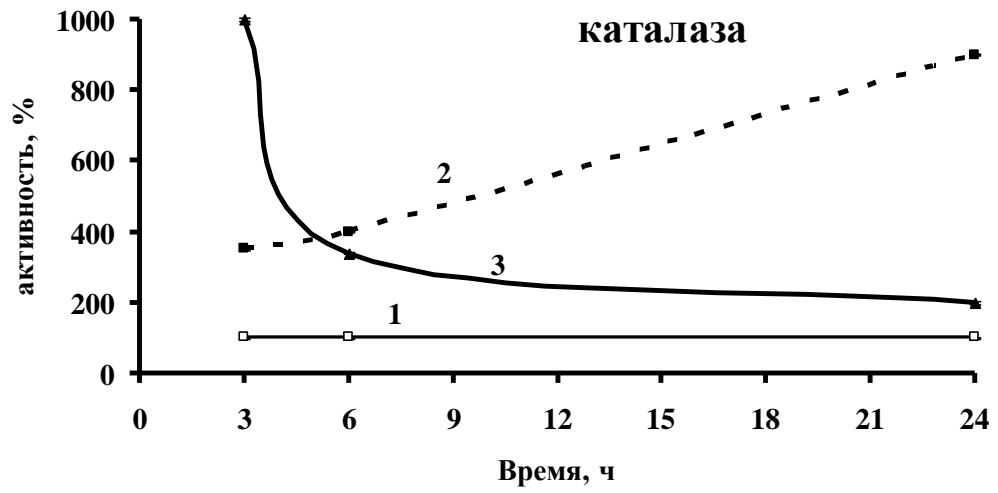


Рис. 9. Активность ферментов антиоксидантной системы клеток растений сои при действии гипоксии и CO<sub>2</sub> – среды (1 – контроль, 2 – гипоксия, 3 – CO<sub>2</sub>-среда)

Как видно из полученных результатов исследования, активность каталазы в проростках сои, обладающих средней устойчивостью к гипоксии, возрастала уже в первые часы действия гипоксического стресса в 3 раза. К концу опыта активность фермента в проростках сои почти в 10 раз превышала уровень контрольных растений. В то же время, при действии высокой концентрации  $\text{CO}_2$  уже в самые первые часы экспозиции в клетках проростков сои отмечали почти 10-кратное увеличение активности данного фермента. К концу опыта активность каталазы снижалась, но все еще оставалась выше, чем в контрольных проростках еще в 2,5 раза. У проростков гороха, относящихся к растениям, неустойчивым к дефициту кислорода, активность каталазы повышалась менее значительно и только в среде с высоким содержанием  $\text{CO}_2$ . В условиях обычной гипоксии активность каталазы в клетках проростков гороха после некоторого повышения падала и к концу опыта была даже ниже, чем в аэрируемых растениях.

Активность аскорбатпероксидазы и общей пероксидазы у исследуемых растений менялась в меньшей степени. У сои активность этих ферментов увеличивалась только через 24 ч действия гипоксии до уровня 150 и 235 % соответственно. Высокие концентрации  $\text{CO}_2$  вызывали в начале опыта снижение активности аскорбатпероксидазы и увеличивали активность общей пероксидазы. К концу опыта в клетках проростков сои активность этих ферментов возвращалась к норме. У гороха активность ферментов пероксидазной группы в условиях высокого содержания  $\text{CO}_2$  в среде увеличивалась уже в первые часы опыта и к 24 ч активность общей пероксидазы оставалась достаточно высокой (148,2 % от уровня контроля). При действии гипоксии к концу опыта наблюдалось повышение активности только общей пероксидазы.

Проведенные исследования позволяют заключить, что в условиях гипоксии у более устойчивых растений сои в первые часы экспозиции активность каталазы возрастала в большей мере, чем у неустойчивых

растений гороха, что позволяло контролировать уровень образования АФК. Однако, с увеличением сроков экспозиции (до 24 ч) функция защиты клеток растений от АФК переходила у этих растений к ферментам пероксидазной группы, что подтверждалось повышением активности ферментов общей пероксидазы и аскорбатпероксидазы у данных растений при действии гипоксии и среды с повышенным содержанием углекислого газа. При этом у более устойчивых проростков сои отмечался и более низкий уровень накопления в клетках разных типов АФК. Ранее было обнаружено [242] повышение активности СОД, каталазы и аскорбатпероксидазы в корнях яблони, подвергнутых длительной гипоксии (до 20 дней), в начальный период, но при длительном действии стрессора их активность начинала снижаться.

В данных опытах было показано, что  $\text{CO}_2$  – среда вызывала и более значительные изменения активности ферментов антиоксидантной системы, чем условия обычной гипоксии. У растений сои особенно это было выражено в изменении активности каталазы, когда уже при 3-часовой экспозиции в среде с  $\text{CO}_2$  ее активность возрастала до такой величины, которая была характерна для фермента, но только через 24 часа действия гипоксии. Это подтверждает ранее высказанное предположение [35, 39] о том, что действие диоксида углерода не связано с его влиянием на величину внутриклеточного рН, а определяется его влиянием на активность ферментных систем [40, 263] и структуру биологических мембран [46].

## ГЛАВА 7. ВЛИЯНИЕ ФИТОГОРМОНОВ НА ОБРАЗОВАНИЕ АФК В РАСТЕНИЯХ В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ И CO<sub>2</sub>-СРЕДЫ

### 7.1. Влияние фитогормонов кинетина и эпибрассинолида на процессы свободнорадикального окисления в растениях

Известно, что фитогормоны участвуют в процессах адаптации растений к различным неблагоприятным факторам внешней среды [97, 115, 126, 144, 247]. Показано [162], что при гипоксическом стрессе уровень АФК и процессы перекисного окисления липидов в корнях проростков огурца значительно возрастали, но это увеличение ингибировалось при добавлении эпибрассинолида. Отмечено [35], что кинетин и эпибрассинолид способны влиять на процессы ПОЛ, что стабилизирует содержание фосфолипидов и жирнокислотный состав мембран растений, повышая их устойчивость к действию стрессов, включая гипоксию. При этом было показано [35], что в CO<sub>2</sub> – среде в большей степени, чем при обычной гипоксии, отмечено как накопление отдельных продуктов свободнорадикального окисления, так и влияние на них фитогормонов кинетина и эпибрассинолида. Однако в данных опытах исследовались только конечные продукты перекисидации липидов – МДА и промежуточные – гидропероксиды у растений гороха, неустойчивого к гипоксическому стрессу. В связи с этим в опытах изучали влияние фитогормонов кинетина и эпибрассинолида как на интенсивность свободнорадикального окисления, так и на скорость образования разных типов АФК у растений, различающихся устойчивостью, при действии гипоксии и среды высоких концентраций CO<sub>2</sub>. С этой целью в растения предварительно методом насасывания с транспирационным током вводились растворы кинетина и эпибрассинолида (10 мг/л), а затем они подвергались действию разных газовых сред. В тканевых гомогенатах исследуемых растений определяли скорость свободнорадикального окисления, рассчитывая максимальную интенсивность сигнала ( $I_{max}$ ), светосумму (S) и

коэффициент  $k$ . Полученные величины интенсивности процессов окисления в растениях гороха, сои и кукурузы показаны в таблицах 3-5.

Как видно из данных табл. 3 в тканях растений гороха, не обработанных фитогормонами к 6 часам скорость процессов свободнорадикального окисления несколько возрастала, на что указывало повышение величины  $I_{\max}$  при действии на них условий гипоксии и  $\text{CO}_2$  – среды. К 24 часам показатели  $I_{\max}$  увеличился в условиях гипоксии на 45 % и на 61 % в атмосфере  $\text{CO}_2$ . Предварительная обработка проростков гороха кинетином несколько снизила скорость этих процессов у растений, как при гипоксии, так и в  $\text{CO}_2$  – среде, особенно в первые часы опыта. В тоже время предобработка эпибрассинолидом не повлияла на процессы свободнорадикального окисления в растениях гороха, подвергнутых действию гипоксического стресса. Однако показатели интенсивности процессов СРО снижались почти на 40 % при 6-часовой экспозиции растений в среде  $\text{CO}_2$ . При этом падала и величина коэффициента  $k$ , которая также указывает на снижение интенсивности процессов свободнорадикального окисления у этих растений.

В клетках более устойчивых растений сои (табл. 4) интенсивность свободнорадикального окисления была ниже, чем у аэрируемых растений на 50-70 % в первые часы действия газовых сред. Повышение процессов окисления свободных радикалов наблюдалось к 6 часам действия газовых сред. В условиях  $\text{CO}_2$  – среды в растениях сои показатель  $I_{\max}$  возрастал почти в 3,7 раза. Но к концу опыта интенсивность процессов свободнорадикального окисления в клетках растений сои снижалась в условиях гипоксии до уровня аэрируемых растений, а в  $\text{CO}_2$  – среде оставалась еще высокой. Фитогормон эпибрассинолид практически не влиял на интенсивность СРО, а кинетин снижал данный показатель у растений сои, находящихся в  $\text{CO}_2$  – среде при 6-часовой экспозиции.



Таблица 3

Влияние фитогормонов на интенсивность свободнорадикального окисления в растениях гороха при действии гипоксии и CO<sub>2</sub> – среды

	3 ч			6 ч			24 ч		
	без фитог.	кинестин	ЭБ	без фитог.	кинестин	ЭБ	без фитог.	кинестин	ЭБ
<b>ВОЗДУХ</b>									
I <sub>max</sub> , mV	517,4 ± 22,0 (100%)	402,9 ± 7,8 (78%)	344,8 ± 30,4 (67%)	467,3 ± 41,0 (100%)	455,4 ± 43,2 (97%)	408,4 ± 34,0 (87%)	262,4 ± 21,1 (100%)	317,9 ± 22,8 (121%)	311,5 ± 40,4 (119%)
S, mV *c	3005,9 ± 51,0 (100%)	2226,1 ± 6,3 (74%)	2121,5 ± 105,7 (71%)	2346,7 ± 130,0 (100%)	2023,9 ± 200,0 (86%)	2035,9 ± 116,7 (87%)	1776,7 ± 150,2 (100%)	1711,9 ± 47,0 (96%)	1760,1 ± 120,5 (99%)
k	0,17 ± 0,005	0,18 ± 0,007	0,16 ± 0,006	0,20 ± 0,001	0,22 ± 0,001	0,20 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,17 ± 0,01
<b>ГИПОКСИЯ</b>									
I <sub>max</sub> , mV	453,8 ± 21,0 (88%)	511,2 ± 46,0 (99%)	421,9 ± 56,4 (82%)	493,2 ± 37,0 (106%)	450,6 ± 15,8 (96%)	428,7 ± 15,3 (92%)	380,8 ± 40,7 (145%)	379,1 ± 5,1 (144%)	395,5 ± 50,0 (150%)
S, mV *c	2717,2 ± 151,0 (90%)	2428,5 ± 307,2 (81%)	2337,4 ± 246,7 (78%)	2766,0 ± 135,0 (118%)	2471,8 ± 159,5 (105%)	2821,6 ± 170,0 (120%)	2176,7 ± 280,1 (123%)	2414,6 ± 73,2 (136%)	2373,9 ± 210,6 (134%)
k	0,17 ± 0,01	0,20 ± 0,013	0,18 ± 0,005	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,006	0,16 ± 0,03	0,17 ± 0,02	0,15 ± 0,007	0,16 ± 0,01
<b>CO<sub>2</sub> – среда</b>									
I <sub>max</sub> , mV	526,5 ± 35,0 (102%)	450,9 ± 17,0 (87%)	368,3 ± 5,0 (71%)	533,0 ± 39,5 (114%)	568,4 ± 12,8 (122%)	356,7 ± 3,4 (76%)	422,5 ± 15,0 (161%)	314,4 ± 27,2 (120%)	423,1 ± 10,3 (161%)
S, mV *c	2566,4 ± 103,0 (85%)	2138,8 ± 199,0 (71%)	2376,1 ± 109,7 (79%)	2742,2 ± 126,0 (117%)	2703,7 ± 190,0 (115%)	1842,4 ± 20,1 (79%)	2621,9 ± 180,5 (148%)	2379,1 ± 135,3 (134%)	2673,3 ± 230,1 (150%)
k	0,21 ± 0,01	0,21 ± 0,012	0,16 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,21 ± 0,02	0,19 ± 0,01	0,16 ± 0,008	0,13 ± 0,004	0,16 ± 0,01

Таблица 4

Влияние фитогормонов на интенсивность свободнорадикального окисления в растениях сои при действии гипоксии и CO<sub>2</sub> – среды

	3 ч			6 ч			24 ч		
	без фитог.	кинетин	ЭБ	без фитог.	кинетин	ЭБ	без фитог.	кинетин	ЭБ
<b>ВОЗДУХ</b>									
I <sub>max</sub> , mV	742,5 ± 16,5 (100%)	731,5 ± 45,5 (99%)	445,6 ± 24,6 (60%)	272,7 ± 52,3 (100%)	898,1 ± 93,8 (329%)	698,6 ± 91,0 (256%)	342,1 ± 9,5 (100%)	394,2 ± 11,6 (115%)	370,3 ± 40,4 (108%)
S, mV *c	3026,0 ± 112,3 (100%)	2455,8 ± 14,8 (81%)	2010,7 ± 51,2 (66%)	1455,1 ± 81,0 (100%)	2921,6 ± 31,5 (201%)	2511,9 ± 262,6 (173%)	1384,3 ± 68,6 (100%)	1455,2 ± 28,5 (105%)	2011,4 ± 398,5 (145%)
k	0,25 ± 0,01	0,28 ± 0,02	0,22 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,30 ± 0,034	0,27 ± 0,03	0,27 ± 0,02	0,27 ± 0,01	0,18 ± 0,01
<b>ГИПОКСИЯ</b>									
I <sub>max</sub> , mV	340,8 ± 35,5 (46%)	286,9 ± 45,0 (39%)	406,3 ± 54,9 (55%)	481,6 ± 58,5 (177%)	480,5 ± 93,1 (176%)	868,2 ± 90,0 (318%)	310,4 ± 19,3 (91%)	479,2 ± 48,0 (140%)	640,4 ± 131,6 (187%)
S, mV *c	1582,2 ± 122,2 (52%)	1842,7 ± 160,5 (61%)	2049,3 ± 347,9 (68%)	1740,0 ± 140,0 (120%)	2198,3 ± 217,8 (151%)	2624,5 ± 233,7 (180%)	1502,1 ± 102,1 (109%)	2392,7 ± 131,7 (173%)	2719,9 ± 83,0 (196%)
k	0,22 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,27 ± 0,03	0,22 ± 0,02	0,33 ± 0,03	0,21 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,23 ± 0,01
<b>CO<sub>2</sub> – среда</b>									
I <sub>max</sub> , mV	236,5 ± 29,5 (32%)	647,2 ± 23,6 (87%)	543,4 ± 61,0 (73%)	1021,2 ± 1,6 (374%)	820,9 ± 90,9 (301%)	876,3 ± 30,5 (321%)	556,4 ± 50,7 (163%)	614,9 ± 9,6 (180%)	534,3 ± 81,4 (156%)
S, mV *c	1466,0 ± 38,0 (48%)	2343,1 ± 157,0 (77%)	1939,6 ± 74,8 (64%)	2585,2 ± 49,3 (178%)	2359,9 ± 156,7 (162%)	2909,3 ± 77,1 (200%)	2382,2 ± 266,5 (172%)	2129,2 ± 11,6 (154%)	1823,9 ± 118,7 (132%)
k	0,16 ± 0,01	0,27 ± 0,02	0,28 ± 0,01	0,39 ± 0,04	0,34 ± 0,03	0,30 ± 0,02	0,23 ± 0,02	0,28 ± 0,01	0,29 ± 0,01

В клетках проростков кукурузы (табл. 5) показатель  $I_{\max}$  при гипоксии в первые часы опыта была выше контроля, а далее начинал снижаться, и к 24 часам был уже ниже уровня аэрируемых растений. В условиях  $\text{CO}_2$  – среды показатель  $I_{\max}$  также сначала возрастал на 64 %, но к концу опыта снижался до уровня аэрируемых растений. Обработка растений кукурузы кинетином снижала величину  $I_{\max}$  наиболее интенсивно именно при 3-х часовой гипоксии и 6-ти часовом действии  $\text{CO}_2$  – среды почти в 1,5 раза. Обработка растений кукурузы эпибрасинолидом вызывала также падение показателя свободнорадикального окисления в тот же период на 35-50 %.

Таким образом проведенные исследования показали влияние фитогормонов кинетина и эпибрасинолида на процессы свободнорадикального окисления в растениях в условиях гипоксии и  $\text{CO}_2$  – среды. Полученные нами данные по исследованию влияния кинетина и эпибрасинолида на скорость процессов свободнорадикального окисления в растениях с разной степенью устойчивости совпадают с результатами ранее проведенных работ [35], в которых было отмечено, что фитогормоны подавляли процессы перекисидации липидов, которые активизировались у растений в условиях гипоксического стресса. При этом действие эпибрасинолида на процессы снижения концентрации продуктов перекисидации липидов было более выраженным, чем действие кинетина. Однако это было показано только для неустойчивых проростков гороха. У более устойчивых растений кукурузы значительное снижение процессов свободнорадикального окисления в данных опытах наблюдалось после обработки их кинетином, также как и у сои, где эпибрасинолид практически не влиял на скорость данных процессов. Отмечено, что подобное действие данных фитогормонов проявлялось у этих растений и в среде высоких концентраций диоксида углерода.

Таблица 5

Интенсивность свободнорадикального окисления в растениях кукурузы, обработанных фитогормонами, при действии гипоксии и CO<sub>2</sub> – среды

	3 ч			6 ч			24 ч		
	без фитог.	кинестин	ЭБ	без фитог.	кинестин	ЭБ	без фитог.	кинестин	ЭБ
<b>ВОЗДУХ</b>									
I <sub>max</sub> , mV	333,0 ± 35,0 (100%)	310,7 ± 34,0 (93%)	339,0 ± 30,4 (101%)	240,0 ± 21,0 (100%)	323,0 ± 43,2 (135%)	284,1 ± 24,0 (118%)	274,5 ± 21,1 (100%)	317,0 ± 32,9 (115%)	291,0 ± 30,4 (106%)
S, mV *с	1977,0 ± 151,0 (100%)	1825,3 ± 195,3 (92%)	1905,3 ± 185,9 (96%)	1490,5 ± 136,0 (100%)	2225,0 ± 200,0 (149%)	1722,5 ± 195,7 (116%)	1605,0 ± 150,8 (100%)	1715,5 ± 146,0 (107%)	1512,0 ± 120,5 (94%)
<b>k</b>	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,30 ± 0,034	0,27 ± 0,03	0,27 ± 0,02	0,27 ± 0,01	0,18 ± 0,01
<b>ГИПОКСИЯ</b>									
I <sub>max</sub> , mV	457,3 ± 41,0 (137%)	311,0 ± 36,0 (93%)	341,3 ± 36,4 (102%)	220,5 ± 31,0 (92%)	220,5 ± 15,9 (84%)	242,5 ± 25,3 (101%)	244,0 ± 20,6 (89%)	322,3 ± 35,1 (117%)	319,3 ± 30,0 (116%)
S, mV *с	3390,0 ± 351,0 (171%)	1774,0 ± 107,5 (90%)	1755,3 ± 146,0 (89%)	1510,5 ± 135,0 (101%)	1321,0 ± 128,5 (89%)	1546,0 ± 147,0 (104%)	1279,7 ± 140,1 (80%)	1643,0 ± 173,9 (102%)	1552,4 ± 110,6 (97%)
<b>k</b>	0,13 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,15 ± 0,03	0,15 ± 0,02	0,16 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,21 ± 0,02
<b>CO<sub>2</sub> - среда</b>									
I <sub>max</sub> , mV	284,3 ± 31,0 (85%)	287,0 ± 17,0 (86%)	344,5 ± 35,0 (103%)	393,0 ± 41,5 (164%)	256,0 ± 22,6 (107%)	282,5 ± 23,4 (118%)	280,2 ± 25,4 (102%)	279,7 ± 27,2 (102%)	319,3 ± 30,3 (116%)
S, mV *с	1740,0 ± 193,0 (88%)	1816,0 ± 199,0 (92%)	2021,3 ± 93,7 (102%)	2518,0 ± 126,0 (169%)	1963,0 ± 190,0 (132%)	1581,5 ± 190,1 (106%)	1515,6 ± 130,5 (94%)	1559,0 ± 139,1 (97%)	1587,3 ± 130,1 (99%)
<b>k</b>	0,16 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,16 ± 0,04	0,13 ± 0,01	0,18 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,20 ± 0,01

## 7.2. Влияние фитогормонов на образование различных типов АФК в растениях

Изучив влияние фитогормонов кинетина и эпибрасинолида (ЭБ) на процессы свободнорадикального окисления, в дальнейших опытах нами было проанализировано их влияние на содержание отдельных типов АФК, таких как супероксидный анион-радикал и пероксид водорода в условиях разных газовых сред: аэрация, гипоксия и  $\text{CO}_2$  – среда. Как видно из результатов опыта (рис. 10, приложение табл. 4) в клетках проростков гороха содержание супероксидного анион-радикала при гипоксии возросло на 61 %, а в условиях  $\text{CO}_2$  – среды почти в 2 раза и оставалось практически таким же до конца опыта. Обработка растений гороха кинетином вызывала снижение содержания супероксидного радикала только при 6-часовой экспозиции как в условиях гипоксии (на 56 %), так и в  $\text{CO}_2$  – среде практически в 2 раза. Предобработка растений гороха эпибрасинолидом вызывала снижение содержания супероксида в условиях гипоксии на 62 %, а в  $\text{CO}_2$  – среде более чем в два раза. К концу опыта ЭБ не оказывал влияния на снижение содержания данной активной формы кислорода в клетках проростков гороха.

В растениях сои содержание супероксидного анион-радикала в первые часы действия газовых сред не превышало уровня аэрируемых растений, но к 24 часам оно постепенно возрастало. Обработка растений фитогормоном кинетином снижала продукцию данной формы АФК в растениях сои. Обнаружено, что в первые 3 часа действия среды диоксида углерода кинетин вызывал двукратное снижение супероксидного анион-радикала в проростках сои. Через 6-24 часов экспозиции концентрация этой АФК также снижалась в разных газовых средах, но менее существенно. При обработке проростков эпибрасинолидом содержание супероксида в условиях гипоксического стресса снижалось на 25 % через 6 часов и на 22 % через 24 часа опыта. В условиях  $\text{CO}_2$  – среды эпибрасинолид уменьшал продукцию супероксида на 35 % только к концу опыта.

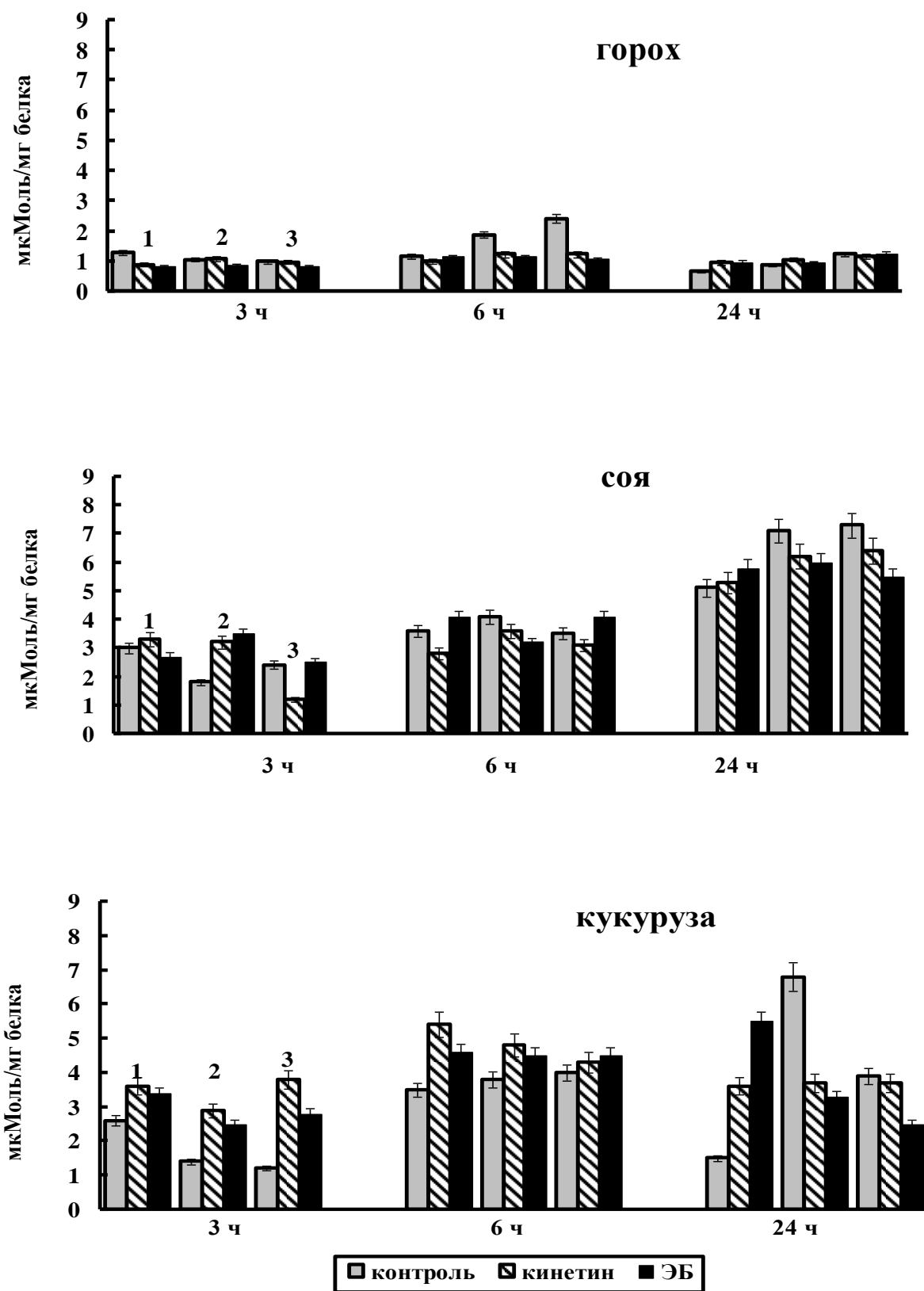


Рис. 10. Содержание супероксидного анион-радикала у растений при действии различных газовых сред в присутствии фитогормонов (1 – контроль, 2 – гипоксия, 3 – CO<sub>2</sub>-среда)

В растениях кукурузы содержание супероксидного анион-радикала в начале действия газовых сред было в 2 раза меньше по сравнению с уровнем аэрируемых растений. К 6 часам оно превышало уровень контроля, а к концу опыта при действии гипоксии возросло в 4,5 раза), а  $\text{CO}_2$  – среды в 2,6 раза. При обработке растений кинетином обнаружено снижение продукции супероксидного анион-радикала но только к концу опыта, особенно в условиях гипоксического стресса (в два раза). Однако нужно отметить, что под действием эпибрассинолида образование супероксида в клетках проростков кукурузы снижалось к концу действия газовых сред еще более значительно. Эпибрассинолид вызывал падение уровня супероксида в клетках этих растений в условиях гипоксии в 2 раза, а в  $\text{CO}_2$  – среде в 1,5 раза.

В тоже время постепенное накопление пероксида водорода, как одной из наиболее стабильных форм АФК, происходило в клетках проростков гороха на протяжении всех часов опыта (рис. 11). Предобработка растений гороха кинетином снижала уровень пероксида водорода в тканях растений на 40-50%, и этот эффект действия фитогормона сохранялся во все сроки экспозиции. Эпибрассинолид оказывал сходное влияние на содержание в клетках неустойчивых проростков гороха пероксида водорода в условиях гипоксии. Под действием эпибрассинолида уровень пероксида водорода снижался на 40-60 % в первые 3-6 часов влияния гипоксии, а к концу опыта падал почти в два раза. При действии на растения  $\text{CO}_2$  – среды снижение содержания пероксида водорода, вызванное эпибрассинолидом, было столь же существенным в течение первых часов и к концу опыта продукция пероксида водорода уменьшилась примерно на треть. В клетках среднеустойчивых растений сои обработка кинетином приводила на всех этапах к уменьшению концентрации пероксида водорода в тканях как при гипоксии, так и в  $\text{CO}_2$  – среде. Наибольшее снижение содержания пероксида водорода (в 3 раза) отмечено к 6 часам действия  $\text{CO}_2$  – среды.

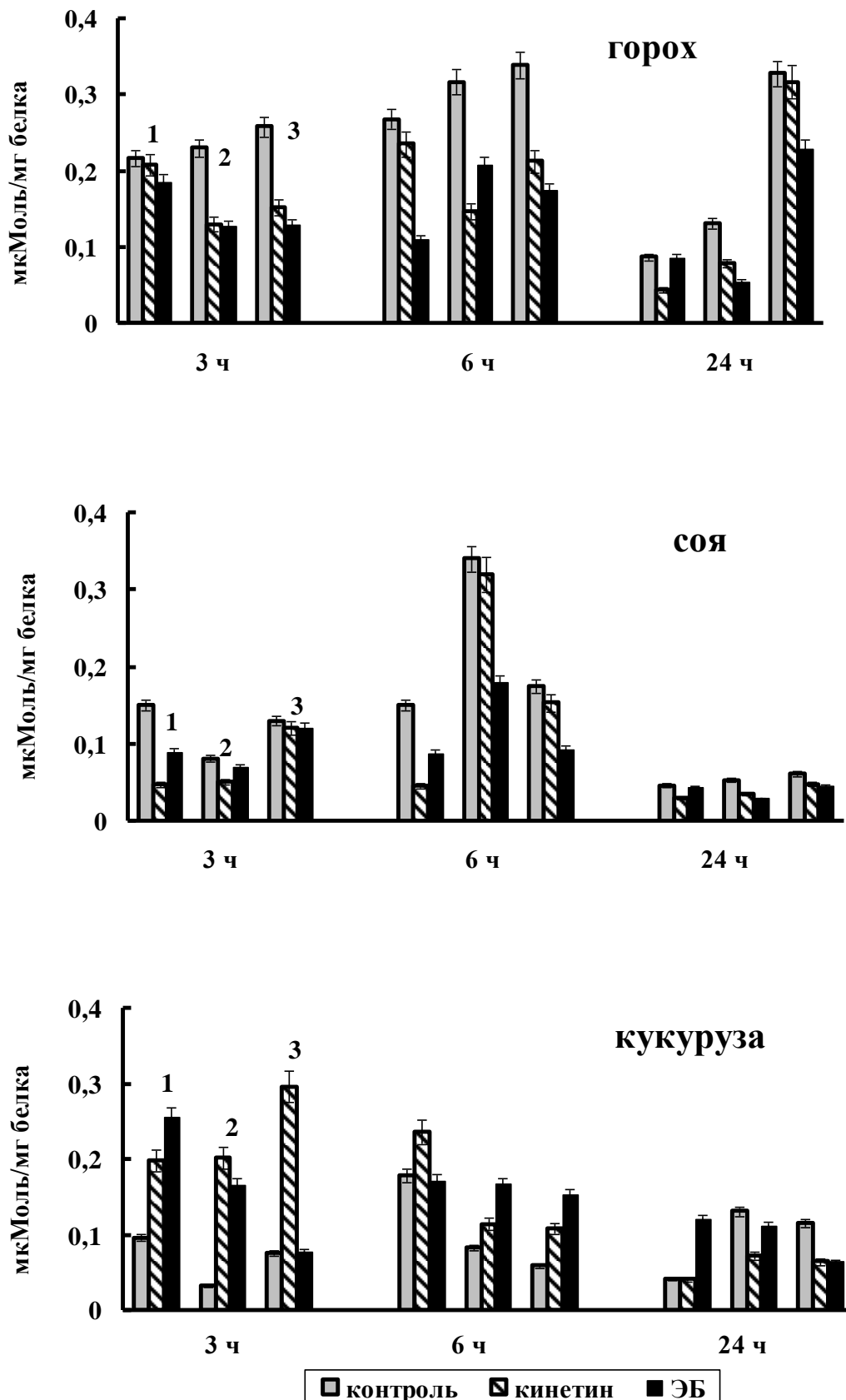


Рис. 11. Содержание пероксида водорода у растений при действии различных газовых сред в присутствии фитогормонов (1 – контроль, 2 – гипоксия, 3 – CO<sub>2</sub>-среда)



К концу опыта обработка растений сои кинетином привела к 30 % уменьшению содержания данного типа АФК в исследуемых газовых средах. Предобработка растений сои эпибрассинолидом также вызывала снижение содержания пероксида водорода в клетках почти в 2 раза, особенно через 6-часов действия гипоксии и  $\text{CO}_2$  - среды. К концу опыта эпибрассинолид уменьшал продукцию пероксида водорода в  $\text{CO}_2$  – среде на 35 %, а при действии гипоксии практически в два раза.

В растениях кукурузы содержание пероксида водорода в условиях разных газовых сред менялось так же, как и продукция супероксидного анион-радикала. К концу опыта происходило трехкратное повышение данного типа АФК при действии гипоксии и  $\text{CO}_2$  – среды. Фитогормоны не вызывали уменьшение продукции пероксида водорода в начале опыта. Однако проявляли свое действие в последние часы опыта. При действии кинетина отмечалось снижение содержания пероксида водорода к 24 часам опыта в 1,8 раза в условиях гипоксии и в 1,5 раза – в  $\text{CO}_2$  – среде. Под действием эпибрассинолида происходило столь же значительное падение уровня пероксида водорода. Так, в условиях гипоксии оно падало на 50 %, а в  $\text{CO}_2$  – среде в 1,5 раза после обработки эпибрассинолидом.

Проведенные нами опыты показали, что в условиях гипоксического стресса в растениях повышалась интенсивность процессов свободнорадикального окисления, при этом увеличивалось и содержание всех типов АФК, включая и пероксид водорода. Фитогормоны кинетин и эпибрассинолид снижали содержание отдельных форм АФК как в клетках растений гороха, так и в сое и кукурузе при действии на них дефицита кислорода и высоких концентраций углекислого газа, однако на разных этапах. У проростков гороха и сои это отмечалось уже с первых часов опыта, а для растений кукурузы проявлялось только к концу экспозиции растений в газовых средах. Как кинетин, так и эпибрассинолид достаточно эффективно тормозили процессы свободнорадикального окисления у растений, подвергнутых действию гипоксического стресса. Можно предположить, что

это позволяет растениям повышать устойчивость к действию различных стрессовых факторов внешней среды, включая гипоксию. Результаты наших опытов совпадают с данными для других растений (огурца), когда в условиях гипоксии эпибрассинолид уменьшал содержание АФК [162]. Такой же эффект был обнаружен и для цитокининов в семенах растений сои [119]. Нужно отметить, что фитогормоны кинетин и эпибрассинолид также эффективно снижали продукцию разных типов АФК в клетках проростков гороха, сои и кукурузы, подвергнутых воздействию  $\text{CO}_2$  – среды.

## ГЛАВА 8. ПРОЦЕССЫ ОБРАЗОВАНИЯ АФК И АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ В КЛЕТОЧНЫХ ОРГАНЕЛЛАХ РАЗЛИЧНЫХ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ КРАТКОВРЕМЕННОЙ ГИПОКСИИ И CO<sub>2</sub> - СРЕДЫ

### 8.1. Влияние гипоксии и CO<sub>2</sub> - среды на образование АФК в митохондриях растений

Ранее нами было изучено влияние гипоксического стресса и CO<sub>2</sub> – среды на содержание различных типов АФК и активность ферментов в тканевых гомогенатах растений гороха, сои и кукурузы. В тоже время известно [60], что клеточные компартменты могут вносить вклад в процесс накопления активных форм кислорода в растениях в условиях различных стрессовых факторов, и их роль неоднозначна. Показано [209], что в дыхательной цепи митохондрий возможно неполное восстановление молекулярного кислорода с образованием различных типов АФК, избыточное накопление которых может привести к гибели клеток. В митохондриях продуцируется меньше АФК, по сравнению с хлоропластами и пероксисомами, но в темноте или в не зеленых частях растений данные органоиды являются одним из основных источников образования активных кислородных радикалов [209]. Нами показано, что образование АФК в тканях растений происходило даже в условиях кратковременной (3-24 ч) гипоксии. В связи с этим исследовали роль разных органоидов в процессах накопления активных форм кислорода в растениях гороха, сои и кукурузы при действии гипоксии и среды высоких концентраций диоксида углерода. Клеточные фракции митохондрий, хлоропластов и цитоплазмы выделяли из растений после нахождения их 3,6 и 24 часов в условиях гипоксии или CO<sub>2</sub> – среды. Для доказательства чистоты выделенных клеточных фракций в предварительных опытах определяли маркерный фермент сукцинатдегидрогеназу для митохондрий, а содержание хлорофилла определяли для хлоропластов (таблица 6).

Распределение хлорофилла и активность сукцинатдегидрогеназы в  
клеточных фракциях исследуемых растений

фракция	цитоплазма	хлоропласты	митохондрии
горох			
содержание пигментов, %	1,92	95	1,4
активность СДГ, %	10,45	0	87,5
соя			
содержание пигментов, %	1,80	87	1,5
активность СДГ, %	12,0	0	82,0
кукуруза			
содержание пигментов, %	3,8	90,2	1,1
активность СДГ, %	0	0	92

Как показали полученные нами результаты в митохондриальных фракциях, выделенных из клеток проростков гороха и сои, активность маркерного фермента СДГ во фракции митохондрий достигала 82-87 %, проростков кукурузы – до 92 % от общей активности. При этом содержание хлорофилла составило менее 2 %, что свидетельствует о высокой чистоте фракции митохондрий. Для фракции хлоропластов гороха, сои и кукурузы содержание хлорофилла составляло 87-95 % от общего содержания в клетках. Активность сукцинатдегидрогеназы составила менее 1 %, что свидетельствует о высокой чистоте фракции хлоропластов. Во фракции цитоплазмы растений активность сукцинатдегидрогеназы составила менее 12 %, а содержание хлорофилла до 4 %, что свидетельствует о достаточно высокой степени чистоты.

Как известно, наиболее опасным типом АФК для клеточных структур является именно супероксидный анион-радикал. В отличие от молекулярного кислорода, который свободно перемещается через клеточные мембраны, супероксид не способен преодолевать гидрофобный барьер [5]. Образовавшийся супероксид при этом еще является источником других активных форм кислорода и способен индуцировать дальнейшие процессы

перекисного окисления липидов [60, 130]. Как показано в таблице 7, в митохондриях растений гороха в первые часы действия газовых сред опыта содержание супероксидного анион-радикала было практически на уровне контрольных растений, но затем оно начинало возрастать. К 6 часам произошло увеличение содержания супероксидного анион-радикала на 20 % в  $\text{CO}_2$  – среде и на 54 % в условиях гипоксии у проростков гороха. Затем на протяжении последующих часов действия гипоксического стресса в митохондриях происходило снижение содержания супероксида. К 24 часам в митохондриях растений при гипоксии содержание данной АФК оставалось по-прежнему выше контроля, а при действии  $\text{CO}_2$  – среды падало ниже уровня аэрируемых растений.

Таблица 7

Влияние гипоксии и CO<sub>2</sub> – среды на продукцию супероксидного анион-радикала в митохондриях растений гороха, сои и кукурузы

вариант	горох		соя		кукуруза	
	мкМоль O <sub>2</sub> <sup>-</sup> мг <sup>-1</sup> белка	% от контроля	мкМоль O <sub>2</sub> <sup>-</sup> мг <sup>-1</sup> белка	% от контроля	мкМоль O <sub>2</sub> <sup>-</sup> мг <sup>-1</sup> белка	% от контроля
<b>3 часа</b>						
воздух	9,9 ± 1,2	100	3,0 ± 0,02	100	4,4 ± 0,32	100
гипоксия	10,7 ± 1,3	108	1,8 ± 0,17	60	3,5 ± 0,13	80
CO <sub>2</sub> - среда	8,1 ± 0,9	82	2,4 ± 0,12	80	3,8 ± 0,29	86
<b>6 часов</b>						
воздух	3,5 ± 0,15	100	3,6 ± 0,25	100	9,0 ± 0,75	100
гипоксия	5,4 ± 0,21	154	4,1 ± 0,21	113	7,4 ± 0,43	82
CO <sub>2</sub> - среда	4,2 ± 0,30	120	3,5 ± 0,30	97	6,8 ± 0,50	76
<b>24 часа</b>						
воздух	3,8 ± 0,29	100	5,1 ± 0,39	100	6,4 ± 0,30	100
гипоксия	5,3 ± 0,40	139	5,6 ± 0,30	109	8,3 ± 0,45	130
CO <sub>2</sub> - среда	3,1 ± 0,15	82	5,8 ± 0,55	114	7,7 ± 0,65	121

В тоже время у более устойчивых растений сои в митохондриях в начале опыта вообще не наблюдалось накопления супероксида, и его содержание было ниже уровня аэрируемых растений. К 6 часам опыта содержание супероксидного анион-радикала в митохондриях увеличивалось до контрольных значений. К концу опыта у растений как при действии гипоксии, так и в  $\text{CO}_2$  – среде происходило незначительное (на 9-14 %) накопления супероксидного анион-радикала в митохондриях. В митохондриях среднеустойчивых растений кукурузы после 3-6 часов действия гипоксии и среды высоких концентраций диоксида углерода уровень супероксидного анион-радикала был ниже контрольных значений. Только к концу опыта наблюдалось его накопление у растений в условиях гипоксии на 30 %, а в  $\text{CO}_2$  – среде на 21 % по отношению к митохондриям контрольных растений, так же как и у растений сои.

Таким образом, полученные нами данные показали, что в митохондриях в условиях гипоксии могут активно продуцироваться отдельные виды АФК, в частности супероксидный анион-радикал. При этом у менее устойчивых проростков гороха это отмечалось уже в первые часы действия гипоксического стресса, а у более устойчивых проростков сои и кукурузы происходило только в более поздние сроки экспозиции (через 24 часа). Нужно отметить, что в условиях  $\text{CO}_2$  – среды также и в те же периоды активно продуцировался супероксидный анион-радикал в митохондриях исследуемых растений.

Предполагают [225], что в митохондриях растений возможно образование и пероксида водорода в условиях гипоксического стресса. В связи с этим нами было проведено определение содержания данного типа АФК в митохондриях данных растений при действии кратковременной до суток гипоксии и  $\text{CO}_2$  – среды. Как видно из данных, представленных на рис. 12, в митохондриях растений гороха накопление пероксида водорода отмечалось уже в первые 3 часа действия гипоксии и достигало 134 %.

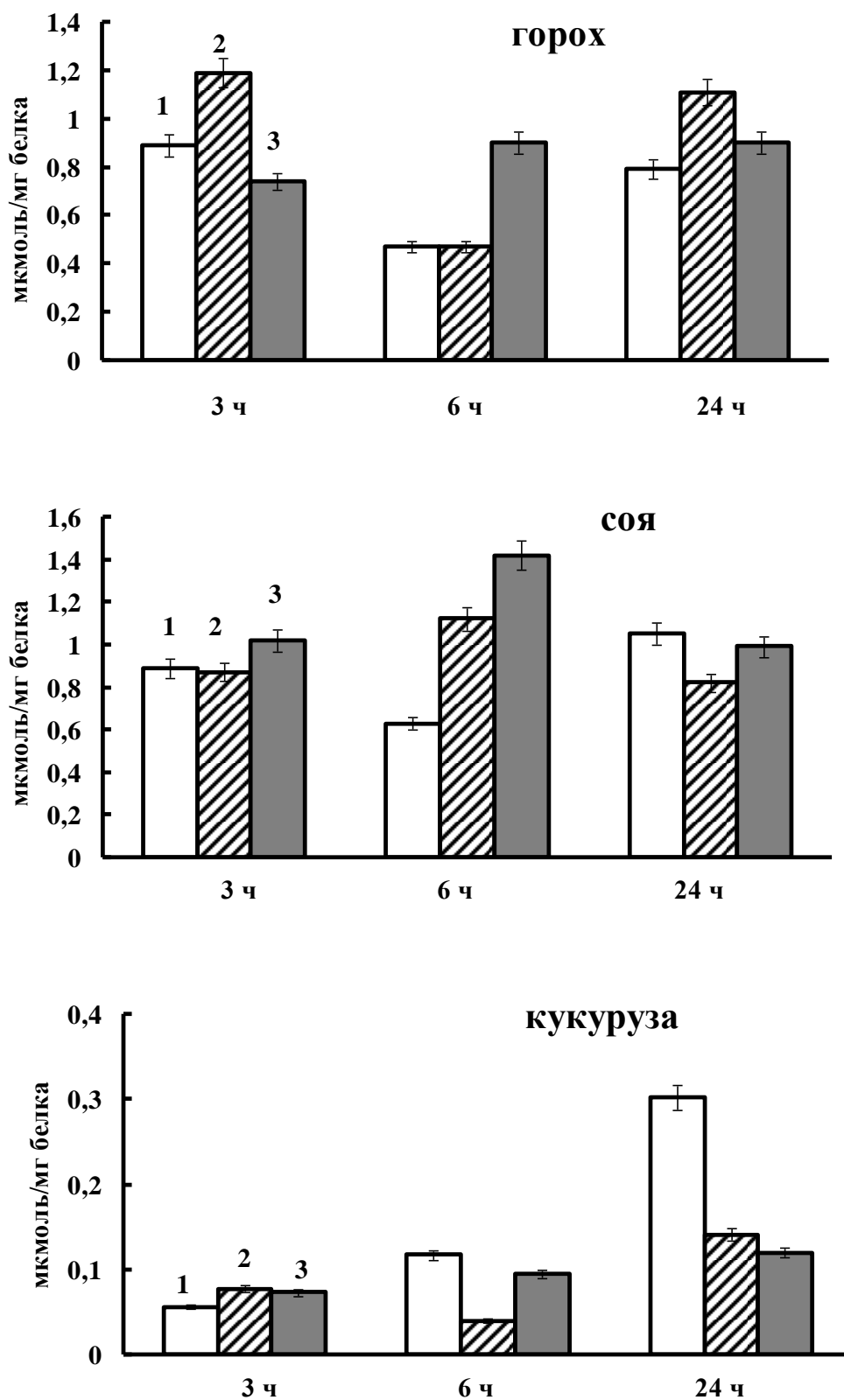


Рис. 12. Содержание пероксида водорода в митохондриях растений в условиях гипоксии и CO<sub>2</sub> – среды (1 – контроль; 2 – гипоксия; 3 – CO<sub>2</sub>-среда)



При действии  $\text{CO}_2$  – среды увеличение содержания почти вдвое данной формы АФК происходило через 6 часов опыта. К концу опыта содержание пероксида водорода в митохондриях растений, находящихся в условиях гипоксии, сохранялось на том же уровне. При действии  $\text{CO}_2$  – среды содержание пероксида водорода в митохондриях наоборот снижалось.

В митохондриях более устойчивых растений сои содержание пероксида к 6 часам при действии на растения газовых сред резко возрастала (почти в 1,8-2,2 раза). Однако к концу опыта содержание пероксида падало до уровня аэрируемых растений в  $\text{CO}_2$  – среде, а в условиях гипоксии оставалось выше контрольных растений.

В митохондриях среднеустойчивых растений кукурузы наблюдали небольшое (до 30-37 %) накопление пероксида водорода, но только в первые 3 часа действия газовых сред. Затем его содержание резко падало и становилось более чем в 2 раза ниже по отношению к митохондриям аэрируемых растений.

Проведенные исследования впервые показали возможность накопления значительного количества супероксидного анион-радикала и пероксида водорода в митохондриях растений в условиях кратковременной гипоксии. При этом уровень накопления разных типов АФК в митохондриях зависел как от сроков действия, так и от степени устойчивости растений к дефициту кислорода. При этом действие  $\text{CO}_2$  – среды на растения гороха и сои (бобовые растения) было на отдельных этапах более эффективным в отношении образования АФК в митохондриях этих растений, чем условия обычной гипоксии. Особенности действия среды высоких концентраций диоксида углерода на жирнокислотный состав мембран митохондрий растений кукурузы ранее уже были показаны [39, 47].

## 8.2. Липоксигеназа и ее роль в образовании АФК в митохондриях растений в условиях гипоксии и $\text{CO}_2$ – среды

Не смотря на то, что основным местом локализации липоксигеназы являются хлоропласты и цитоплазма клеток растений, в работах [137] было обнаружено накопление продуктов пероксидации жирных кислот в митохондриях растительных клеток за счет фермента липоксигеназы. В клетках клубней картофеля отмечалось даже увеличение активности липоксигеназ в условиях аноксического стресса [187], что показано было и по увеличению содержания м-РНК. В связи с этим в своих опытах мы провели электрофоретическое исследование на содержание липоксигеназы в различных клеточных компартментах.

Доказательства присутствия в митохондриях растений липоксигеназы были получены нами при электрофорезе белков митохондрий и последующем их специфическом окрашивании в присутствии линолевой кислоты [179]. Была подобрана и отработана методика выявления липоксигеназы в митохондриях проростков гороха и сои. Растения помещали на 3 часа в условия гипоксии и  $\text{CO}_2$  – среды, и далее белки из митохондрий подвергались электрофоретическому разделению и последующему специфическому проявлению. Как видно на электрофореграммах (рис. 13, 14), при действии гипоксии не происходило появления новых изоформ липоксигеназ в митохондриях, и не изменялась величина  $R_f$  присутствующего фермента. Однако отмечалось изменение его активности, о чем свидетельствовало усиление интенсивности окраски пятен фермента на электрофореграммах.

В дальнейшем в выделенных митохондриях определяли активность липоксигеназы. В митохондриях проростков гороха обнаружено до 21,2 % активности липоксигеназы, для сои эта величина составила 8,3 %, для кукурузы – 11,2 % от общего содержания фермента в клетках.

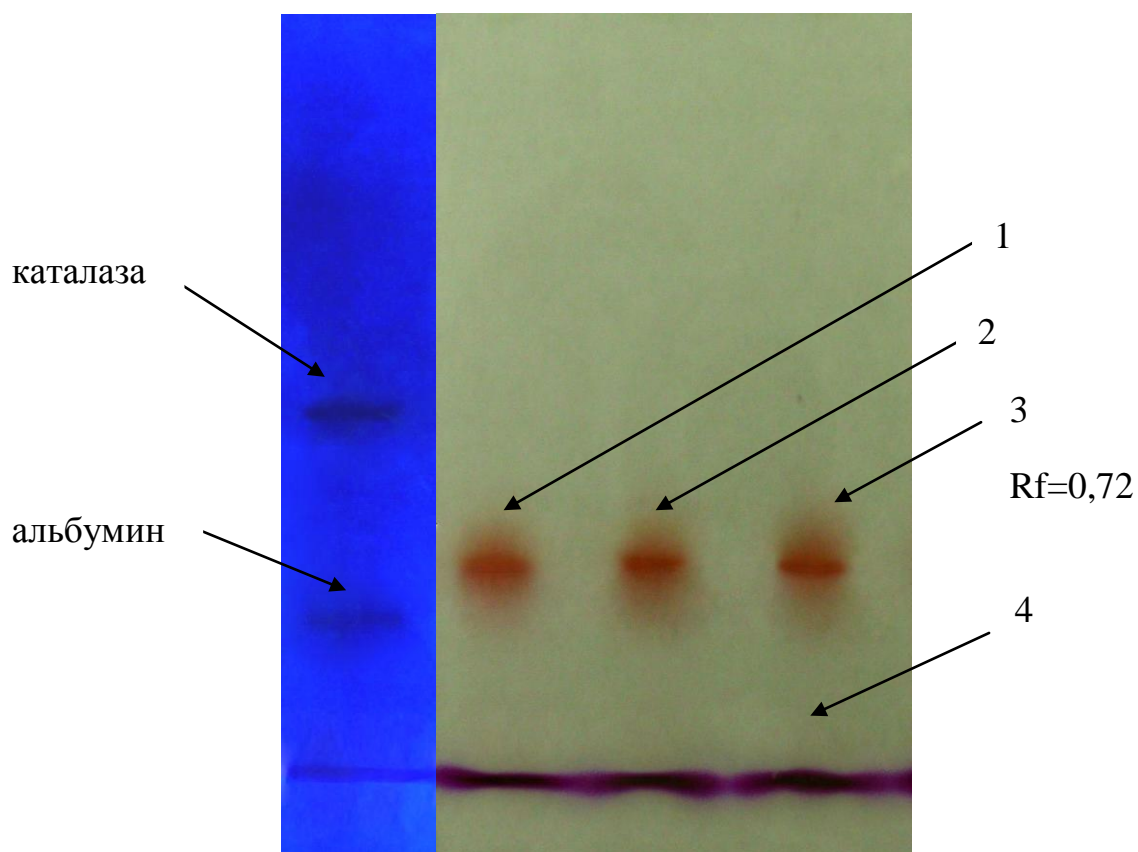


Рис. 13. Специфическое проявление липоксигеназы митохондрий растений гороха, подвергнутых 3 часовому действию гипоксии и  $\text{CO}_2$ -среды. Маркерные белки: каталаза (250 кДа), альбумин бычий сывороточный (66 кДа), проявленные кумасси R-250  
1 – воздух; 2 – гипоксия; 3 –  $\text{CO}_2$ -среда; 4 – фронт красителя бромфенолового синего

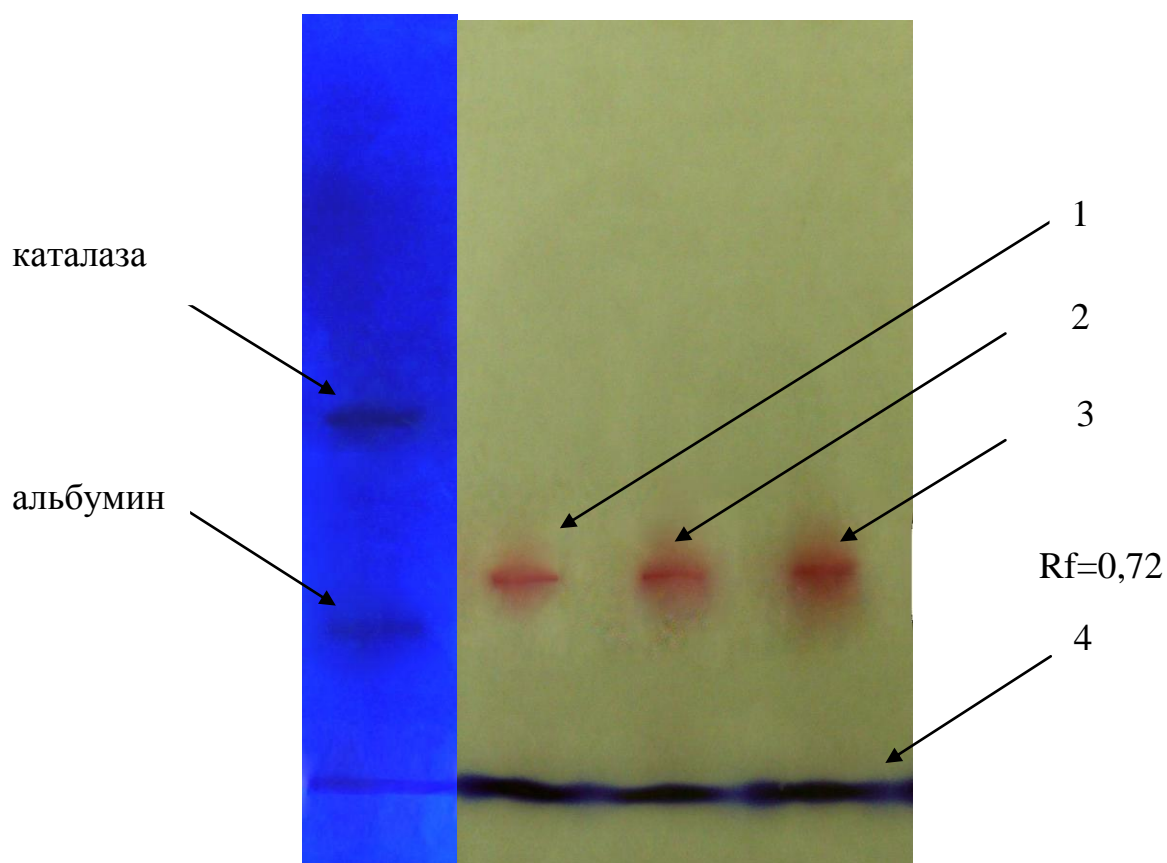


Рис. 14. Специфическое проявление липоксигеназы митохондрий растений сои, подвергнутых 3 часовому действию гипоксии и CO<sub>2</sub>-среды. Маркерные белки: каталаза (250 кДа), альбумин бычий сывороточный (66 кДа), проявленные кумасси R-250  
1 – воздух; 2 – гипоксия; 3 – CO<sub>2</sub>-среда; 4 – фронт красителя бромфенолового синего

Так как перекрестное загрязнение фракций митохондрий хлоропластами составляло от 3 до 5 % по хлорофиллу, то можно считать, что в исследуемых растениях фермент липоксигеназа имеет и митохондриальную локализацию, что ранее было показано только для листьев растений гороха методами SDS-электрофореза и вестер-блот анализа [137]. В следующих опытах проростки растений помещались на 3,6 и 24 часа в условия разных газовых сред, после чего в них определялась активность фермента.

Было показано, что через три часа действия гипоксии и  $\text{CO}_2$  – среды на проростки гороха активность митохондриальной липоксигеназы возрастала на 77 и 52 % соответственно по сравнению с аэрируемыми растениями (табл. 8). Однако через 6 часов активность митохондриальной липоксигеназы начинала падать, и к концу опыта была ниже, чем у аэрируемых растений. У проростков сои через три часа действия гипоксии активность митохондриальной липоксигеназы возрастала почти на 50 % по сравнению с аэрируемыми растениями. Через 6 часов действия газовых сред активность митохондриальной липоксигеназы возрастала вдвое, особенно у растений, находящихся в  $\text{CO}_2$  – среде. К концу опыта активность фермента у проростков сои, находящихся в условиях гипоксии, также как и у гороха, падала до уровня контроля, а в  $\text{CO}_2$  – среде оставалась еще выше аэрируемых растений.

У среднеустойчивых проростков кукурузы активность митохондриальной липоксигеназы возрастала практически во все периоды действия газовых сред. Особенно значительно это происходило через 6 и 24 часа действия  $\text{CO}_2$  – среды. Для условий гипоксии увеличение активности липоксигеназы отмечалось только в первые три часа действия, а затем она снижалась практически до уровня контроля.

Таблица 8

Влияние гипоксии и CO<sub>2</sub> – среды на активность липоксигеназы в митохондриях растений гороха, сои и кукурузы

вариант	горох		соя		кукуруза	
	Удельная активность (мкМоль/ мг белка)	% от контроля	Удельная активность (мкМоль/ мг белка)	% от контроля	Удельная активность (мкМоль/ мг белка)	% от контроля
<b>3 часа</b>						
воздух	96,0 ± 10,2	100	129,6 ± 14,2	100	61,2 ± 14,0	100
гипоксия	170,1 ± 15,0	177	188,4 ± 21,1	145,4	114,8 ± 20,5	188
CO <sub>2</sub> - среда	145,8 ± 15,1	152	184,9 ± 13,9	142,7	43,8 ± 9,0	72
<b>6 часов</b>						
воздух	158,5 ± 7,6	100	145,9 ± 18,7	100	126,8 ± 20,0	100
гипоксия	156,2 ± 9,1	99	202,8 ± 23,6	139	141,9 ± 26,4	112
CO <sub>2</sub> - среда	163,2 ± 7,0	103	447,1 ± 54,2	306,4	238,8 ± 44,0	188
<b>24 часа</b>						
воздух	105,6 ± 10,9	100	91,7 ± 9,7	100	42,9 ± 2,1	100
гипоксия	87,9 ± 9,2	83	90,7 ± 10,3	98,9	54,7 ± 9,6	128
CO <sub>2</sub> - среда	55,8 ± 6,11	53	132,3 ± 14,8	144,3	75,0 ± 11,0	175

Таким образом, проведенные исследования показали присутствие липоксигеназы в митохондриях исследуемых растений (рис. 13, 14). Об этом свидетельствовало проведенное специфическое проявление электрофореграмм. Увеличение активности митохондриальной липоксигеназы в условиях аноксии отмечали ранее [187] для клубней картофеля, а для проростков гороха, сои и кукурузы это было показано впервые. Впервые обнаружено, что высокие концентрации  $\text{CO}_2$  повышали активность митохондриальных липоксигеназ. Это способствует повышению в митохондриях растений фонда свободных радикалов, образующихся при дефиците кислорода. Ранее было установлено, что  $\text{CO}_2$  – среда подавляла активность не только ферментов цикла трикарбоновых кислот [48], но и активность алкогольдегидрогеназы АДГ и глутаматдекарбоксилазы ГДК [39], выступая в роли аллостерического регулятора их активности. В наших опытах это было показано и для липоксигеназ митохондрий исследуемых растений в условиях кратковременных экспозиций. Однако обнаружено, что только в первые 3-6 часов действия гипоксического стресса активность фермента возрастала как у неустойчивых проростков гороха, так и достаточно устойчивых проростков сои и кукурузы. К концу экспозиции активность митохондриальной липоксигеназы падала, но только у неустойчивых проростков гороха.

Можно предположить, что липоксигеназный путь образования гидропероксидных радикалов в митохондриях вносит значительный вклад в процессы пероксидации липидов у растений в условиях гипоксии, но это характерно лишь для небольших экспозиций (3-6 часов). Полученные данные хорошо совпадают с результатами ранее проведенных опытов, в которых показано накопление супероксидного анион-радикала и пероксида водорода в митохондриях исследуемых растений именно в первые 3-6 часов действия гипоксического стресса. В дальнейшем в процессы свободнорадикального окисления у растений в условиях гипоксии могли вносить вклад и другие

системы, например, связанные с подавлением антирадикальной защиты на уровне ферментов и низкомолекулярных антиоксидантов.

### 8.3. Активность митохондриальной СОД у растений в условиях гипоксии и среды $\text{CO}_2$

Как уже было отмечено ранее [59], содержание АФК в клетках регулируется соотношением процессов их образования и детоксикации. В связи с этим в дальнейших опытах было проведено определение активности одного из антиоксидантных ферментов СОД в условиях кратковременной гипоксии и  $\text{CO}_2$  – среды. В митохондриях растений супероксиддисмутаза представлена изоформой, содержащей в активном центре атом марганца (Mn-СОД) [6, 199].

Как видно из данных, представленных в таблице 9, активность митохондриальной Mn-СОД у неустойчивых к гипоксии проростков гороха была на уровне контрольных растений в первые часы действия газовых сред, и возрастала почти вдвое при суточной экспозиции. У среднеустойчивых проростках сои активность митохондриальной супероксиддисмутазы значительно повышалась уже на ранних сроках экспозиции у растений как при гипоксии, так и в  $\text{CO}_2$  – среде. Однако к концу опыта она падала, но была еще значительной у растений, находящихся в условиях  $\text{CO}_2$  – среды. В проростках кукурузы активность митохондриальной супероксиддисмутазы также менялась. Она через 6 часов гипоксии возрастала в 1,5 раза, но затем к концу опыта начинала снижаться. В  $\text{CO}_2$  – среде активность фермента возрастала с 6 часовой экспозиции, и до конца опыта достигая 146 % от уровня аэрируемых растений.



Таблица 9

Влияние гипоксии и CO<sub>2</sub> – среды на активность супероксиддисмутазы в митохондриях растений гороха, сои и кукурузы

вариант	горох		соя		кукуруза	
	Удел. активность (мкМоль/ мгбелка)	% от контроля	Удел. активность (мкМоль/ мгбелка)	% от контроля	Удел. активность (мкМоль/ мгбелка)	% от контроля
<b>3 часа</b>						
воздух	0,171 ± 0,005	100	0,101 ± 0,008	100	0,127 ± 0,004	100
гипоксия	0,187 ± 0,040	109	0,308 ± 0,011	305	0,137 ± 0,023	108
CO <sub>2</sub> - среда	0,123 ± 0,020	72	0,307 ± 0,004	304	0,131 ± 0,016	103
<b>6 часов</b>						
воздух	0,167 ± 0,015	100	0,478 ± 0,060	100	0,191 ± 0,003	100
гипоксия	0,170 ± 0,010	102	0,470 ± 0,050	98	0,280 ± 0,020	147
CO <sub>2</sub> - среда	0,205 ± 0,030	122	0,280 ± 0,035	59	0,230 ± 0,040	122
<b>24 часа</b>						
воздух	0,088 ± 0,020	100	0,120 ± 0,009	100	0,083 ± 0,009	100
гипоксия	0,141 ± 0,020	160	0,132 ± 0,010	110	0,100 ± 0,008	121
CO <sub>2</sub> - среда	0,164 ± 0,020	186	0,247 ± 0,025	228	0,121 ± 0,001	146

Можно предположить, что митохондриальная Mn-СОД вносит значительный вклад в регуляцию содержания супероксидного анион-радикала в условиях гипоксии, особенно у неустойчивых проростков гороха. Однако увеличение активности Mn-СОД в митохондриях растений гороха не могло сдержать накопления в них активных форм кислорода, в частности супероксидного радикала и пероксида водорода, в отличие от более устойчивых проростков сои и кукурузы, где содержание их существенно падало после возрастания к концу опыта параллельно с увеличением активности СОД.

#### 8.4. Образование АФК в хлоропластах растений при действии гипоксии и $\text{CO}_2$ – среды

Ранее было отмечено [210], что хлоропласты также могут быть источником образования активных радикалов в клетках растений. При этом образование супероксидного анион-радикала происходит в реакционных центрах фотосистем хлоропластов растений [128]. В связи с этим изучали возможность накопления в темновых условиях супероксидного анион-радикала в хлоропластах растений при кратковременной гипоксии и  $\text{CO}_2$  – среды. Как показали опыты (рис. 15), в хлоропластах растений гороха уже в первые три часа действия гипоксии и  $\text{CO}_2$  – среды в темновых условиях обнаружено значительное (2,5 – 2,8 кратное) накопление супероксидного анион-радикала. Через 6 и 24 часа действия на растения гипоксии и среды диоксида углерода произошло снижение данного вида АФК в хлоропластах.

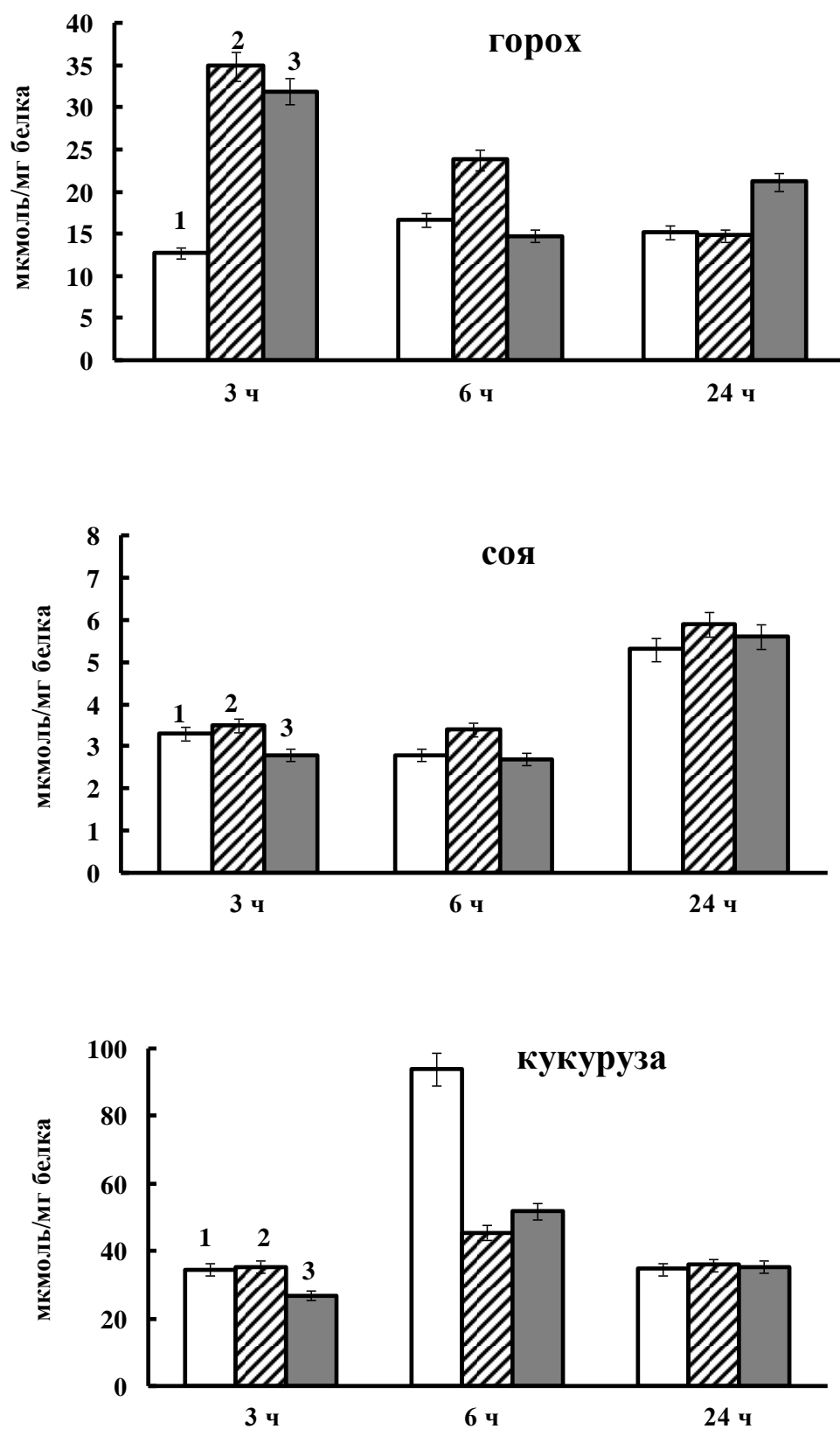


Рис. 15. Влияние условий гипоксии и  $\text{CO}_2$  – среды на содержание супероксидного анион-радикала в хлоропластах растений (1 – контроль; 2 – гипоксия; 3 –  $\text{CO}_2$ -среда)

Однако содержание супероксидного анион-радикала в хлоропластах растений сохранялось в  $\text{CO}_2$  – среде почти на 40 % выше контроля. В хлоропластах более устойчивый растений сои в первые часы опыта количество супероксидного анион-радикала не подвергалось существенному изменению как при действии гипоксии, так и  $\text{CO}_2$  – среды. В хлоропластах растений кукурузы содержание супероксидного анион-радикала после небольшого снижения к 24 часам возвращалось к уровню аэрируемых растений.

Таким образом, полученные данные показали, что в хлоропластах в темновых условиях при действии на растения гипоксического стресса происходило накопление супероксидного анион-радикала, но только у неустойчивых проростков гороха. При этом у более устойчивых растений сои и кукурузы подобного накопления супероксидного анион-радикала в хлоропластах не происходило.

В ряде работ было показано [74], что в условиях почвенной гипоксии в клетках проростков ячменя происходило накопление пероксида водорода, наиболее стабильного типа АФК, но в постстрессовый период его содержание снижалось до исходного уровня. Ранее в приведенных нами опытах было отмечено накопление пероксида водорода не только в тканевых гомогенатах, но и в митохондриях исследуемых растений в условиях гипоксического стресса.

Как показали наши опыты (рис. 16), в хлоропластах проростков гороха обнаружено значительное накопление пероксида водорода уже с первых часов нахождения растений в условиях гипоксии (до 376 % от контроля). При действии  $\text{CO}_2$  – среды это увеличение составило 280 %. В последующие часы содержание пероксида водорода сохранялось на таком же высоком уровне. К концу опыта (24 ч) в условиях гипоксии содержание пероксида водорода в хлоропластах растений гороха превышало уровень контроля в 2,5 раза, а в  $\text{CO}_2$  – среде даже возрастала в 6 раз.

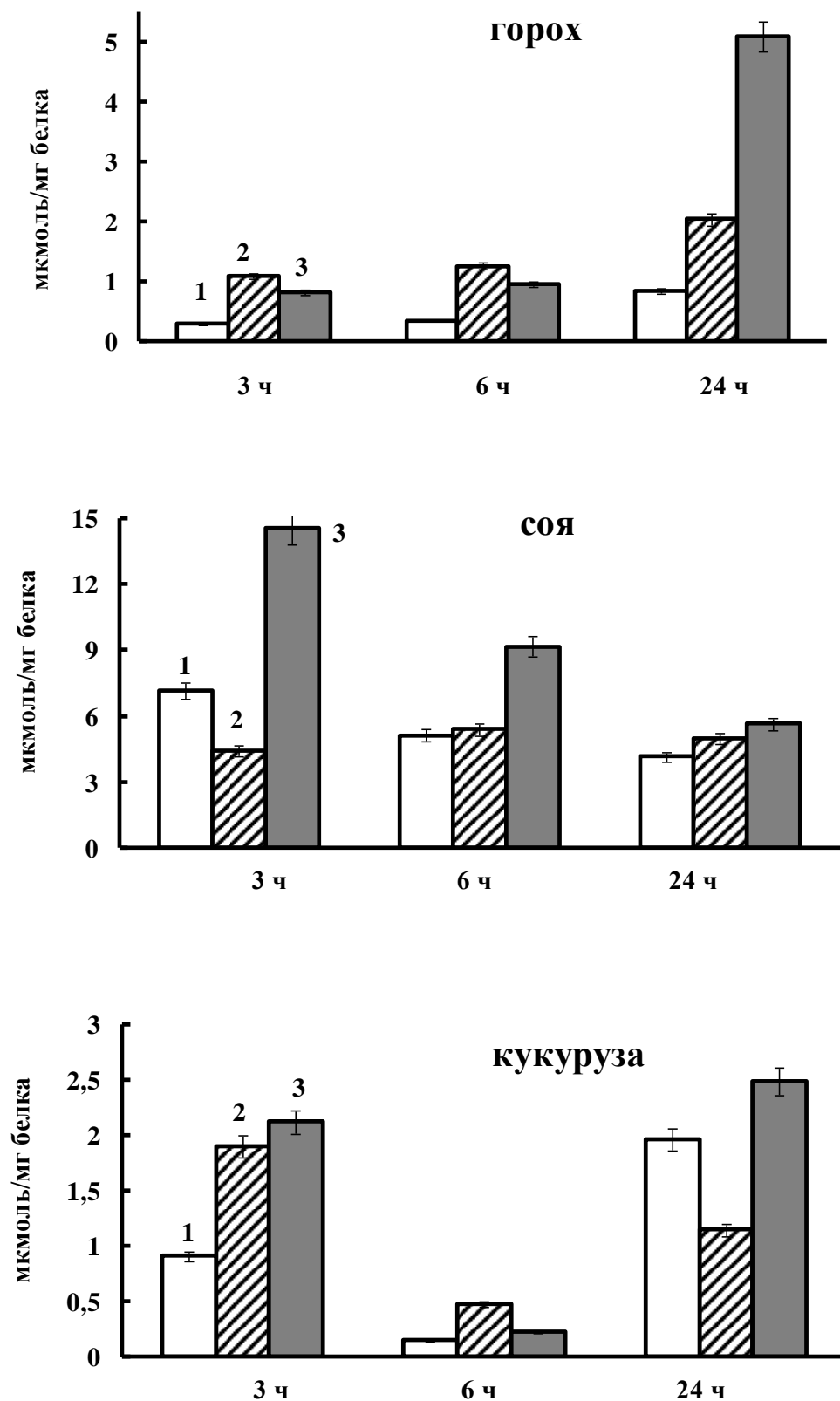


Рис. 16. Действие гипоксии и CO<sub>2</sub> – среды на содержание пероксида водорода в хлоропластах растений; (1 – контроль; 2 – гипоксия; 3 – CO<sub>2</sub>-среда)

В хлоропластах растений сои столь значительное двукратное накопление пероксида водорода происходило только при действии  $\text{CO}_2$  – среды, которое затем падало до величины аэрируемых растений. При гипоксии содержание пероксида водорода колебалось на уровне контроля.

В хлоропластах среднеустойчивых растений кукурузы только в первые 3-6 часов опыта наблюдалось увеличение содержания пероксида как при действии гипоксии, так и среды  $\text{CO}_2$ . Затем его содержание падало и к концу опыта во всех газовых средах снижалось до уровня аэрируемых растений.

Таким образом, проведенные нами исследования показали, что в условиях гипоксии возможно накопление как супероксидного анион-радикала, так и пероксида водорода в хлоропластах растений. Однако более значительно это отмечалось для неустойчивых растений гороха, и было менее характерно для более устойчивых растений сои и кукурузы.

#### 8.5. Действие гипоксии и $\text{CO}_2$ – среды на хлоропластную липоксигеназу в растениях

Как известно [166] липоксигеназа встречается в различных клеточных компартментах, включая и хлоропласты. В связи с этим нами были предприняты попытки обнаружения присутствия данного фермента в хлоропластах исследуемых растений. С этой целью из растений, подвергнутых 3-х часовому воздействию гипоксии и  $\text{CO}_2$  – среды, выделяли хлоропласты, белки которых затем разделяли методом электрофореза с введением крахмала в гель. Проводили специфическое окрашивание с использованием в качестве субстрата линолевой кислоты. Результаты опытов представлены на рис. 17, 18. Как видно из этих представленных данных, действие в течение 3 часов гипоксии и  $\text{CO}_2$  – среды не вызывало у исследуемых растений не появления новых изоформ липоксигеназ в хлоропластах, не изменения величины  $R_f$  данного фермента.

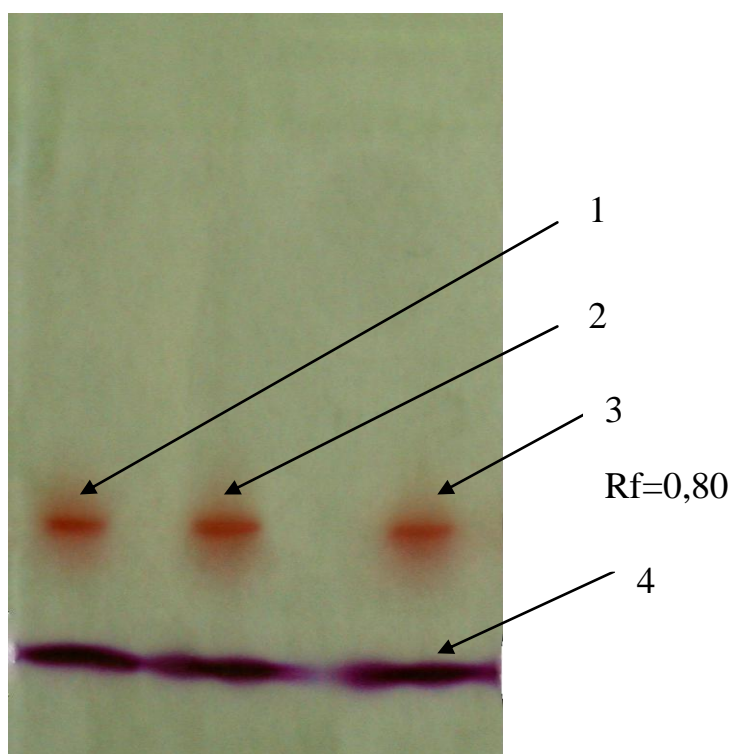


Рис. 17. Специфическое проявление липоксигеназы хлоропластов растений гороха, подвергнутых 3 часовому воздействию условий гипоксии и  $\text{CO}_2$ -среды:

1 – воздух; 2 – гипоксия; 3 –  $\text{CO}_2$ -среда; 4 – фронт красителя бромфенолового синего

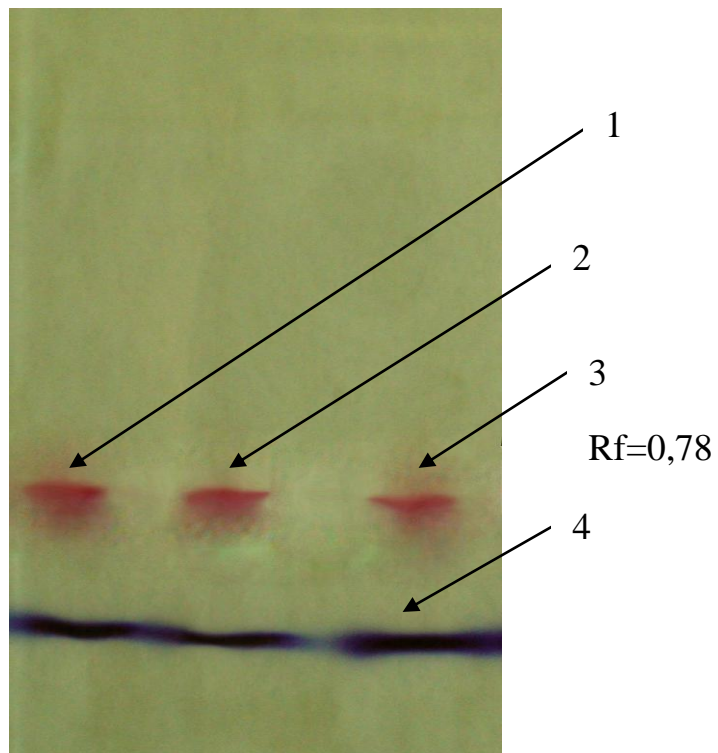


Рис. 18. Специфическое проявление липоксигеназы хлоропластов растений сои, подвергнутых 3 часовому воздействию условий гипоксии и  $\text{CO}_2$ -среды:

1 – воздух; 2 – гипоксия; 3 –  $\text{CO}_2$ -среда; 4 – фронт красителя бромфенолового синего



При определении активности липоксигеназы в хлоропластах проростки гороха, сои и кукурузы помещали на 3, 6 и 24 часа в условия разных газовых сред. Было показано (табл. 10), что как у неустойчивых проростков гороха, так и более устойчивых растений сои, активность хлоропластной липоксигеназы падала в течение всего опыта. Исключение составляла только липоксигеназа, выделенная из хлоропластов проростков кукурузы, которая возрастала через 24 часа действия гипоксии в 2,5 раза и  $\text{CO}_2$  – среды почти в 4 раза.

Таким образом, проведенные нами опыты показали значительное возрастание активности липоксигеназы, но только в хлоропластах растений кукурузы в конце опыта. При этом в первые 3-6 часов действия газовых сред изменения активности липоксигеназы в хлоропластах всех исследуемых растений не происходило, в отличие от того, что наблюдалось в митохондриях этих растений.

Таблица 10

Влияние гипоксии и CO<sub>2</sub> – среды на активность липоксигеназы в хлоропластах растений гороха, сои и кукурузы

вариант	горох		соя		кукуруза	
	Удельная активность (мкМоль/ мг белка)	% от контроля	Удельная активность (мкМоль/ мг белка)	% от контроля	Удельная активность (мкМоль/ мг белка)	% от контроля
<b>3 часа</b>						
воздух	174,8 ± 8,3	100	980,2 ± 108,3	100	298,9 ± 13,7	100
гипоксия	167,1 ± 8,7	96	713,3 ± 85,7	73	79,6 ± 15,7	27
CO <sub>2</sub> - среда	124,1 ± 13,4	71	574,1 ± 64,2	58,6	135,6 ± 27,6	45
<b>6 часов</b>						
воздух	192,4 ± 18,1	100	540,1 ± 67,2	100	314,9 ± 50,5	100
гипоксия	123,5 ± 14,6	64	481,3 ± 59,0	89,1	166,7 ± 10,7	53
CO <sub>2</sub> - среда	108,5 ± 10,1	56	397,6 ± 45,3	73,6	201,7 ± 24,6	64
<b>24 часа</b>						
воздух	163,2 ± 18,7	100	413,3 ± 48,9	100	38,8 ± 4,0	100
гипоксия	155,9 ± 17,6	96	168,9 ± 20,8	40,9	95,7 ± 6,8	247
CO <sub>2</sub> - среда	147,7 ± 15,3	91	393,8 ± 41,3	95,3	160,0 ± 15,0	412

## 8.6. Влияние гипоксии и $\text{CO}_2$ – среды на активность хлоропластной СОД у разных растений

Установлено [6], что в хлоропластах растений встречается несколько изоформ антиоксидантного фермента супероксиддисмутазы, содержащих в активных центрах атомы металлов, такие как Fe-СОД, CuZn-СОД. Данный фермент участвует в нейтрализации первого продукта неполного восстановления молекулярного кислорода – супероксидного анион-радикала. В связи с этим супероксиддисмутаза поддерживает содержание АФК на безвредном для растительных клеток уровне.

Как видно из приведенных в табл. 11 данных, активность хлоропластной супероксиддисмутазы у неустойчивых к гипоксии проростков гороха на протяжении всего опыта практически не превышала уровня аэрируемых растений. Особенно низкой активность фермента была в первые часы экспозиций проростков в  $\text{CO}_2$  – среде. По сравнению с неустойчивыми растениями гороха, у среднеустойчивых проростков сои активность хлоропластной супероксиддисмутазы менялась более значительно. В первые 3 часа опыта активность хлоропластной супероксиддисмутазы при действии газовых сред резко возрастала и в 3 раза превышала уровень аэрируемых растений. Однако затем она начинала падать и стала ниже контроля у растений в условиях гипоксии, а в  $\text{CO}_2$  – среде приближалась к нему. В среднеустойчивых проростках кукурузы активность хлоропластной супероксиддисмутазы менялась, но только при более поздних экспозициях. В первые три часа активность фермента не превышала контрольных значений. Однако отмечалось повышение активности СОД в хлоропластах при действии 6-ти часовой гипоксии на 73%, а через 24 активности фермента в  $\text{CO}_2$  среде возрастала уже в 2,5 раза. Нужно отметить, что такое существенное повышение активности СОД в этот период в хлоропластах соответствует и большей активности липоксигеназы.

Таблица 11

Влияние гипоксии и CO<sub>2</sub> – среды на активность супероксиддисмутазы в хлоропластах растений гороха, сои и кукурузы

вариант	горох		соя		кукуруза	
	Удельная активность (мкМоль/ мг белка)	% от контроля	Удельная активность (мкМоль/ мг белка)	% от контроля	Удельная активность (мкМоль/ мг белка)	% от контроля
<b>3 часа</b>						
воздух	0,179 ± 0,050	100	0,098 ± 0,006	100	0,240 ± 0,036	100
гипоксия	0,160 ± 0,007	89	0,305 ± 0,045	311	0,163 ± 0,007	68
CO <sub>2</sub> - среда	0,072 ± 0,001	40	0,308 ± 0,026	314	0,225 ± 0,002	94
<b>6 часов</b>						
воздух	0,212 ± 0,040	100	0,434 ± 0,060	100	0,346 ± 0,010	100
гипоксия	0,159 ± 0,006	75	0,286 ± 0,045	66	0,600 ± 0,080	173
CO <sub>2</sub> - среда	0,189 ± 0,052	89	0,206 ± 0,020	47	0,240 ± 0,020	71
<b>24 часа</b>						
воздух	0,163 ± 0,010	100	0,096 ± 0,005	100	0,124 ± 0,030	100
гипоксия	0,154 ± 0,040	94	0,044 ± 0,006	46	0,088 ± 0,009	71
CO <sub>2</sub> - среда	0,178 ± 0,030	109	0,099 ± 0,010	103	0,314 ± 0,030	253

Это позволяет предположить, что активация липоксигеназного пути образования АФК в хлоропластах при действии на растения кукурузы  $\text{CO}_2$  – среды компенсируется и большим возрастанием в этот период антиоксидантного фермента СОД. Однако такое соотношение активности липоксигеназы и СОД в хлоропластах более устойчивых, чем горох, растениях сои, не обнаружено. На фоне низкой активности липоксигеназы при 3-часовой гипоксии отмечалось резкое возрастание активности этой формы СОД. Вероятно, это связано и с особенностями обменных процессов данных растений кукурузы и сои.

Таким образом, полученные данные по изменению активность супероксиддисмутазы свидетельствуют о том, что этот фермент может вносить вклад в снижение содержания супероксидного анион-радикала в хлоропластах более устойчивых к гипоксии проростках сои и кукурузы, но в разные периоды. У проростков сои это наблюдалось в первые часы действия газовых сред, а у кукурузы – только через 6 или 24 часа экспозиции.

#### 8.7. Процесс образования АФК в цитоплазматической фракции клеток растений в условиях гипоксии и $\text{CO}_2$ - среды

В опытах с растениями после выделения митохондриальной и хлоропластной фракций, оставшаяся часть относится к цитоплазматической фракции, в которой также провели исследование процессов образования разных типов АФК после 3, 6 и 24 часового действия разных газовых сред.

Было показано (рис. 19), что при трехчасовой экспозиции в цитоплазме растений гороха количество супероксидного анион-радикала оставалось на уровне аэрируемых растений. Однако к 6 часам содержание данной АФК начинало постепенно возрастать, и к 24 часам содержание супероксида увеличилось при действии гипоксии в 2,5 раза, а  $\text{CO}_2$  – среды в 3,5 раза. В цитоплазме среднеустойчивых растений сои на протяжении всех часов опыта гипоксический стресс не вызывал значительного накопления супероксида.

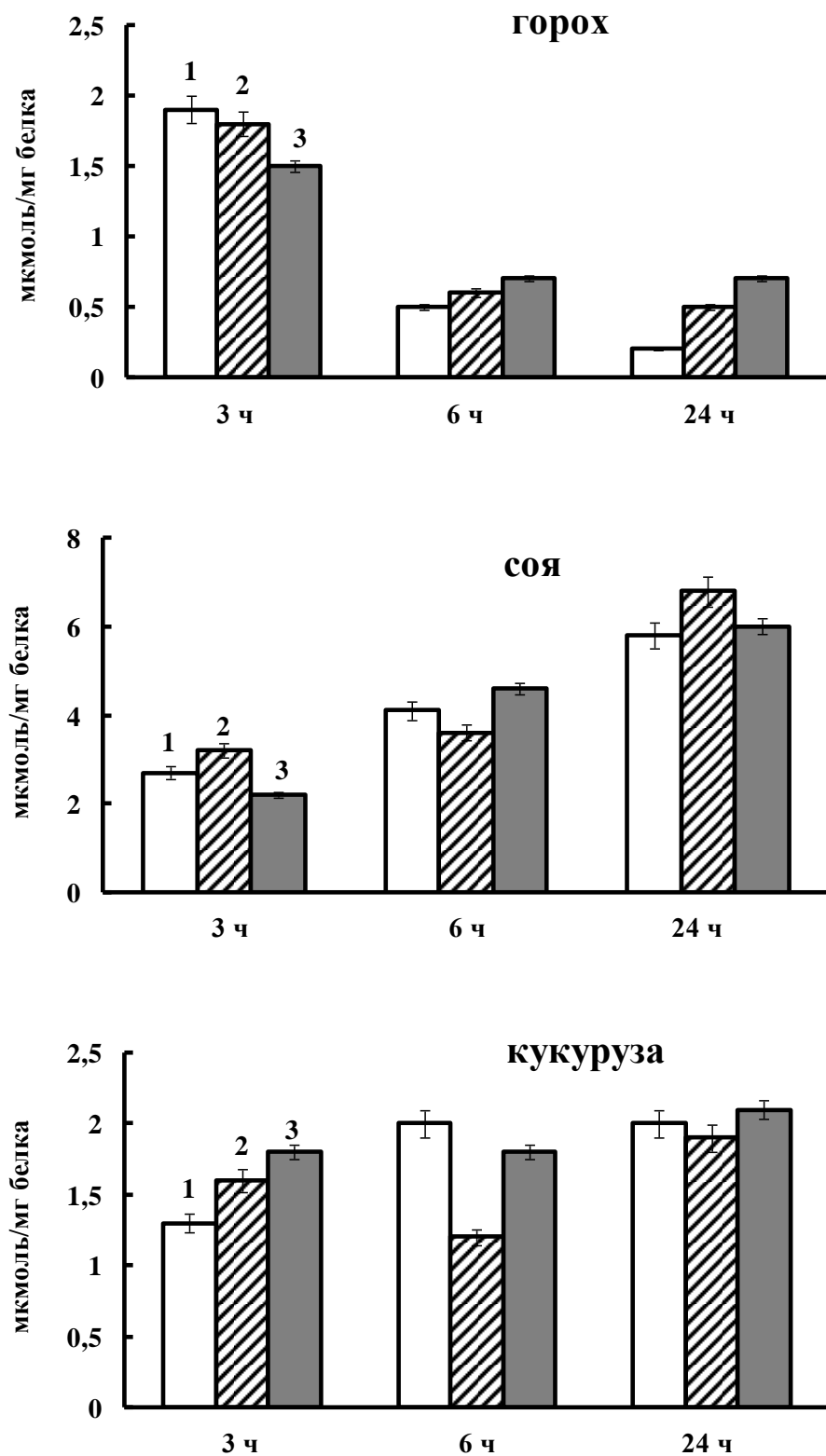


Рис. 19. Содержание супероксидного анион-радикала в цитоплазме растений в условиях гипоксии и  $\text{CO}_2$  – среды (1 – контроль; 2 – гипоксия; 3 –  $\text{CO}_2$ -среда)

В отличие от этого в цитоплазме растений кукурузы отмечалось небольшое (на 20-40%) накопление супероксидного анион-радикала, но только в первые часы действия гипоксии и  $\text{CO}_2$  – среды. Дальнейшее нахождение растений в стрессовых условиях не оказало влияния на содержание данного вида АФК.

Полученные нами данные показали, что в цитоплазматической фракции клеток растений в условиях действия гипоксического стресса у неустойчивых проростков гороха отмечалось накопление супероксидного анион-радикала, как в хлоропластах и митохондриях, так и в цитоплазме, особенно значительно в последние часы опыта. В отличие от этого, у более устойчивых растений сои и кукурузы таких резких изменений в содержании разных типов АФК не наблюдалось. При этом показано, что  $\text{CO}_2$  – среда влияла на процессы накопления супероксида в цитоплазматической фракции более значительно, чем условия обычной гипоксии.

Ранее в наших опытах было обнаружено существенное накопление пероксида водорода в митохондриях и хлоропластах растений при действии кратковременной до суток гипоксии. В связи с этим исследовали изменение содержания пероксида водорода в цитоплазматической фракции клеток данных растений, отличающихся степенью своей устойчивости к условиям гипоксии.

Как показали результаты опытов (рис. 20), в цитоплазматической фракции не отмечалось значительного накопления данной АФК во все сроки действия гипоксии. В то же время для проростков сои было характерно накопление пероксида водорода в цитоплазме клеток в первые часы опыта при действии как гипоксии, так и особенно  $\text{CO}_2$  – среды. К концу опыта количество пероксида начинало снижаться у проростков, находящихся в условиях гипоксии, а в условиях  $\text{CO}_2$  – среды оставалось еще выше уровня контроля. В проростках среднеустойчивых кукурузы в цитоплазматической фракции содержание пероксида водорода на протяжении всех часов опыта была стабильно ниже, чем у аэрируемых растений.

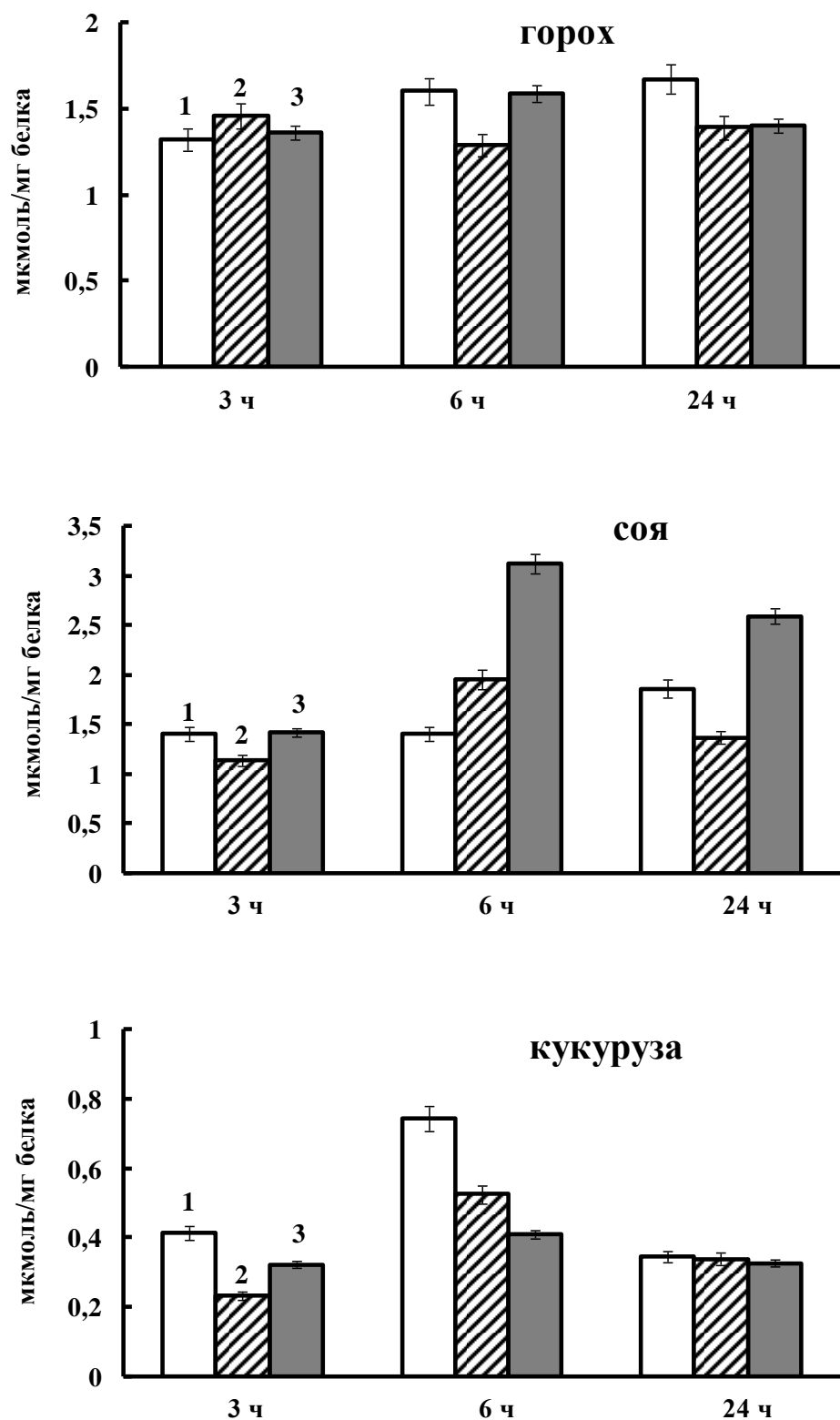


Рис. 20. Содержание пероксида водорода в цитоплазме растений в условиях гипоксии и CO<sub>2</sub> – среды (1 – контроль; 2 – гипоксия; 3 – CO<sub>2</sub>-среда)



Таким образом, проведенные нами исследования не выявили значительного влияния разных газовых сред на накопление пероксида водорода в цитоплазматической фракции исследуемых растений, в отличие от митохондриальной и хлоропластной фракций, где эти отличия проявлялись более существенно, хотя и в разной степени.

#### 8.8. Активность липоксигеназы в цитоплазме растений в условиях гипоксии и $\text{CO}_2$ - среды

В целом ряде работ [166] было показано присутствие липоксигеназы и в цитоплазме клеток растений. В связи с этим в следующей серии опытов была проанализирована активность данного фермента в цитоплазме различных растений в условиях гипоксии и действии  $\text{CO}_2$  – среды. В цитоплазме методом электрофореза была обнаружена липоксигеназа с  $R_f$  0,66. Это отличает ее от  $R_f$  митохондриальной (0,72) и хлоропластной (0,80) у проростков гороха. Подобные различия в величинах  $R_f$  фермента свидетельствуют о том, что это разные изоферменты, отличающиеся не только локализацией, но и своими физико-химическими свойствами. Действие гипоксии (рис. 21, 22) и  $\text{CO}_2$  – среды в течение 3 часов не вызвало как появления новых изоформ, так и изменения свойств фермента, на это указывает величина  $R_f$  в этих условиях.

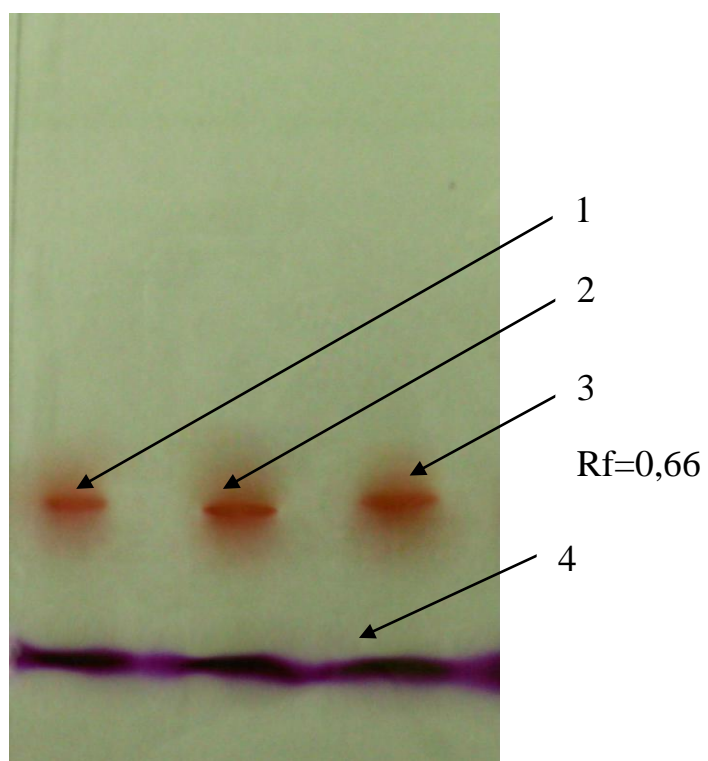


Рис. 21. Специфическое проявление липоксигеназы цитоплазмы растений гороха, подвергнутых 3 часовому действию гипоксии и  $\text{CO}_2$ -среды: 1 – воздух; 2 – гипоксия; 3 –  $\text{CO}_2$ -среда; 4 – фронт красителя бромфенолового синего

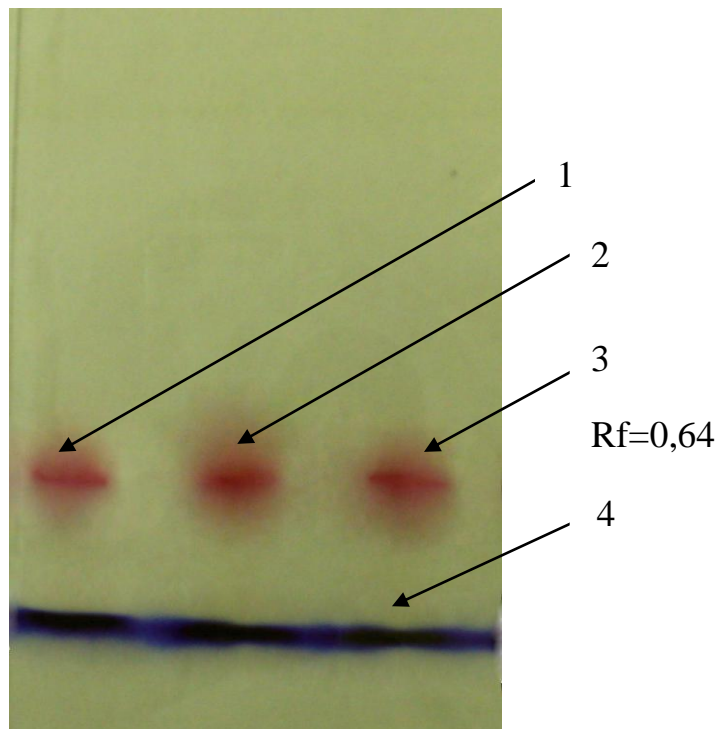


Рис. 22. Специфическое проявление липоксигеназы цитоплазмы растений сои, подвергнутых 3 часовому действию гипоксии и  $\text{CO}_2$ -среды: 1 – воздух; 2 – гипоксия; 3 –  $\text{CO}_2$ -среда; 4 – фронт красителя бромфенолового синего

При определении активности липоксигеназы в цитоплазматической фракции проростки гороха, сои и кукурузы помещали на 3, 6 и 24 часа в условия разных газовых сред. Было показано (табл. 12), что через три часа действия гипоксии и  $\text{CO}_2$  – среды на проростки гороха активность цитоплазматической липоксигеназы была ниже уровня контрольных растений как при действии гипоксии, так и  $\text{CO}_2$  – среды. Активность фермента в цитоплазме проростков гороха при действии  $\text{CO}_2$  – среды через 6 часов превысила контроль на 17 %. В остальных вариантах опыта активность фермента находилась на уровне аэрируемых растений. Для проростков сои было отмечено сначала снижение активности цитоплазматической липоксигеназы, а затем ее повышение на 25-30 % по отношению к контролю. Активность цитоплазматической липоксигеназы у проростков кукурузы менялась более значительно, особенно через 24 часа действия газовых сред. При действии гипоксии активность липоксигеназы увеличилась на 20 %, а  $\text{CO}_2$  – среда вызвала практически четырехкратное повышение активности данного фермента.

Проведенные нами опыты показали, что в первые часы действия газовых сред изменение активности липоксигеназы у всех исследуемых растений не происходило, в отличие от значительных изменений активности фермента в митохондриях.

Таблица 12

Влияние гипоксии и CO<sub>2</sub> – среды на активность липоксигеназы в цитоплазме растений гороха, сои и кукурузы

вариант	горох		соя		кукуруза	
	Удельная активность (мкМоль/ мг белка)	% от контроля	Удельная активность (мкМоль/ мг белка)	% от контроля	Удельная активность (мкМоль/ мг белка)	% от контроля
<b>3 часа</b>						
воздух	98,5 ± 7,6	100	447,0 ± 47,3	100	183,1 ± 30,3	100
гипоксия	69,1 ± 8,1	70	162,7 ± 19,8	36	95,4 ± 1,7	52
CO <sub>2</sub> - среда	95,8 ± 10,5	97	288,2 ± 30,5	64,5	115,3 ± 8,7	63
<b>6 часов</b>						
воздух	92,7 ± 4,6	100	420,9 ± 48,9	100	287,5 ± 38,9	100
гипоксия	92,2 ± 10,2	99	389,0 ± 41,1	92,4	148,5 ± 24,0	52
CO <sub>2</sub> - среда	108,9 ± 10,1	117	512,9 ± 55,4	121,9	251,2 ± 35,4	87
<b>24 часа</b>						
воздух	101,0 ± 10,2	100	151,7 ± 17,9	100	79,6 ± 11,8	100
гипоксия	87,1 ± 9,3	86	216,1 ± 22,1	142,4	95,7 ± 15,0	120
CO <sub>2</sub> - среда	91,3 ± 9,6	90	224,6 ± 27,6	148	295,0 ± 15,0	371

### 8.9. Действие гипоксии и $\text{CO}_2$ - среды на активность цитоплазматической СОД у растений

Супероксиддисмутаза является одним из ключевых ферментов, участвующих в детоксикации реакционно-способных форм кислорода. В цитоплазме растительных клеток встречается одна их форм супероксиддисмутазы CuZn-СОД [84].

Как видно из данных, представленных в табл. 13, активность СОД у неустойчивых к гипоксии проростков гороха в цитоплазме была наиболее низкая и падала при действии газовых сред. В среднеустойчивых проростках сои активность СОД менялась более значительно. Уже в первые часы опыта в цитоплазме активность супероксиддисмутазы почти в 3 раза превышала уровень контроля при действии на растения гипоксии, так и  $\text{CO}_2$  – среды. Однако затем активность фермента снижалась до уровня контроля. В проростках кукурузы активность СОД в условиях газовых сред в исследуемой клеточной фракции повышалась. В начале опыта активность фермента возрастала на 23-43 %. К концу опыта активность супероксиддисмутазы у растений в условиях гипоксии несколько снижалась, а в  $\text{CO}_2$  – среде повышалась почти в 2 раза.

Таким образом, полученные данные по изменению активности антиоксидантного фермента СОД согласуются с результатами наших предыдущих опытов по исследованию содержания различных типов АФК в растениях гороха, сои и кукурузы в условиях гипоксии, где было показано значительное накопление АФК в клетках неустойчивых к гипоксии проростках гороха, в отличие от клеток более устойчивых растений сои и кукурузы.

Таблица 13

Влияние гипоксии и CO<sub>2</sub> – среды на активность супероксиддисмутазы в цитоплазме растений гороха, сои и кукурузы

вариант	горох		соя		кукуруза	
	Удел. активность (мкМоль/ мгбелка)	% от контроля	Удел. активность (мкМоль/ мгбелка)	% от контроля	Удел. активность (мкМоль/ мгбелка)	% от контроля
<b>3 часа</b>						
воздух	0,034 ± 0,004	100	0,170 ± 0,020	100	0,013 ± 0,001	100
гипоксия	0,015 ± 0,004	44	0,528 ± 0,065	310	0,016 ± 0,001	123
CO <sub>2</sub> - среда	0,019 ± 0,007	56	0,550 ± 0,070	324	0,018 ± 0,001	143
<b>6 часов</b>						
воздух	0,057 ± 0,006	100	0,217 ± 0,040	100	0,012 ± 0,002	100
гипоксия	0,024 ± 0,009	42	0,138 ± 0,025	64	0,022 ± 0,003	183
CO <sub>2</sub> - среда	0,022 ± 0,003	39	0,072 ± 0,005	33	0,016 ± 0,002	139
<b>24 часа</b>						
воздух	0,015 ± 0,002	100	0,130 ± 0,009	100	0,010 ± 0,001	100
гипоксия	0,0097 ± 0,0008	65	0,128 ± 0,020	93	0,012 ± 0,001	124
CO <sub>2</sub> - среда	0,0079 ± 0,0009	53	0,127 ± 0,030	90	0,017 ± 0,003	167

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В условиях дефицита кислорода в растениях происходят значительные изменения метаболических процессов, изменяется скорость процессов перекисидации липидов, связанных с окислением полиненасыщенных жирных кислот. При действии данного стрессора в клетках растений создаются условия для процессов образования различных типов АФК, таких как супероксидный анион-радикал, гидропероксидный радикал, пероксид водорода, гидроксильный радикал и ряд других. Известна как положительная, так и отрицательная роль АФК. С одной стороны, избыточная концентрация АФК может привести к нарушению различных клеточных структур, повреждению мембран. Высокая активность АФК позволяет им реагировать с функциональными и структурными компонентами клеток, а также с их метаболитами. С другой стороны, АФК могут выполнять сигнальную роль в клетках, участвуют в управлении процессами роста и развития. Воспринимая сигналы об изменении концентрации кислорода в окружающей среде, различные АФК могут играть роль вторичных мессенджеров, что позволяет организмам включать механизмы адаптации к действию различных стрессовых факторов, включая дефицит кислорода. Адаптация растений к условиям гипоксии включает в себя не только анатомо-морфологические, но и физиологические и метаболические механизмы, позволяющие растениям приспосабливаться к изменяющимся условиям среды. Изучение механизмов адаптации растений является важным для выяснения особенностей их развития в условиях гипоксического стресса.

Проведенные нами исследования показали, что действие кратковременной гипоксии и среды высоких концентраций диоксида углерода на растения зависит от степени их устойчивости к данным стрессовым факторам. В клетках растений под влиянием дефицита кислорода и среды высоких концентраций диоксида углерода происходили различные изменения в процессах свободнорадикального окисления, образования



различных типов АФК и активности ферментов. В условиях гипоксии у неустойчивых растений гороха процессы свободнорадикального окисления значительно усиливались по сравнению с более устойчивыми растениями сои и кукурузы. При этом в клетках растений гороха происходило значительное накопление различных типов АФК – супероксидного анион-радикала, гидропероксида и пероксида водорода при действии гипоксии и  $\text{CO}_2$  – среды, в отличие от других растений.

Отмечено, что фитогормоны кинетин и эпибрассинолид снижали скорость образования свободных радикалов в клетках растений, уменьшали количество супероксидного анион-радикала и пероксида водорода в условиях дефицита кислорода и действия среды высоких концентраций углекислого газа, и это не зависело от степени их устойчивости.

Выявлено изменение активности различных антиоксидантных ферментов в растениях при гипоксии. Показано, что у более устойчивых растений активность антиоксидантных ферментов была значительно выше, чем у неустойчивых. При этом активность каталазы существенно возрастала в первые часы гипоксического стресса именно у устойчивых растений. С увеличением сроков действия гипоксии повышалась активность ферментов пероксидазной группы, что было характерно для более устойчивых растений. Высокая активность СОД была характерна также для более устойчивых к гипоксии растений сои и кукурузы, чем для проростков гороха. Это указывает на наличие определенной корреляции между степенью устойчивости растений к гипоксии и активностью антиоксидантных ферментов, включая СОД, что ранее было показано только для некоторых растений [54, 123].

Было показано, что  $\text{CO}_2$  – среда вызывала более значительные изменения активности ферментов антиоксидантной системы, чем условия обычной гипоксии. У растений сои особенно это было выражено в изменениях активности каталазы, когда уже при 3-часовой экспозиции в среде с  $\text{CO}_2$  ее активность возрастала до такой величины, которая была характерна для

фермента, но только через 24 часа действия гипоксии. Полученные данные подтверждают ранее высказанное предположение [35, 40, 47] о том, что диоксид углерода, накапливаясь как продукт дыхательного обмена, может включать системы адаптации растений к условиям гипоксического стресса, что позволяет отнести этот компонент газовой среды к группе низкомолекулярных сигнальных молекул.

Выявлено повышение активности липоксигеназы в исследуемых растениях в первые часы действия гипоксического стресса. Полученные данные могут свидетельствовать о том, что липоксигеназный ферментативный путь накопления АФК, наряду с неферментативным, являлся одинаково активным в клетках как у неустойчивых растений гороха, так и у более устойчивых растений сои и кукурузы, но только в первые часы действия гипоксии и  $\text{CO}_2$  – среды. Ранее участие липоксигеназного пути в процессах накопления АФК при гипоксии подвергались сомнению. Это связано с тем, что для липоксигеназ, как и всех диоксигеназ, для процесса окисления полиненасыщенных жирных кислот необходимо участие кислорода, содержание которого в клетках растений при гипоксии резко снижается.

В растениях гороха и сои показано присутствие фермента липоксигеназы не только в цитоплазме, хлоропластах, но и в митохондриях, о чем свидетельствовало проведенное электрофоретическое исследование и специфическое проявление электрофореграмм в присутствии линолевой кислоты. Установлено, что митохондриальная форма липоксигеназы отличалась по величине  $R_f$  от хлоропластной и цитоплазматической форм. Отмечено значительное повышение активности липоксигеназы в митохондриях у неустойчивых проростков гороха и более устойчивых растений сои через 3-6 часов действия гипоксического стресса. Для цитоплазматической и хлоропластной липоксигеназ это не было характерно.

Исследовали роль отдельных клеточных компартментов в образовании активных форм кислорода в растениях при действии кратковременной

гипоксии и среды высоких концентраций диоксида углерода. Для митохондрий растений гороха, сои и кукурузы показана возможность накопления супероксидного анион-радикала и пероксида водорода в условиях кратковременной гипоксии. При этом скорость образования разных типов АФК, таких как супероксидного анион-радикала и пероксида водорода зависела от сроков действия дефицита кислорода и степени устойчивости растений. Отмечено более эффективное действие  $\text{CO}_2$  – среды на процессы образования АФК в растения гороха, сои и кукурузы при кратковременных экспозициях (до суток), чем условия обычной гипоксии.

## ВЫВОДЫ

1. Методами хемилюминесценции и спектрофотометрии отмечена более высокая скорость процессов свободнорадикального окисления, образования АФК (супероксидного анион-радикала, гидропероксида, пероксида водорода) и более низкая активность СОД в тканях неустойчивых проростков гороха, в отличие от среднеустойчивых растений сои и кукурузы при действии кратковременной гипоксии (до суток).
2. У более устойчивых растений сои в первые часы действия гипоксии одновременно с СОД, увеличивалась и активность каталазы. В дальнейшем функция защиты от избыточного образования АФК переходила к ферментам пероксидазной группы, что подтверждалось повышением активности общей пероксидазы и аскорбатпероксидазы.
3. Выявлена способность фитогормонов кинетина и эпибрассинолида тормозить интенсивность процессов свободнорадикального окисления, накопления супероксидного анион-радикала и пероксида водорода в растениях с разной степенью устойчивости при действии гипоксического стресса. При этом влияние эпибрассинолида на данные процессы было более выраженным, чем действие кинетина.
4. Показано, что липоксигеназный путь накопления АФК был одинаково эффективным как для неустойчивых, так и для более устойчивых растений, но только в первые часы действия гипоксии. С увеличением сроков экспозиции могли включаться и другие механизмы накопления АФК.
5. Обнаружено присутствие митохондриальной липоксигеназы в клетках растений гороха и сои, о чем свидетельствовало проведенное электрофоретическое исследование и специфическое проявление фермента в присутствии линолевой кислоты. Установлено, что митохондриальная форма липоксигеназы отличалась по  $R_f$  от хлоропластной и цитоплазматической форм.

6. Отмечено изменение содержания АФК и активности СОД в митохондриях, хлоропластах и цитоплазме растений при действии условий гипоксии. При этом активность СОД существенно возрастала при гипоксии во всех клеточных компартментах устойчивых проростков сои, а у растений гороха это происходило лишь в митохондриях.
7. Показано, что в условиях  $\text{CO}_2$  – среды у растений, в отличие от обычной гипоксии, значительно усиливались процессы накопления АФК, повышалась активность антиоксидантных ферментов и липоксигеназы. Это подтверждает представление о том, что диоксид углерода можно отнести к группе сигнальных молекул, способных включать системы адаптации растений к условиям гипоксического стресса.
8. Проведенные исследования показали, что степень устойчивости различных растений к дефициту кислорода может определяться соотношением интенсивности свободнорадикальных процессов, содержанием АФК и активностью антиоксидантных ферментов в их клетках.

## ЛИТЕРАТУРА:

1. Авальбаев А.М. Физиологическое действие фитогормонов класса brassinosteroidов на растения / А.М. Авальбаев, Р.А. Юлдашев, Ф.М. Шакирова // Успехи современной биологии. – 2006. – Т. 126, № 2. – С. 192-200.
2. Активность липоксигеназы в растениях с индуцированной устойчивостью / Л.И. Ильинская [и др.] // Физиология растений. – 2000. – Т. 47, № 4. – С. 516-523.
3. Активные формы кислорода в проростках гороха при взаимодействии с симбиотическими и патогенными микроорганизмами / Г.Г. Васильева [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2007. – Т. 43, № 2. – С. 240-245.
4. Альмейда А.М. Молекулярные и физиологические механизмы избегания затопления и приобретения выносливости к нему у риса / А.М. Альмейда, В.Х. Вризен, Д. Ван дер Стрэттен // Физиология растений. – 2003. – Т. 50, № 6. – С. 832-840.
5. Андреев А.Ю. Метаболизм активных форм кислорода в митохондриях / А.Ю. Андреев, Ю.Е. Кушнарера, А.А. Старков // Биохимия. – 2005. – Т. 70, вып. 2. – С. 246-264.
6. Бараненко В. В. Супероксиддисмутаза в клетках растений / В. В. Бараненко // Цитология. – 2006. – Т. 48, № 6. – С. 465-474.
7. Белецкая Е.К. Физиологические основы устойчивости озимых культур к избытку влаги / Е.К. Белецкая. – Киев: Наукова думка, 1979. – 212 с.
8. Белопухов С.Л. Действие защитностимулирующих комплексов с эпином на рост и развитие льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) / С.Л. Белопухов, Е.В. Фокин // Изв. ТСХА. – 2004, вып. 1. – С. 32-39.
9. Брагина Т.В. Образование этилена и активация гидролитических ферментов при адаптации проростков кукурузы к частичному затоплению / Т.В. Брагина, Н.А. Родионова, Г.М. Гринева // Физиология растений. – 2003. – Т. 50, № 6. – С. 886-890.

10.Бурханова Э.А. Действие brassinosterоидов на синтез белка листьев пшеницы при нормальной температуре и тепловом шоке / Э.А. Бурханова, А.Б. Федина, О.Н. Кулаева // Тезисы докладов 2-го Совещания по brassinosterоидам, Минск, 11-13 июня 1991 г. – Минск, 1991. – С. 25.

11.Вартапетян Б.Б. Учение об анаэробном стрессе растений – новое направление в экологической физиологии, биохимии и молекулярной биологии растений. 2. Дальнейшее развитие проблемы / Б.Б. Вартапетян // Физиология растений. – 2006. – Т. 53, № 6. – С. 805-836.

12.Взаимодействие окиси азота и brassinosterоидов при их влиянии на фотосинтез и антиоксидантную систему томата / Ш. Хайят [и др.] // Физиология растений. – 2010. – Т. 57, № 2. – С. 224-233.

13.Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в живых системах / Ю.А. Владимирoв, О.А. Азизова, А.И. Деев // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. – 1991. – Т. 29. – С. 98-104.

14.Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция / Ю.А. Владимирoв, Е.В. Проскурина // Успехи биол. химии. – 2009. – Т. 49. – С. 341-388.

15.Влияние кадмия на CO<sub>2</sub>-газообмен, переменную флуоресценцию хлорофилла и уровень антиоксидантных ферментов в листьях гороха / Т.И. Балахнина [и др.] // Физиология растений. – 2005. – Т. 52, № 1. – С. 21-27.

16.Влияние низкой положительной температуры на содержание низкомолекулярных антиоксидантов и активность антиоксидантных ферментов в зеленых листьях ячменя / М.С. Радюк [и др.] // Физиология растений. – 2009. – Т. 56, № 2. – С. 193-199.

17.Влияние 24-эпибрассинолида на рост и дыхание корней проростков пшеницы в норме и в условиях засоления / В. В. Федяев [и др.] // Материалы Всероссийской научной конференции «Устойчивость организмов к неблагоприятным факторам внешней среды», Иркутск, 24-28 августа 2009 г. – Иркутск, 2009. – С. 492-495.

18. Влияние 24-эпибрассинолида на гормональный статус растений пшеницы при действии хлорида натрия / А.М. Авальбаева [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2010. – Т. 46, № 1. – С. 109-112.

19. Войчик М. Физиологические и ультраструктурные ответы растений арабидопсиса на избыток меди и изменение уровня восстановленного глутатиона / М. Войчик, Б. Павликовская-Павлега, А. Тукиендорф // Физиология растений. – 2009. – Т. 56, № 6. – С. 906-916.

20. Гавриленко В.Ф. Большой практикум по физиологии растений / В.Ф. Гавриленко, М.Е. Ладыгина, Л.М. Хандобина. – М.: Высш. шк., 1975. – 329 с.

21. Гарифзянов А.Р. Образование и физиологические реакции активных форм кислорода в клетках растений / А.Р. Гарифзянов, Н.Н. Жуков, В.В. Иванищев // Современные проблемы науки и образования. – 2011, № 2. – С. 26-32.

22. Гарник Е.Ю. Особенности изоферментных спектров анионных пероксидаз и супероксиддисмутазы в каллусной культуре *Larix sibirica* Ledeb. и *Larix gmelinii* Rupr. / Е.Ю. Гарник, Е.В. Лазарева, Ю.М. Константинов // Физиология растений. – 2004. – Т. 51, № 3. – С. 429-434.

23. Гипоксия и повреждения при набухании стареющих семян / Т.В. Веселова [и др.] // Физиология растений. – 2003. – Т. 50, № 6. – С. 930-937.

24. Глянько А.К. Структурные и функциональные особенности НАДФН-оксидазы растений (обзор) / А.К. Глянько, А.А. Ищенко // Прикладная биохимия и микробиология. – 2010. – Т. 46. – С. 509-518.

25. Гордон Л.Х. Образование супероксида редокс – системой плазмалеммы корневых клеток и её участие в детоксикации ксенобиотиков / Л.Х. Гордон, О.П. Колесников, Ф.М. Минибаева // Доклады Академии Наук. – 1999. – Т. 367, № 3. – С. 409-411.

26. Гормональный баланс проростков пшеницы и риса в условиях аноксии / В.В. Емельянов [и др.] // Физиология растений. – 2003. – Т. 50, № 6. – С. 922-929.



- 27.Гречкин А.Н. Липоксигеназная сигнальная система / А.Н. Гречкин, И.А. Тарчевский // Физиология растений. – 1999. – Т. 46, № 1. – С. 132-142.
- 28.Гринева Г.М. Регуляция метаболизма у растений при недостатке кислорода / Г.М. Гринева. – М.: Наука, 1975. – 278 с.
- 29.Гринева Г. М. Газообмен и дыхание корней кукурузы при частичном затоплении / Г. М. Гринева, Т. В. Брагина // Физиология растений. – 1998. – Т. 45, № 5. – С. 679-682.
- 30.Гродзинский А.М. Краткий справочник по физиологии растений / А.М. Гродзинский, Д.М. Гродзинский. – Киев: Наукова Думка, 1973. – 592 с.
- 31.Дмитриев А.П. Сигнальные молекулы растений для активации защитных реакций в ответ на биотический стресс / А.П. Дмитриев // Физиология растений. – 2003. – Т. 50, № 3. – С. 465-474.
32. Дэвис Г. Электрофорез / Г. Дэвис. – М.: Мир, 1970. – 56 с.
- 33.Епринцев А.Т. Ферментативная регуляция метаболизма ди- и трикарбоновых кислот в растениях / А.Т. Епринцев, В.Н. Попов. – Воронеж: ВГУ, 1999. – 192 с.
- 34.Ершова А.Н. Влияние кинетина на содержание фосфолипидов проростков кукурузы в модифицированных газовых средах / А.Н. Ершова, В.В. Чурикова, И.А. Стерлигова // Физиол. и биохим. культ. растений. – 1991. – Т. 23, № 3. – С. 250-256.
- 35.Ершова А.Н. Влияние эпибрассинолида на процессы перекисного окисления липидов *Pisum sativum* в нормальных условиях и при кислородном стрессе / А.Н. Ершова, В.А. Хрипач // Физиология растений. – 1996. – Т. 43, № 9. – С. 870-873.
- 36.Ершова А.Н. Организация метаболических процессов растений в условиях дефицита кислорода и повышенного содержания CO<sub>2</sub>: дис. ...доктора биол. наук / А.Н. Ершова. – Воронеж, 1996. – 426 с.
- 37.Ершова А.Н. Роль углекислого газа в регуляции состава жирных кислот фосфолипидных компонентов мембран растений в условиях гипоксического стресса / А.Н. Ершова // Цитология. – 2001. – Т. 43, № 4. – С. 346-347.

38.Ершова А.Н. CO<sub>2</sub> как регулятор адаптационных перестроек метаболических процессов растений при гипоксическом стрессе / А.Н. Ершова // Материалы II Междунар. симпозиума «Сигнальные системы растений: роль в адаптации и иммунитете», Казань, 27-30 июня 2006 г. – Казань, 2006. – С. 37-38.

39.Ершова А.Н. Метаболическая адаптация растений к гипоксии и повышенному содержанию диоксида углерода / А.Н. Ершова. – Воронеж: Изд-во Воронеж. гос. ун-та, 2007. – 264 с.

40.Ершова А.Н. Влияние гипоксии и CO<sub>2</sub> – среды на трансгликозидазную активность цитоплазматической и связанной с клеточной стенкой молекулярных форм β – глюкозидазы растений гороха / А.Н. Ершова, О.Н. Баркалова, А.С. Фатуллаева // Вестник ВГУ. Серия Химия. Биология. Фармация. – 2011, № 2. – С. 88-91.

41.Ершова А.Н. Влияние газовых сред на субстратную специфичность и физико-химические свойства хроматографически очищенной адсорбированной β – глюкозидазы растений гороха / А.Н. Ершова, А.С. Фатуллаева // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2012. – Т. 12, вып. 6. – С. 958-965.

42.Жолкевич В.Н. Рост листьев *Cucumis sativus* L. и содержание в них фитогормонов при повышенной засухе / В.Н. Жолкевич, Т.Н. Пустовойтова // Физиология растений. – 1993. – Т. 40, № 4. – С. 676-680.

43.Закржевский Д.А. Влияние корневой гипоксии на функциональную активность листьев гороха и сои / Д.А. Закржевский, О.Н. Ладыгина // Физиология растений. – 1989. – Т. 36, № 3. – С. 572-579.

44.Закржевский Д.А. Окислительные и ростовые процессы в корнях и листьях высших растений при различной доступности кислорода в почве / Д.А. Закржевский, Т.И. Балахнина, В. Степневский // Физиология растений. – 1995. – Т. 42, № 2. – С. 272-280.

45.Землянухин А.А. Действие и последствие анаэробноза в атмосфере CO<sub>2</sub> и гелия на превращение органических кислот и аминокислот в

проростках кукурузы / А.А. Землянухин, А.Н. Ершова, А.С. Рамадан // Физиол. и биохим. культ. растений. – 1983. – Т. 15, № 1. – С. 8-14.

46.Землянухин А.А. Метаболизм фосфолипидов проростков кукурузы в условиях N<sub>2</sub>- и CO<sub>2</sub> - среды / А.А. Землянухин, А.Н. Ершова, В.И. Колесников // Физиология растений. – 1985. – Т. 32, № 5. – С. 884-894.

47.Землянухин А.А. Жирнокислотный состав липидов митохондрий проростков кукурузы, экспонированных в модифицированной атмосфере / А.А. Землянухин, А.Н. Ершова // ДАН СССР. – 1986. – Т. 291, № 3. – С. 762-764.

48.Землянухин А.А. Биохимия гипоксического метаболизма растений / А.А. Землянухин, Б.Ф. Иванов. – Воронеж: ВГУ, 1988. – 192 с.

49.Изменение активности пероксидазы при патогенезе кольцевой гнили картофеля / И.А. Граскова [и др.] // Физиология растений. – 2004. – Т. 51, № 3. – С. 345-349.

50.Ильинская Л.И. Продукты липоксигеназного окисления жирных кислот как сигнальные молекулы в индуцировании устойчивости растений (обзор) / Л.И. Ильинская, О.Л. Озрецковская // Прикладная биохимия и микробиология. – 1998. – Т. 34, № 5. – С. 467-479.

51.Индукция активных форм кислорода и фитоалексинов в культуре клеток лука (*Allium cepa*) биогенными элиситорами из гриба *Botrytis cinerea* / Г.Ю. Перковская [и др.] // Физиология растений. – 2004. – Т. 51, № 5. – С. 680-685.

52.Интенсивность гликолиза и устойчивость к аноксии отделенных корней *Pisum sativum* L. / В.Ю. Андреева [и др.] // Физиология растений. – 1996. – Т. 43, № 2. – С. 272-278.

53.Йорданова Р.И. Влияние затопления корневой системы на фотосинтез и содержание антиоксидантов в растениях ячменя / Р.И. Йорданова, В.С. Алексиева, Л.П. Попова // Физиология растений. – 2003. – Т. 50, № 2. – С. 183-187.

54.Калашников Ю.Е. Действие почвенной гипоксии на активацию кислорода и систему защиты от окислительной деструкции в корнях и листьях ячменя / Ю.Е. Калашников, Т.И. Балахнина, Д.А. Закржевский // Физиология растений. – 1994. – Т. 41, № 4. – С. 268-275.

55.Канделинская О.Л. Биохимические аспекты рострегулирующего действия стероидных фитогормонов на растения люпина / О.Л. Канделинская, А.Ф. Топунов, Е.Р. Грищенко // Прикладная биохимия и микробиология. – 2007. – Т. 43, № 3. – С. 358-365.

56.К вопросу об устойчивости растений *Brassica napus* L. к действию почвенной гипоксии / Т.И. Балахнина [и др.] // Материалы Междунар. науч. конф. «Биологические ресурсы и устойчивое развитие», Пущино, 29 окт.-2 нояб. 2001 г. – Пущино, 2001. – С. 16-17.

57.Кириллова И.Г. Действие регуляторов роста эпибрассинолида и мелафена на физиолого-биохимические процессы растения картофеля / И.Г. Кириллова, О.А. Бобровская // Учен. зап. ОГУ. Сер. Естеств., техн. и мед. н. – 2009, № 4. – С. 25-29.

58.Козел Н.В. Антиоксидантная система листьев ячменя при фотоокислительном стрессе, индуцированном бенгальским розовым / Н.В. Козел, Н.В. Шалыго // Физиология растений. – 2009. – Т. 56, № 3. – С. 351-358.

59.Колупаев Ю.Е. Активные формы кислорода в растениях при действии стрессоров: образование и возможные функции / Ю.Е. Колупаев // Вестник Харьковского национального аграрного университета. Сер. Биология. – 2007. – Вып. 3 (12). – С. 6-26.

60.Колупаев Ю.Е. Активные формы кислорода при адаптации растений к стрессовым температурам / Ю.Е. Колупаев, Ю.В. Карпец // Физиология и биохимия культ. растений. – 2009. – Т. 41, № 2. – С. 95-108.

61.Кулаева О.Н. Новейшие достижения и перспективы изучения механизма действия фитогормонов и их участия в сигнальных системах

целого растения / О.Н. Кулаева, В.В. Кузнецов // Вестник РФФИ. – 2004, № 2. – С. 12-26.

62. Ладыгин В.Г. Структурно-функциональная организация хлоропластов в листьях *Pisum sativum* L. в условиях корневой гипоксии и дефицита железа / В.Г. Ладыгин, Г.А. Семенова // Цитология. – 2003. – Т. 45, № 8. – С. 780-795.

63. Лапикова В.П. Возможное участие активных форм кислорода в двойной индукции противомикробных реакций растений / В.П. Лапикова, Л.М. Гайворонская, А.А. Аверьянов // Физиология растений. – 2000. – Т. 47, № 1. – С. 160-162.

64. Лемеза О.В. Регуляция экспрессии генов липоксигеназы в мини-клубнях картофеля под действием фитогормонов / О.В. Лемеза, Я.О. Зубо, В.В. Кузнецов // Физиология растений. – 2010. – Т. 57, № 5. – С. 765-770.

65. Лукаткин А.С. Холодовое повреждение теплолюбивых растений и окислительный стресс / А.С. Лукаткин. – Саранск: Изд-во Мордовского ун-та, 2002. – 208 с.

66. Международное общество по анаэробнобиозу растений и его роль в создании нового научного направления / Б.Б. Вартапетян [и др.] // Физиология растений. – 2011. – Т. 58, № 2. – С. 316-319.

67. Мерзляк М.Н. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки / М.Н. Мерзляк // Итоги науки и техники. Сер. Физиология растений. – 1989. – Т. 6. – С. 167-172.

68. Механизмы антиоксидантной защиты растений в условиях недостатка кислорода и последующего окислительного стресса / В.В. Емельянов [и др.] // Тезисы докладов Всеросс. науч. конф. «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий», Петрозаводск, 21-26 сентября 2015 г. – Петрозаводск, 2015. – С. 184.

69. Механизмы трансляционного контроля, действующие в растениях кукурузы при недостатке кислорода / К. Сцик-Миранда [и др.] // Физиология растений. – 2003. – Т. 50, № 6. – С. 865-878.

70. Минибаева Ф.В. Продукция супероксида и активность внеклеточной пероксидазы в растительных тканях при стрессе / Ф.В. Минибаева, Л.Х. Гордон // Физиология растений. – 2003. – Т.50, № 3. – С. 459-464.

71. Мирзоев А.М. Ферментативные процессы при хранении и переработке масличных семян в производстве растительных масел / А.М. Мирзоев // Техничко-технологические проблемы сервиса. – 2015, № 2 (32). – С. 31-36.

72. MIR398 и регуляция экспрессии гена цитоплазматической Cu/Zn супероксиддисмутаза в растении *Thellungiella halophita* при стрессе / П.П. Пашковский [и др.] // Физиология растений. – 2010. – Т. 57, № 5. – С. 756-764.

73. Митохондрии как источники активных форм кислорода при окислительном стрессе. Исследование с помощью новых митохондриально-направленных антиоксидантов на основе «ионов Скулачева» / Д.С. Изюмов [и др.] // Биохимия. – 2010. – Т. 75, вып. 2. – С. 149-157.

74. Накопление пероксида водорода и функционирование защитной системы в проростках ячменя при избыточном увлажнении / Н. В. Шалыго [и др.] // Физиология растений. – 2012. – Т. 59, № 6. – С. 746-755.

75. Необходимость образования супероксида для развития этиолированных проростков пшеницы / Б.Ю. Шоринг [и др.] // Биохимия. – 2000. – Т. 65, № 12. – С. 1612-1618.

76.  $H_2O_2$  усиливает  $CN^-$  индуцированный апоптоз в листьях гороха / В.Д. Самуилов [и др.] // Биохимия. – 2006. – Т. 71, вып. 4. – С. 481-492.

77. О влиянии «внешнего» супероксид-аниона на процессы апоптоза в колеоптилях проростков пшеницы / А.А. Воробьев [и др.] // Биохимия. – 2005. – Т. 70, № 10. – С. 1328-1337.

78. Перекись водорода и развитие окислительных повреждений у растений при аноксии и последующем окислительном стрессе / В.В. Ласточкин [и др.] // Тезисы докладов Всеросс. науч. конф. «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий», Петрозаводск, 21-26 сентября 2015 г. – Петрозаводск, 2015. – С. 310.

79.Пероксидаза клеточной поверхности генератор супероксид-аниона в корневых клетках пшеницы при раневом стрессе / А.В. Часов [и др.] // Цитология. – 2002. – Т. 44, № 7. – С. 691-696.

80.Повышение адаптационных способностей ячменя под действием эпибрассинолида и олигосахарида при выращивании в условиях недостатка влаги и засоления почв / В.М. Ковалев [и др.] // Тезисы докладов III Междунар. конф. «Регуляторы роста и развития растений». – М., 1995. – С. 54.

81.Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода / О.Г. Полесская. – М.: КДУ, 2007. – 140 с.

82.Половникова М.Г. Активность компонентов антиоксидантной защиты и полифенолоксидазы у газонных растений в онтогенезе в условиях городской среды / М.Г. Половникова, О.Л. Воскресенская // Физиология растений. – 2008. – Т. 55, № 5. – С. 777-785.

83.Пономарева А.А. Сравнительная характеристика структурно-функциональных изменений митохондрий при действии салициловой кислоты и параквата / А.А. Пономарева, С.А. Дмитриева, Ф.В. Минибаева // Материалы Всероссийской научной конференции «Устойчивость организмов к неблагоприятным факторам внешней среды», Иркутск, 24-28 августа 2009 г. – Иркутск, 2009. – С. 380-383.

84.Попов В.Н. Роль свободного окисления в защите от активных форм кислорода / В.Н. Попов, М.Н. Тутукина // Стрессовые белки растений. – 2004. – С. 82-87.

85.Прадедова Е.В. Супероксиддисмутаза вакуолей клеток растений / Е.В. Прадедова, О.Д. Ишеева, Р.К. Саляев // Биологические мембраны. – 2009. – Т. 26, № 1. – С. 21-30.

86.Прадедова Е.В. Классификация системы антиоксидантной защиты как основа рациональной организации экспериментального исследования окислительного стресса у растений / Е.В. Прадедова, О.Д. Ишеева, Р.К. Саляев // Физиология растений. – 2011. – Т. 58, № 2. – С. 177-185.

87.Приказюк Е.Г. Анализ экспрессии генов, кодирующих ферменты аскорбат-глутатионового цикла, в растениях риса при аноксии и окислительном стрессе / Е.Г. Приказюк, В.В. Емельянов, Т.В. Чиркова // Тезисы докладов Всеросс. науч. конф. «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий», Петрозаводск, 21-26 сентября 2015 г. – Петрозаводск, 2015. – С. 437.

88.Прусакова Л.Д. Применение brassinosteroidов в экстремальных для растений условиях / Л.Д. Прусакова, С.И. Чинова // Агрехимия. – 2005, № 7. – С. 87-94.

89.Ракитина В.Г. Нарушение нормального газообмена растений – фактор, препятствующий защитному действию сахаров и глицерина / В.Г. Ракитина // Физиология растений. – 1978. – Т. 25, № 3. – С. 584-591.

90.Регдел Д. Липоксигеназа плодов помидора. Выделение, частичная очистка, краткая характеристика. Взаимодействие с биологическими мембранами / Д. Регдел, Т. Шеде, Х. Кюн // Биохимия. – 1994. – Т. 59, вып. 6. – С. 193-199.

91.Регуляторы роста растений: внутриклеточная гормональная сигнализация и применение в аграрном производстве / В.С. Кравец [и др.] // Физиология растений. – 2008. – Т. 55, № 4. – С. 629-640.

92.Реджиани Р. Анаэробный обмен аминокислот / Р. Реджиани, А. Бергани // Физиология растений. – 2003. – Т. 50, № 6. – С. 821-824.

93.Рекомбинантная 9-липоксигеназа кукурузы: экспрессия, очистка, свойства / Е.В. Осипова [и др.] // Биохимия. – 2010. – Т. 75, вып. 7. – С. 978-983.

94.Рикар Б. Ответ корней проростков на аноксию у сортов риса, различающихся по устойчивости к затоплению / Б. Рикар // Физиология растений. – 2003. – Т. 50, № 6. – С. 891-900.

95.Роль адаптогенов в регуляции биоэнергетических функций митохондрий в условиях стресса / И.В. Жигачева [и др.] // Биологические



мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии. – 2013. – Т. 30, № 4. – С. 313.

96. Роль супероксида в формировании неспецифического адаптационного синдрома корневых клеток / Ф.В. Минибаева [и др.] // Доклады Академии Наук. – 1997. – Т. 355, № 4. – С. 554-556.

97. Романов Г.А. Как цитокинины действуют на клетку? / Г.А. Романов // Физиология растений. – 2009. – Т. 56, № 2. – С. 295-319.

98. Романова Л.А. Методы определения гидроперекисей липидов с помощью тиоцианата аммония / Л.А. Романова, И.Д. Стальная // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 64-66.

99. Романова А.К. Физиолого-биохимические признаки и молекулярные механизмы адаптации растений к повышенной концентрации  $\text{CO}_2$  в атмосфере / А.К. Романова // Физиология растений. – 2005. – Т. 52, № 1. – С. 129-145.

100. Рябушкина Н.А. Синергизм действия метаболитов в ответных реакциях растений на стрессовые факторы / Н.А. Рябушкина // Физиология растений. – 2005. – Т. 52, № 4. – С. 614-621.

101. Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений / В.Д. Креславский [и др.] // Физиология растений. – 2012. – Т. 59, № 2. – С. 163-178.

102. Стржалка К. Каротиноиды растений и стрессовое воздействие окружающей среды: роль модуляции физических свойств мембран каротиноидами / К. Стржалка, А. Костецка-Гугала, Д. Латовски // Физиология растений. – 2003. – Т. 50, № 2. – С. 188-193.

103. Суббайя Ч.С. Опосредованные кальцием реакции растения кукурузы на аноксию / Ч.С. Суббайя, М.М. Сакс // Физиология растений. – 2003. – Т. 50, № 6. – С. 841-851.

104. Тарчевский И.А. Стресс и катаболизм у растений / И.А. Тарчевский. – М.: Наука, 1993. – 80 с.

105. Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений / И.А. Тарчевский. – М.: Наука, 2002. – 294 с.
106. Трач В.В. Супероксиддисмутаза как компонент антиоксидантной системы растений при абиотических стрессовых воздействиях / В.В. Трач, В.А. Стороженко // Физиол. и биохим. культ. раст. – 2007. – Т. 39, № 4. – С. 291-302.
107. Физиологическая роль нитрата в условиях анаэробного стресса у толерантных и чувствительных к аноксии клеток каллусов *Saccharum officinarum* / Б.Б. Вартапетян [и др.] // Физиология растений. – 2012. – Т. 59, № 6. – С. 739-745.
108. Чеснокова Н.П. Молекулярно – клеточные механизмы инактивации свободных радикалов в биологических системах / Н.П. Чеснокова, Е.В. Понукалина, М.Н. Бизенкова // Успехи современного естествознания. – 2002, № 3. – С. 29-36.
109. Чи Вей Накопление активных форм кислорода при активации НАДФ-зависимого малик-фермента в трансгенных растениях риса / Чи Вей // Физиология растений. – 2006. – Т. 53, № 3. – С. 364 – 370.
110. Чиркова Т.В. Роль клеточных мембран в устойчивости растений к гипо- и аноксии / Т.В. Чиркова // Успехи соврем. биологии. – 1983. – Т. 95, № 1. – С. 44-56.
111. Чиркова Т.В. Пути адаптации растений к гипоксии и аноксии / Т.В. Чиркова – Л.: Изд-во ЛГУ, 1988. – 243 с.
112. Чиркова Т.В. Перекисное окисление липидов и активность антиоксидантных систем при аноксии у растений с разной устойчивостью к недостатку кислорода / Т.В. Чиркова, Л.О. Новицкая, О.Б. Блохина // Физиология растений. – 1998. – Т. 45, № 5. – С. 65-73.
113. Чиркова Т.В. Синтез белка в растениях в условиях гипоксии и аноксии кислорода / Т.В. Чиркова, С.А. Войцеконская // Успехи современной биологии. – 1999. – Т. 119, № 2. – С. 178-189.

114. Шакирова Ф.М. Изменение уровня АБК и лектина в корнях проростков пшеницы под влиянием 24-эпибрассинолида и засоления / Ф.М. Шакирова, М.В. Безрукова // Физиология растений. – 1998. – Т. 45, № 3. – С. 451-455.
115. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция / Ф.М. Шакирова. – Уфа: Гилем, 2001. – 160 с.
116. Шаповалов А.А. Отечественные регуляторы роста растений / А.А. Шаповалов, Н.Ф. Зубкова // Агрехимия. – 2003, № 11. – С. 33-47.
117. Эффекты окислительного стресса на ультраструктуру и функциональную активность растительных митохондрий *in vivo* / С.А. Дмитриева [и др.] // Биологические мембраны. – 2012. – Т. 29, № 4. – С. 267-275.
118. Юрина Н.П. Сигнальные системы растений. Пластидные сигналы и их роль в экспрессии ядерных генов / Н.П. Юрина, М.С. Одинцова // Физиология растений. – 2007. – Т. 54, № 4. – С. 485-498.
119. Accumulation of reactive oxygen species and oxidation of cytokinin in germinating soybean seeds / X. Gidrol [et al.] // Eur. J. Biochem. – 1994. – V. 224. – P. 21-28.
120. Amor Y. Anoxia pretreatment protects soybean cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death: possible involvement of peroxidases and of alternative oxidase / Y. Amor, M. Chevion, A. Levine // FEBS Letters. – 2000. – V. 447. – P. 175-180.
121. Anaerobic respiration of *Pisum sativum* L. roots and their resistance under oxygen stress / V.Y. Andreev [et al.] // Annu. Symp. «Phys.-Chem. Basis Plant Physiol.», Penza, 5-8 Febr. 1996. – Penza, 1996. – P. 90.
122. Andreev V.Y. Induction of alcoholic and lactic fermentation in the early stages of anaerobic incubation of higher plants / V.Y. Andreev, B.B. Vartapetian // Phytochemistry. – 1992. – V. 31, № 6. – P. 1859-1861.

123. Antioxidant enzymes and aldehyde releasing capacity of rice cultivars (*Oryza sativa* L.) as determinants of anaerobic seedling establishment capacity / D.K. Kaveri [et al.] // *Bulg. J. Plant Physiol.* – 2004. – V. 30, № 1-2. – P. 34-44.
124. Antistressor impact on carotenoid content and lipid peroxidation in wheat / M. Musienko [et al.] // *Bulg. J. Plant Physiol.* – 1998. – P. 248.
125. Apel K. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction / K. Apel, H. Hirt // *Annual Review of Plant Biology.* – 2004. – V. 55. – P. 373-399.
126. Arteca J.M. Brassinosteroid-induced exaggerated growth in hydroponically grown *Arabidopsis* plants / J.M. Arteca, R.N. Arteca // *Physiol Plant.* – 2001. – V. 112. – P. 104-112.
127. Asada K. The role of ascorbate peroxidase and monodehydroascorbate reductase in  $H_2O_2$  scavenging in plants / K. Asada // *Oxidat. Stress and Mol. Biol. Antioxidant Def.* – 1997. – P. 715-735.
128. Asada K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions / K. Asada // *Plant Physiology.* – 2006. – V. 141. – P. 391-396.
129. AtMTM1, a novel mitochondrial protein, may be involved in activation of the manganese-containing superoxide dismutase in *Arabidopsis* / Su Zhao [et al.] // *Planta.* – 2007. – V. 226, № 4. – P. 1031-1039.
130. Avery S.V. Molecular targets of oxidative stress / S.V. Avery // *Biochem.* – 2011. – V. 434. – P. 201-210.
131. A wound-induced soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] lipoxygenase is associated with the chloroplast thylakoid membrane / A. M. Fischer [et al.] // *Plant Physiology.* – 1997. – V. 114, № 3. – P. 277.
132. Bailey-Serres J. Sensing and Signaling in Response to Oxygen Deprivation in Plants and Other Organisms / J. Bailey-Serres, R. Chang // *Ann. Bot.* – 2005. – V. 96. – P. 507-518.

133. Bajguz A. The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants / A. Bajguz, A. Tretyn // *Phytochemistry*. – 2003. – V. 62, № 7. – P. 1027-1046.
134. Barcelo A.R. The generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the xylem of *Zinnia elegans* is mediated by an NADPH-oxidase-like enzyme / A.R. Barcelo // *Planta*. – 1999. – V. 207, № 2. – P. 207-216.
135. Becana M. Iron-dependend oxygen-free radical generation in plants subjected to environmental stress. Toxicity and antioxidant protection / M. Becana, J.F. Moran, I. Iturbe-Ormaetxe // *Plant Soil*. – 1998. – V. 201, № 1. – P. 137-147.
136. Berry H. Excess substrate inhibition of soybean lipoxygenase-1 is mainly oxygen-dependent / H. Berry, H. Debat, V. Larreta-Garde // *FEBS Letters*. – 1997. – V. 408. – P. 324-326.
137. Biochemical and immunochemical evidences for the presence of lipoxygenase in plant mitochondria / E. Braidot [et al.] // *J. Exp. Bot.* – 2004. – V. 55, № 403. – P. 1655-1662.
138. Biotechnological approaches to creation of hypoxia and anoxia tolerant plants / B. B. Vartapetian [et al.] // *Acta Naturae*. – 2014. – V. 6, № 2 (21). – P. 19-30.
139. Blee E. Impact of phyto-oxylipins in plant defense / E. Blee // *Trends Plant Sci.* – 2002, № 7. – P. 315-322.
140. Blokhina O. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: A Review / O. Blokhina, E. Virolainen, K. Fagerstedt // *Ann. Bot.* – 2003. – V. 91. – P. 179-194.
141. Blokhina O. Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems / O. Blokhina, K. V. Fagerstedt // *Physiol. plant.* – 2010. – V. 138. – P. 447-462.
142. Bown A.W. The influence of carbon dioxide on protein synthesis in etiolated coleoptiles of *Avena sativa* / A.W. Bown, W.W. Lampmann // *Canad. J. Bot.* – 1972. – V. 50, № 9. – P. 1937-1942.

143. Brash A. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate / A. Brash // *J. Biological Chemistry*. – 1999. – V. 274, № 34. – P. 23679-23682.
144. Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses / S. Kagale [et al.] // *Planta*. – 2007. – V. 225. – P. 353-364.
145. Breusegem F.V. Reactive oxygen species in plant cell death / F.V. Breusegem, J.F. Dat // *Plant Physiology*. – 2006. – V. 141. – P. 384-390.
146. Bunce J.A. Responses of respiration to increasing atmospheric carbon dioxide concentrations / J.A. Bunce // *Physiol. plant.* – 1994. – V. 90, № 2. – P. 427-430.
147. Catalase in plants / H. Willekens [et al.] // *Molecular Breeding*. – 1995. – V. 1. – P. 207-228.
148. Cell signalling by reactive lipid species: new concepts and molecular mechanisms / A. H. Kreuzwieser [et al.] // *Biochem. J.* – 2012. – V. 442. – P. 453-464.
149. Changes in nitrogen fixation and antioxidant enzymes activity induced by salicylic acid and abscisic acid in *Medicago sativa* under salt stress / F. Palma [et al.] // *Abstract Book. FESPb Congress, Valencia, 4-9 July 2010.* – Valencia, 2010. – pp. 187.
150. Chateigner A.-L. Germination-associated changes in the transcript content of pea seedling lipoxygenases. Lipoxygenase-g: A new marker of axis growth resumption / A.-L. Chateigner, von Le Deunff Y., R. Jalouzot // *Planta*. – 1999. – V. 208, № 4. – P. 606-613.
151. Choe S. Brassinosteroid biosynthesis and inactivation / S. Choe // *Plant Physiol.* – 2006. – V. 126, № 4. – P. 539-548.
152. Cooper T.G. Mitochondria and glyoxysomes from castor bean endosperm / T.G. Cooper, H. Beevers // *J. Biol. Chem.* – 1969. – V. 244, № 13. – P. 3507-3513.

153. Corpas F.J. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells / F.J. Corpas, J. B. Barroso, L. del Rio // *Trends in Plant Science*. – 2001. – V. 6 (4). – P. 145-150.
154. Crawford R.M. Similarities between post-ischemic injury to animal tissues and post-anoxic injury in plants / R.M. Crawford, J.C. Walton, B. Wollen // *Proc. R. Soc. Edinburg*. – 1994. – V. 102 B. – P. 325-332.
155. Crawford R.M. Seasonal differences in plant responses to flooding and anoxia / R.M. Crawford // *Can. J. Bot.* – 2003. – V. 81, № 2. – P. 1224-1246.
156. De Marco A., The Complexity of Enzymic Control of Hydrogen Peroxide Concentration May Affect the Regeneration Potential of Plant Protoplasts / A. De Marco, K.A. Roubelakis-Angelakis // *Plant Physiol.* – 1996. – V. 110. – P. 137-145.
157. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses / J. Dat [et al.] // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2000. – V. 57. – P. 779-795.
158. Dubbs W.E. Specific lipoxygenase isoforms accumulate in distinct regions of soybean pod wall and mark a unique cell layer / W.E. Dubbs, Grimes Howard D. // *Plant Physiol.* – 2000. – V. 123, № 4. – P. 1269-1279.
159. Dubey P.K. Oxidative stress: Types and evaluation / P.K. Dubey, E. Edwin, E. Sheeja // *Plant Arch.* – 2005. – V. 5, № 1. – P. 1-8.
160. Differential response of gray poplar leaves and roots underpins stress adaptation during hypoxia / J. Kreuzwieser [et al.] // *Plant Physiology*. – 2009. – V. 149, № 1. – P. 461-473.
161. Drew M. Oxygen deficiency and root metabolism: Injury and acclimation under hypoxia and anoxia / M. Drew // *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* – 1997. – V. 5. – P. 223-250.
162. Effects of 24-epibrassinolide on antioxidant system in cucumber seedling roots under hypoxia stress / Kang Yun-yan [et al.] // *Agr. Sci. China*. – 2007. – V. 6, № 3. – P. 281-289.

163. Effect of root-applied spermidine on growth and respiratory metabolism in roots of cucumber seedlings under hypoxia / Y. X. Jia [et al.] // Физиология растений. – 2010. – Т. 57, № 5. – С. 695-702.
164. Elstner E.F. Mechanism of oxygen activation during plant stress / E.F. Elstner, W. Osswald // Oxygen and Environmental Stress in Plants. – 1994. – V. 102. – P. 131-154.
165. Expression and activity of isoenzymes of superoxide dismutase in wheat roots in response to hypoxia and anoxia / S. Biemelt [et al.] // Plant, Cell and Environ. – 2000. – V. 23, № 2. – P. 135-144.
166. Expression of cucumber lipid-body lipoxygenase in transgenic tobacco: lipid-body lipoxygenase is correctly targeted to seed lipid bodies / B. Hause [et al.] // Planta. – 2000. – V. 210, № 3. – P. 708-714.
167. Feussner I. The lipoxygenase pathway / I. Feussner, C. Wasternack // Annual Review of Plant Biology. – 2002. – P. 275-297.
168. Flury T. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation and the influence of antioxidants during the 2,35-triiodobenzoic acid-mediated induction of glutathione S-transferase in soybean / T. Flury, K. Kreuz, E. Wagner // Phytochemistry. – 1998. – V. 49, № 1. – P. 37-41.
169. Fox T.C. Energetics of plant growth under anoxia: metabolic adaptations of *Oryza sativa* and *Echinochloa phyllopogon* / T.C. Fox, R.A. Kennedy, M.E. Rumpho // Ann. Bot. – 1994. – V. 74, № 3. – P. 445-455.
170. Foyer C.H. Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria / C.H. Foyer, G. Noctor // Physiol. Plant. – 2003. – V. 119. – P. 355-364.
171. Francesco L. Regulation of the molecular response to oxygen limitations in plants / L. Francesco // New Phytol. – 2011. – V. 190, № 3. – P. 550-555.
172. From sequence analysis of three novel ascorbat peroxidases from *Arabidopsis thaliana* to structure, function and evolution of seven of ascorbate peroxidase / H.M. Jespersen [et al.] // Biochem. J. – 1997. – V. 38. – P. 305-310.



173. Functional characterization and expression of a cytosolic iron-superoxide dismutase from cowpea root nodules / J.F. Moran [et al.] // *Plant Physiology*. – 2003. – V. 133. – P. 773-782.
174. Gapper C. Control of plant development by reactive oxygen species / C. Gapper, L. Dolan // *Plant Physiology*. – 2006. – V. 141. – P. 341-345.
175. Genotypic variation in rice yield enhancement by elevated CO<sub>2</sub> relates to growth before heading, and not to maturity group / H. Shimono [et al.] // *J. Exp. Botany*. – 2009. – V. 60. – P. 523-532.
176. Grabelnych O.I. The energetic functions of plant mitochondria under stress / O.I. Grabelnych // *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*. – 2005. – V. 1, № 1. – P. 37-54.
177. Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicus* / Rocha Marcio [et al.] // *Plant Physiology*. – 2010. – V. 152, № 3. – P. 1501-1513.
178. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life / B. Halliwell // *Plant Physiology*. – 2006. – V. 141. – P. 312-322.
179. Heydeck D. Improved procedure for the detection of activity of lipoxygenases on electrophoregrams / D. Heydeck, T. Schewe // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1985. – V. 44. – P. 1261-1263.
180. Hobo T. Role of reactive oxygen species generated during the germination of *Arabidopsis* seeds / T. Hobo, M. Iwabuchi, K. Ogawa // *Plant and Cell Physiol*. – 2005. – V. 46. – P. 81.
181. Hubert F.H. pH regulation in anoxic plants / F.H. Hubert // *Ann. Bot.* – 2005. – V. 96. – P. 519-532.
182. Hunter M.I.S. Lipid peroxidation – a factor in anoxia intolerance in *Iris* Species? / M.I.S. Hunter, A.M. Hetherington, R.M.M Crawford // *Phytochemistry*. – 1983. – V. 2, № 5. – P. 1145-1147.
183. Hurst A. Effects of salinity, high irradiance, ozone, and ethylene on mode of photosynthesis, oxidative stress and oxidative damage in the C3/CAM

intermediate plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. / A. Hurst, T. Grams, R. Ratajczak // Plant, Cell & Environ. – 2002. – V. 27. – P. 187-197.

184. Hwang I. Cytokinin biosynthesis and perception / I. Hwang, H. Sakakibara // Physiol. Plant. – 2006. – V. 126, № 4. – P. 528-538.

185. Hydroperoxides of fatty acids induce programmed cell death in tomato protoplasts / I.V. Knight [et al.] // Physiol. and Mol. Plant Pathol. – 2001. – V. 59, № 6. – P. 277-286.

186. Igamberdiev A.U. Plant mitochondrial function anaerobiosis / A.U. Igamberdiev, R.D. Hill // Annals of Botany. – 2009. – V. 103. – P. 259-268.

187. Impact of post-anoxia stress on membrane lipids of anoxia-pretreated potato cells. A re-appraisal / D. Pavelic [et al.] // Plant Physiology. – 2000. – V. 124. – P.1285-1292.

188. Induction of rice cytosolic ascorbate peroxidase mRNA by oxidative stress; the involvement of hydrogen peroxide in oxidative stress signaling / Morita Shigeto [et al.] // Plant and Cell Physiol. – 1999. – V. 40, № 4. – P. 417-422.

189. Influence of brassinosteroids on antioxidant enzymes activity in tomato under different temperatures / L.M Mazorra [et al.] // Biol. plant. – 2002. – V. 45, № 4. – P. 593-596.

190. Integration of auxin and brassinosteroid pathways by Auxin Response Factor 2 / G. Vert [et al.] // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2008. – V. 105, № 28. – P. 9829-9834.

191. Jackson M.B. Response and adaptation by plants to flooding stress / M.B. Jackson, T.D. Colmer // Ann. Bot. – 2005. – V. 96, № 4. – P. 501-505.

192. Jung M. Plant hormone-induced biphasic accumulation of ethylene and reactive oxygen species (ROS) / M. Jung, Park Ky Young // Abstract Book. FESPB Congress, Valencia, 4-9 July 2010. – Valencia, 2010. – pp. 66.

193. Kawahara T. Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/Duox) family of enzymes / T. Kawahara, M.T. Quinn, J.D. Lambeth // BMC Evol. Biol. – 2007, № 7. – P. 109.

194. Kawano T. Roles of the reactive oxygen species-generating peroxides reaction in plant defence and growth induction / T. Kawano // *Plant Cell. Repts.* – 2003. – V. 21, № 9. – P. 829-837.
195. Khripach V. Twenty Years of Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones Warrant Better Crops for the XXI Century / V. Khripach, V. Zhabinskii, A. de Groot // *Annals of Botany.* – 2000. – V. 86. – P. 441-447.
196. Kim Tae-Wuk Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors / Kim Tae-Wuk, Wang Zhi-Yong // *Annual Review of Plant Biology.* – 2010. – P. 681-704.
197. Kotchoni S. The reactive oxygen species network pathways: An essential prerequisite for perception of pathogen attack and the acquired disease resistance in plants / S. O. Kotchoni, E.W. Gachomo // *J. Biosci.* – 2006. – V. 31, № 3. – P. 389-404.
198. Kulichikhin K.Y. Effect of oxygen concentration on intracellular pH, glucose-6-phosphate an NTP content in rice (*Oryza sativa*) and wheat (*Triticum aestivum*) root tips: In vivo  $\{^{31}\text{P}\}$ -NMR study / K.Y. Kulichikhin, T.V. Chirkova, K.V. Fagerstedt // *Physiol. plant.* – 2007. – V. 129, № 3. – P. 507-518.
199. Kuzniak E. The effect of *Botrytis cinerea* infection on the antioxidant profile of mitochondria from tomato leaves / E. Kuzniak, M. Sklodowska // *J. Exp. Bot.* – 2004. – V. 55. – P. 605-612.
200. Kwak J.M. The role of reactive oxygen species in hormonal responses / J.M. Kwak, V. Nguyen, J.I. Schroeder // *Plant Physiology.* – 2006. – V. 141. – P. 323-329.
201. Liavonchanka A. Lipoxigenase: Occurrence, Function and Catalysis / A. Liavonchanka, I. Feussner // *J. Plant Physiol.* – 2006. – V. 163. – P. 348-357.
202. Lipoxigenase metabolites of  $\alpha$ -linolenic acid in the development of resistance in pigeonpea, *Cajanus cajan* (L.) Millsp, seedlings against *Fusarium udum* infection / Maheswari Devi P. Uma [et al.] // *Eur. J. Plant Pathol.* – 2000. – V. 106, № 9. – P. 857-865.

203. Lipoxygenase regulation *in vivo* and *in vitro* by lipid compounds / T. D. Skaterna [et al.] // *Biopolymers and Cell.* – 2015. – V. 31, № 3. – P. 161–173.
204. Liskay A. Production of reactive oxygen intermediates (O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and OH) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth / A. Liskay, E. van der Zalm, P. Schopfer // *Plant Physiol.* – 2004. – V. 136, № 2. – P. 3114-3123.
205. Location and effects of long-term NaCl stress on superoxide dismutase and ascorbate peroxidase isoenzymes of pea (*Pisum sativum*, cv. Puget) chloroplasts / J.M. Gomez [et al.] // *J. Exp. Bot.* – 2004. – V. 55. – P. 119-130.
206. Low oxygen response mechanisms in green organisms / V. Banti [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013, № 4. – P. 4734-4761.
207. Mayilvaganan M. Activity, structure and function of plant lipoxygenase / M. Mayilvaganan, S.P. Singh // *Plant Arch.* – 2004. – V. 4, № 1. – P. 1-10.
208. Mitochondrial behaviour in the early stages of ROS stress leading to cell death in *Arabidopsis thaliana* / K. Yoshinaga [et al.] // *Ann. Bot.* – 2005. – V. 96, № 2. – P. 337-342.
209. Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling / D. M. Rhoads [et al.] // *Plant Physiology.* – 2006. – V. 141. – P. 357-366.
210. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance / R. Mittler // *Trends Plant Sci.* – 2002. – V. 7, № 9. – P. 405-410.
211. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids / A. Arora [et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2000. – V. 373. – P. 102-109.
212. Modulation of the antioxidant system in citrus under waterlogging and subsequent drainage / Z. Hossain [et al.] // *J. Plant Physiol.* – 2009. – V. 166. – P. 1391-1404.
213. Molecular enzymology of lipoxygenases / I. Ivanov [et al.] // *Archives of Biochemistry and Biophysics.* – 2010. – V. 503. – P. 161-174.

214. Moller I.M. Oxidative modifications to cellular components in plants / I.M. Moller, P.E. Jensen, A. Hansson // Annual Review of Plant Biology. – 2007. – V. 58. – P. 459-481.
215. Monk L.S. Superoxide Dismutase as an Anaerobic Polypeptide: A Key Factor in Recovery from Oxygen Deprivation in *Iris pseudacorus* / L.S. Monk, K.V. Fagerstedt, R.M.M. Crawford // Plant Physiol. – 1987. – V. 85. – P. 1016-1020.
216. Mubarakshina M.M. The production and scavenging of reactive oxygen species in the plastoquinone pool of chloroplast thylakoid membranes / M.M. Mubarakshina, B.N. Ivanov // Physiol. plant. – 2010. – V. 140. – P. 103-110.
217. Mullineaux P.M. Spatial dependence for hydrogen peroxide-directed signaling in light-stressed plants / P.M. Mullineaux, S. Karpinski, N.R. Baker // Plant Physiology. – 2006. – V. 141. – P. 346-350.
218. Mullineaux P.M. Oxidative stress: Antagonistic signaling for acclimation or cell death? / P.M. Mullineaux, N.R. Baker // Plant Physiology. – 2010. – V. 154. – P. 521-525.
219. Nitrite reduces cytoplasmic acidosis under anoxia / I.G.I. Libourel [et al.] // Plant Physiol. – 2006. – V. 142, № 4. – P. 1710-1717.
220. Noctor G. Peroxide processing in photosynthesis: antioxidant coupling and redox signaling / G. Noctor, S. Veljovic-Jovanovic, C.H. Foyer // Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. – 2000. – V. 355. – P. 1465-1475.
221. Ogawa K. A mechanism for promoting the germination of *Zinnia elegans* seeds by hydrogen peroxide / K. Ogawa, M. Iwabuchi // Plant and Cell Physiol. – 2001. – V. 42, № 3. – P. 286-291.
222. Oliw E.H. Factors influencing the rearrangement of *bis*-allylic hydroperoxides by manganese lipoxygenase / E.H. Oliw // Journal of Lipid Research. – 2008. – V. 49. – P.420-428.
223. Patterns of peroxidative ethane emission from submerged rice seedlings indicate that damage from reactive oxygen species takes place during

submergence and is not necessarily a post-anoxic phenomenon / I.E. Santosa [et al.] // *Planta*. – 2007. – V. 226, № 1. – P. 193-202.

224. Peroxisomal manganese superoxide dismutase: purification and properties of the isozyme from pea leaves / J.M. Palma [et al.] // *Physiol. Plant.* – 1998. – V. 104. – P. 720-726.

225. Physiology and biochemistry of waterlogging tolerance in plants / R.K. Sairam [et al.] // *Biol. Plant.* – 2008. – V. 52. – P. 401-412.

226. Pitzschke A. Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species signaling in plants / A. Pitzschke, H. Hirt // *Plant Physiology*. – 2006. – V. 141. – P. 351-356.

227. Plant glutathione peroxidases / Y. Eshdat [et al.] // *Physiol. Plant.* – 1997. – V. 100. – P. 234-240.

228. Plant plasma membrane water channels conduct the signaling molecule H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / M. Dynowski [et al.] // *Biochem. J.* – 2008. – V. 414. – P. 53-61.

229. Porta H. Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features / H. Porta, M. Rocha-Sosa // *Plant Physiology*. – 2002. – V. 130. – P.15-21.

230. Possible involvement of active oxygen species in chloroplasts in apoptotic cell death of *Brassica napus* leaf protoplasts / M. Watanabe [et al.] // *Plant and Cell Physiol.* – 2004. – V. 45. – P. 104.

231. Pourabdal L. The effects of flooding stress on induction of oxidative stress and antioxidant enzymes activity in *Zea mays* L. seedlings / L. Pourabdal, R. Heidary, T. Farboodnia // *Res. J. Biol. Sci.* – 2008. – V. 3. – P. 391-394.

232. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.N. Lowry [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1951. – V. 193, № 2. – P. 265-275.

233. Purbasha S. Changes in cell wall ultrastructure induced by sudden flooding at 25°C in *Pisum sativum* (Fabaceae) primary roots / S. Purbasha, N. Teruo, G.K. Daniel // *Amer. J. Bot.* – 2008. – V. 95, № 7. – P. 782-792.

234. Purification of a plasma membrane-bound lipoxygenase from soybean cotyledons / S. Fornaroli [et al.] // *Plant Sci.* – 1999. – V. 145, № 1. – P. 1-10.

235. Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in *Arabidopsis* / R.G. Camp [et al.] // *Plant Cell*. – 2006. – V. 15. – P. 2320-2332.
236. Rawyler A. Impact of Oxygen Stress and Energy Availability on Membrane Stability of Plant Cells / A. Rawyler, S. Arpagaus, R. Braendler // *Ann. Bot.* – 2002. – V. 90. – P. 499-507.
237. Reaction oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling / Luis A. del Rio [et al.] // *Plant Physiology*. – 2006. – V. 141. – P. 330-335.
238. Reaction oxygen species are involved in brassinosteroid-induced stress tolerance in cucumber / X.-J. Xia [et al.] // *Plant Physiology*. – 2009. – V. 150. – P. 801-814.
239. Reaction oxygen species-driven transcription in *Arabidopsis* under oxygen deprivation / C. Pucciariello [et al.] // *Plant Physiology*. – 2012. – V. 159. – P. 184-196.
240. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth / J. Foreman [et al.] // *Nature*. – 2003. – V. 422, № 6930. – P. 442-446.
241. Reactive oxygen species regulation in ABA signaling in *Arabidopsis* guard cell / I.C. Mori [et al.] // *Plant and Cell Physiol.* – 2004. – V. 45. – P. 52.
242. Responses of growth and antioxidant system to root-zone hypoxia stress in two *Malus* species / Tuanhui Bai [et al.] // *Plant and Soil* . – 2010. – V. 327, № 1-2. – P. 95-105.
243. Reuss J. Micro- aerobics: When rice plants lose their resistance against oxygen / J. Reuss, F.J.M. Harren // *Phys. scr.* – 2008. – V. 78, № 5. – P. 058125/1-058125/7.
244. Rising atmospheric carbon dioxide: Plants FACE the future / S.P. Long [et al.] // *Annual Review of Plant Biology*. – 2004. – V. 55. – P. 591-628.
245. Role of reactive oxygen species in abiotic and biotic stresses in plants / M. Pogany [et al.] // *Acta phytopathol. et entomol. hung.* – 2006. – V. 41, № 1-2. – P. 23-35.

246. Sagi M. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases / M. Sagi, R. Fluhr // *Plant Physiology*. – 2006. – V. 141. – P. 336-340.
247. Santner A. Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling / A. Santner, M. Estelle // *Nature*. – 2009. – V. 459, № 7250. – P. 1071-1078.
248. Scandalios J.G. The rise of ROS / J.G. Scandalios // *Trends Biochem. Sci.* – 2002. – V. 27. – P. 483-486.
249. Sen R.S. The role of superoxide dismutase in combating oxidative stress in higher plants / R.S. Sen, Deng Xing Wang // *Bot. Rev.* – 2000. – V. 66. – P. 89-98.
250. Shulaev V. Metabolic and proteomic markers for oxidative stress. The tools for reactive oxygen species research / V. Shulaev, D.G. Oliver // *Plant Physiology*. – 2006. – V. 141. – P. 367-372.
251. Spicer R. Effect of carbon dioxide and oxygen on sapwood respiration in five temperate tree species / R. Spicer, N.M. Holbrook // *J. Exp. Bot.* – 2007. – V. 58. – P. 1313-1320.
252. Subcellular localization and stress responses of superoxide dismutase isoforms from leaves in the C<sub>3</sub>-CAM intermediate halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* L. / Z. Miszalski [et al.] // *Plant, Cell and Environ.* – 1998. – V. 21, № 2. – P. 169-179.
253. The effects of elevated atmospheric CO<sub>2</sub> on lipid metabolism in leaves from mature wheat (*Triticum aestivum* cv. Hereward) plants / M. Williams [et al.] // *Plant, Cell and Environ.* – 1998. – V. 21. – P. 927-936.
254. The effect of elevated levels of carbon dioxide on potato crops. A review / J.M. Finnan [et al.] // *J. Crop Improv.* – 2005. – V. 13, № 1-2. – P. 91-111.
255. Thermosensitivity of lipoxygenase and photosynthesis pigments of winter wheat / I.V. Kosakivska [et al.] // *Biotechnologia Acta*. – 2014. – V. 7, № 5. – P. 101–107.



256. The role of reactive oxygen species in plant cell / J. Bailey-Serres [et al.] // *Plant Physiology*. – 2006. – V. 141. – P. 311.
257. The upstream oxylipin profile of *Arabidopsis thaliana*: A tool to scan for oxidative stresses / J.L. Montillet [et al.] // *Plant J.* – 2004. – V. 40, № 3. – P. 439-450.
258. Torres M.A. Reactive oxygen species. Signaling in response to pathogens / M. A. Torres, J.D.G. Jones, J.L. Dangl // *Plant Physiology*. – 2006. – V. 141. – P. 373-378.
259. Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in *Arabidopsis* / I. Gadjev [et al.] // *Plant Physiol.* – 2006. – V. 141, № 2. – P. 436-445.
260. Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii* / V. Mittova [et al.] // *Plant, Cell Envir.* – 2003. – V. 26. – P. 845-856.
261. Van Toai T. Postanoxic injury in soybean (*Glycine max*) seedlings / T. Van Toai, C. Bolles // *Plant Physiol.* – 1991. – V. 97. – P. 582-588.
262. Vranova E. Signal transduction during oxidative stress / E. Vranova, D. Inze, F. Van Breusegem // *J. Exp. Bot.* – 2002. – V. 53, № 372. – P. 1227-1236.
263. Wager H.G. The effect of subjecting peas to air enriched with carbon dioxide. I. The path of gaseous diffusion the content of CO<sub>2</sub> and the buffering of the tissue / H.G. Wager // *J. Exp. Bot.* – 1974. – V. 25, № 85. – P. 330-337.
264. Waterlogging-induced oxidative stress and antioxidant activity in pigeonpea genotypes / D. Kumutha [et al.] // *Biol. Plant.* – 2009. – V. 53. – P. 75-84.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1

Влияние гипоксии и CO<sub>2</sub> – среды на продукцию супероксидного анион-радикала в растениях

Вариант	3 ч		6 ч		9 ч		24 ч	
	мкМоль O <sub>2</sub> <sup>-</sup> мг <sup>-1</sup> белка	%	мкМоль O <sub>2</sub> <sup>-</sup> мг <sup>-1</sup> белка	%	мкМоль O <sub>2</sub> <sup>-</sup> мг <sup>-1</sup> белка	%	мкМоль O <sub>2</sub> <sup>-</sup> мг <sup>-1</sup> белка	%
горох								
контроль	1,10 ± 0,03	100	0,97 ± 0,04	100	0,69 ± 0,05	100	0,69 ± 0,05	100
гипоксия	1,355 ± 0,015	123,2	1,19 ± 0,08	122,7	0,83 ± 0,04	120,2	0,885 ± 0,055	128,3
CO <sub>2</sub> - среда	1,405 ± 0,055	127,7	1,195 ± 0,055	123,8	0,86 ± 0,06	124,6	1,00 ± 0,08	144,9
соя								
контроль	1,79 ± 0,09	100	1,72 ± 0,09	100	1,61 ± 0,08	100	1,57 ± 0,07	100
гипоксия	2,40 ± 0,06	134,1	2,10 ± 0,11	122,1	1,885 ± 0,045	117,1	1,725 ± 0,075	109,9
CO <sub>2</sub> - среда	2,58 ± 0,05	144,1	2,14 ± 0,1	124,4	1,685 ± 0,035	104,7	1,53 ± 0,08	97,5
кукуруза								
контроль	4,30 ± 0,20	100	4,70 ± 0,40	100	5,30 ± 0,50	100	4,20 ± 0,50	100
гипоксия	4,15 ± 0,05	96,5	4,55 ± 0,25	96,8	6,05 ± 0,15	114,2	5,30 ± 0,20	126
CO <sub>2</sub> - среда	3,95 ± 0,15	91,86	4,85 ± 0,05	103,2	6,20 ± 1,30	117	5,40 ± 0,50	128,6

Таблица 2

Влияние гипоксии и CO<sub>2</sub> – среды на продукцию гидропероксидов в растениях

Вариант	3 ч		6 ч		9 ч		24 ч	
	мкМоль HO <sub>2</sub> <sup>•</sup> мг <sup>-1</sup> белка	%	мкМоль HO <sub>2</sub> <sup>•</sup> мг <sup>-1</sup> белка	%	мкМоль HO <sub>2</sub> <sup>•</sup> мг <sup>-1</sup> белка	%	мкМоль HO <sub>2</sub> <sup>•</sup> мг <sup>-1</sup> белка	%
горох								
контроль	0,199 ± 0,010	100	0,228 ± 0,010	100	0,391 ± 0,010	100	0,391 ± 0,010	100
гипоксия	0,211 ± 0,005	106	0,262 ± 0,003	115	0,518 ± 0,029	132,5	0,638 ± 0,030	163,2
CO <sub>2</sub> - среда	0,268 ± 0,006	134,7	0,330 ± 0,007	144,7	0,623 ± 0,022	159,3	0,665 ± 0,005	170,1
соя								
контроль	0,925 ± 0,010	100	0,854 ± 0,080	100	1,027 ± 0,099	100	0,851 ± 0,080	100
гипоксия	0,840 ± 0,010	90,8	0,926 ± 0,073	108,4	0,790 ± 0,070	76,9	0,977 ± 0,013	114,8
CO <sub>2</sub> - среда	0,922 ± 0,197	99,7	0,891 ± 0,045	104,3	0,967 ± 0,055	94,2	0,988 ± 0,131	116,1
кукуруза								
контроль	0,732 ± 0,080	100	0,904 ± 0,111	100	1,084 ± 0,153	100	1,210 ± 0,320	100
гипоксия	0,989 ± 0,108	135,1	0,860 ± 0,101	95,1	1,176 ± 0,132	108,5	1,179 ± 0,210	97,4
CO <sub>2</sub> - среда	0,888 ± 0,042	121,3	0,909 ± 0,030	100,6	1,054 ± 0,100	97,2	1,438 ± 0,250	118,8

Таблица 3

Влияние гипоксии и CO<sub>2</sub> – среды на продукцию пероксида водорода в растениях

Вариант	3 ч		6 ч		9 ч		24 ч	
	мкМоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> мг <sup>-1</sup> белка	%	мкМоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> мг <sup>-1</sup> белка	%	мкМоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> мг <sup>-1</sup> белка	%	мкМоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> мг <sup>-1</sup> белка	%
горох								
контроль	0,250 ± 0,020	100	0,250 ± 0,020	100	0,310 ± 0,030	100	0,230 ± 0,020	100
гипоксия	0,480 ± 0,020	192	0,340 ± 0,010	136	0,615 ± 0,075	198	0,420 ± 0,040	182,6
CO <sub>2</sub> - среда	0,575 ± 0,034	230	0,550 ± 0,080	220	0,580 ± 0,050	187,1	1,010 ± 0,090	439
соя								
контроль	0,140 ± 0,030	100	0,150 ± 0,040	100	0,110 ± 0,030	100	0,090 ± 0,008	100
гипоксия	0,118 ± 0,010	84	0,192 ± 0,050	128	0,129 ± 0,030	118	0,102 ± 0,009	113
CO <sub>2</sub> - среда	0,136 ± 0,030	97	0,169 ± 0,030	113	0,134 ± 0,020	122	0,113 ± 0,020	125
кукуруза								
контроль	0,230 ± 0,040	100	0,140 ± 0,020	100	0,130 ± 0,007	100	0,076 ± 0,010	100
гипоксия	0,090 ± 0,010	39	0,150 ± 0,020	107	0,140 ± 0,030	108	0,050 ± 0,004	64
CO <sub>2</sub> - среда	0,119 ± 0,020	83	0,260 ± 0,010	186	0,117 ± 0,010	131	0,080 ± 0,010	105

Таблица 4

Влияние гипоксии и CO<sub>2</sub> – среды на содержание супероксидного анион-радикала в растениях гороха в присутствии фитогормонов

вариант	контроль		кинетин		эпибрассинолид	
	мкМоль O <sub>2</sub> <sup>-</sup> мг <sup>-1</sup> белка	% от контроля	мкМоль O <sub>2</sub> <sup>-</sup> мг <sup>-1</sup> белка	% от контроля	мкМоль O <sub>2</sub> <sup>-</sup> мг <sup>-1</sup> белка	% от контроля
<b>3 часа</b>						
воздух	1,29 ± 0,16	100	0,87 ± 0,10	67	0,84 ± 0,11	65
гипоксия	1,04 ± 0,13	81	1,17 ± 0,16	91	0,88 ± 0,12	68
CO <sub>2</sub> - среда	0,98 ± 0,12	76	0,97 ± 0,12	75	0,82 ± 0,10	64
<b>6 часов</b>						
воздух	1,16 ± 0,15	100	0,99 ± 0,12	85	1,15 ± 0,17	99
гипоксия	1,87 ± 0,21	161	1,22 ± 0,16	105	1,15 ± 0,16	99
CO <sub>2</sub> - среда	2,40 ± 0,30	207	1,22 ± 0,15	105	1,06 ± 0,13	91
<b>24 часа</b>						
воздух	0,64 ± 0,09	100	0,95 ± 0,11	148	0,97 ± 0,12	152
гипоксия	0,87 ± 0,10	136	1,05 ± 0,13	164	0,93 ± 0,13	145
CO <sub>2</sub> - среда	1,22 ± 0,15	191	1,16 ± 0,15	181	1,24 ± 0,16	194

Таблица 5

Влияние гипоксии и CO<sub>2</sub> – среды на содержание супероксидного анион-радикала в растениях сои в присутствии фитогормонов

вариант	контроль		кинетин		эпибрассинолид	
	мкМоль O <sub>2</sub> <sup>-</sup> мг <sup>-1</sup> белка	% от контроля	мкМоль O <sub>2</sub> <sup>-</sup> мг <sup>-1</sup> белка	% от контроля	мкМоль O <sub>2</sub> <sup>-</sup> мг <sup>-1</sup> белка	% от контроля
<b>3 часа</b>						
воздух	3,00 ± 0,02	100	3,30 ± 0,27	110	2,70 ± 0,11	90
гипоксия	1,80 ± 0,17	60	3,20 ± 0,26	107	3,50 ± 0,12	117
CO <sub>2</sub> - среда	2,40 ± 0,12	80	1,20 ± 0,08	40	2,50 ± 0,10	83
<b>6 часов</b>						
воздух	3,60 ± 0,25	100	2,80 ± 0,09	78	4,10 ± 0,27	113
гипоксия	4,10 ± 0,21	113	3,60 ± 0,12	100	3,20 ± 0,18	89
CO <sub>2</sub> - среда	3,50 ± 0,30	97	3,10 ± 0,25	86	4,10 ± 0,19	113
<b>24 часа</b>						
воздух	5,10 ± 0,39	100	5,30 ± 0,31	104	5,80 ± 0,32	114
гипоксия	7,10 ± 0,30	139	6,20 ± 0,33	121	6,00 ± 0,42	117
CO <sub>2</sub> - среда	7,30 ± 0,55	143	6,40 ± 0,25	125	5,50 ± 0,26	108

Таблица 6

Влияние гипоксии и CO<sub>2</sub> – среды на содержание супероксидного анион-радикала в растениях кукурузы в присутствии фитогормонов

вариант	контроль		кинетин		эпибрассинолид	
	мкМоль O <sub>2</sub> <sup>-</sup> мг <sup>-1</sup> белка	% от контроля	мкМоль O <sub>2</sub> <sup>-</sup> мг <sup>-1</sup> белка	% от контроля	мкМоль O <sub>2</sub> <sup>-</sup> мг <sup>-1</sup> белка	% от контроля
<b>3 часа</b>						
воздух	2,60 ± 0,16	100	3,60 ± 0,11	138	3,40 ± 0,21	131
гипоксия	1,40 ± 0,11	54	2,90 ± 0,26	112	2,50 ± 0,12	96
CO <sub>2</sub> - среда	1,20 ± 0,12	46	3,80 ± 0,32	146	2,80 ± 0,11	108
<b>6 часов</b>						
воздух	3,50 ± 0,25	100	5,40 ± 0,42	154	4,60 ± 0,37	131
гипоксия	3,80 ± 0,21	109	4,80 ± 0,36	137	4,50 ± 0,26	129
CO <sub>2</sub> - среда	4,00 ± 0,30	114	4,30 ± 0,35	123	4,50 ± 0,43	129
<b>24 часа</b>						
воздух	1,50 ± 0,10	100	3,60 ± 0,21	240	5,50 ± 0,42	366
гипоксия	6,80 ± 0,50	453	3,70 ± 0,23	246	3,30 ± 0,21	220
CO <sub>2</sub> - среда	3,90 ± 0,15	260	3,70 ± 0,35	246	2,50 ± 0,16	167



Таблица 7

Влияние гипоксии и CO<sub>2</sub> – среды на продукцию супероксидного анион-радикала в хлоропластах растений гороха, сои и кукурузы

вариант	горох		соя		кукуруза	
	мкМоль O <sub>2</sub> <sup>-</sup> мг <sup>-1</sup> белка	% от контроля	мкМоль O <sub>2</sub> <sup>-</sup> мг <sup>-1</sup> белка	% от контроля	мкМоль O <sub>2</sub> <sup>-</sup> мг <sup>-1</sup> белка	% от контроля
<b>3 часа</b>						
воздух	12,7 ± 1,4	100	3,3 ± 0,27	100	34,6 ± 2,4	100
гипоксия	34,9 ± 2,6	275	3,5 ± 0,26	107	35,3 ± 2,0	102
CO <sub>2</sub> - среда	31,9 ± 3,2	251	2,8 ± 0,08	85	26,9 ± 1,2	78
<b>6 часов</b>						
воздух	16,6 ± 1,12	100	2,8 ± 0,09	100	93,9 ± 7,20	100
гипоксия	23,8 ± 1,36	143	3,4 ± 0,12	120	45,5 ± 3,70	48
CO <sub>2</sub> - среда	14,7 ± 1,15	89	2,7 ± 0,25	95	51,8 ± 4,15	55
<b>24 часа</b>						
воздух	15,2 ± 1,17	100	5,3 ± 0,31	100	34,7 ± 2,10	100
гипоксия	14,8 ± 1,06	97	5,9 ± 0,33	112	36,0 ± 2,80	104
CO <sub>2</sub> - среда	21,2 ± 1,13	139	5,6 ± 0,25	105	35,3 ± 2,45	102

Таблица 8

Влияние гипоксии и CO<sub>2</sub> – среды на продукцию супероксидного анион-радикала в цитоплазме растений гороха, сои и кукурузы

вариант	горох		соя		кукуруза	
	мкМоль O <sub>2</sub> <sup>-</sup> мг <sup>-1</sup> белка	% от контроля	мкМоль O <sub>2</sub> <sup>-</sup> мг <sup>-1</sup> белка	% от контроля	мкМоль O <sub>2</sub> <sup>-</sup> мг <sup>-1</sup> белка	% от контроля
<b>3 часа</b>						
воздух	1,9 ± 0,11	100	2,7 ± 0,11	100	1,3 ± 0,10	100
гипоксия	1,8 ± 0,12	95	3,2 ± 0,12	117	1,6 ± 0,08	123
CO <sub>2</sub> - среда	1,5 ± 0,10	79	2,2 ± 0,10	83	1,8 ± 0,09	138
<b>6 часов</b>						
воздух	0,5 ± 0,01	100	4,1 ± 0,27	100	2,0 ± 0,15	100
гипоксия	0,6 ± 0,06	120	3,6 ± 0,18	89	1,2 ± 0,09	60
CO <sub>2</sub> - среда	0,7 ± 0,01	140	4,6 ± 0,19	113	1,8 ± 0,12	90
<b>24 часа</b>						
воздух	0,2 ± 0,012	100	5,8 ± 0,32	100	2,0 ± 0,13	100
гипоксия	0,5 ± 0,023	250	6,8 ± 0,42	117	1,9 ± 0,11	95
CO <sub>2</sub> - среда	0,7 ± 0,036	350	6,0 ± 0,26	108	2,1 ± 0,16	105