

На правах рукописи

Бердникова Ольга Сергеевна

Бердн

**ВОЗДЕЙСТВИЕ ГИПОКСИИ И СРЕДЫ ВЫСОКИХ
КОНЦЕНТРАЦИЙ CO₂ НА ОБРАЗОВАНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ
КИСЛОРОДА В КЛЕТКАХ РАЗЛИЧНЫХ ПО УСТОЙЧИВОСТИ
РАСТЕНИЙ**

Специальность – 03.01.04 Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Воронеж – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Воронежский государственный педагогический университет» (ФГБОУ ВПО «ВГПУ»).

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Ершова Антонина Николаевна

Официальные оппоненты: **Минибаева Фарида Вилевна**
доктор биологических наук, ФГБУН
Казанский институт биохимии и биофизики
Казанского научного центра Российской
академии наук, лаборатория
окислительно-восстановительного
метаболизма, заведующий

Сафонова Ольга Анатольевна
кандидат биологических наук, доцент,
ФГБОУ ВО «Воронежский государственный
университет», кафедра медицинской
биохимии и микробиологии, доцент

Ведущая организация: ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, г. Иркутск

Защита диссертации состоится «12» февраля 2016 года в 15-30 часов на заседании диссертационного совета Д.212.038.03 при Воронежском государственном университете по адресу: 394006, Воронеж, Университетская пл., 1, ауд. 59

Автореферат диссертации размещен на официальном сайте Минобрнауки Российской Федерации и на сайте Воронежского государственного университета <http://www.science.vsu.ru>

С диссертацией можно ознакомиться в зональной научной библиотеке Воронежского государственного университета

Автореферат разослан «11» января 2016 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета

доктор биологических наук, профессор



Грабович М.Ю.

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 (Crawford, 2003). Недостаток кислорода может вызывать серьезные метаболические изменения в клетках растений, поэтому изучение механизмов адаптации растений к гипоксии имеет важное научное и практическое значение (Banti et al., 2013). В условиях дефицита кислорода в клетках растений усиливаются процессы перекисного окисления липидов (Monk et al., 1987; Ершова, 1996). Повышение интенсивности пероксидации липидов может быть также следствием активации у растений процессов свободнорадикального окисления, связанных с образованием различных активных форм кислорода (АФК) (Калашников и др., 1994).

Процессы образования АФК, являющихся продуктами неполного восстановления молекулярного кислорода до воды, исследуются в различных организмах на протяжении длительного времени (Мерзляк, 1989). Один из механизмов образования АФК может быть связан с работой ферментов, включая и липоксигеназу (Гречкин и др., 1999; Тарчевский, 2002). 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 (Минибаева и др., 1997), включая и гипоксию (Ершова, 1996, 2007). Однако остаются дискуссионными многие вопросы, связанные с образованием АФК, ускорением процессов свободнорадикального окисления, изменением активности ферментов в растениях при действии гипоксического стресса. Образование АФК и процессы пероксидации липидов могут протекать в условиях гипо- и аноксии, но значительно возрастают при возвращении растений на воздух (условия реаэрации) (Чиркова и др., 1998; Blokhina et al., 2003).

В тоже время, в других исследованиях (Pavelic et al., 2000) 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 (Землянухин и др., 1986; Ершова, 1996-2012).

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 CO_2 – среды.

Научная новизна. Впервые проведено исследование продукции различных типов АФК в клетках растений, различающихся по устойчивости к условиям кратковременной (до суток) гипоксии и среды высоких концентраций CO_2 . Исследована активность ферментов антиоксидантной системы, таких как супероксиддисмутаза, каталаза, общей пероксидазы, аскорбатпероксидазы в данных условиях. Отмечено, что активность 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 R_f . Установлено наличие прямой корреляции между степенью устойчивости растений к гипоксии, скоростью свободнорадикальных процессов, продукцией АФК и активностью антиоксидантных ферментов. Отмечено, что высокие концентрации CO_2 значительно усиливали как накопление разных типов АФК, так и повышали активность антиоксидантных ферментов и липоксигеназы, в отличие от условий 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 (Ершова, 1996).

Практическая значимость. Отработаны методики по исследованию содержания различных типов АФК в тканях и отдельных клеточных компартментах растений с использованием методов биохемилюминесценции 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 и в учебном процессе разных ВУЗов. Материалы исследований применяются при подготовке учебных программ дисциплин «Молекулярные основы адаптации растений к стрессам», «Гормональная система растений и ее роль в адаптации к стрессам» 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 скорость 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. Установлено, что 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 активность 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.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Объектами исследования служили 10-12 дневные растения гороха (Рамонский 77), сои (Белгородская 48) и кукурузы (Воронежская 76), выращенные на свету методом гидропоники при +25°C и 12-часовом фотопериоде. Семена растений были получены из коллекции ВНИИСС им. А.Л. Мазлумова.

Условия постановки опытов. Проростки растений без корней и семядолей помещали в затемненные вакуум-эксикаторы объемом 5 л, через которые пропускали газовые среды: воздух, азот и углекислый газ (из баллонов) со скоростью 25 см³/сек⁻¹ в течение 3-24 часов по ранее разработанной методике (Ершова и др., 1996). Присутствие кислорода в баллоне с азотом составляло не более 0,5 % (по сертификату), что позволяет считать используемые в опытах условия гипоксическими.

В ряде опытов применяли регуляторы роста кинетин и эпибрассинолид (10 мг/л в 0,1 М Na-фосфатном буфере pH 7,2) которые вводили в надземную часть проростков методом насыщения с транспирационным током в течение 12 часов в темновых условиях и затем помещали в условия разных газовых сред.

Свободнорадикальное окисление в растениях определяли методом железо-индуцированной хемилюминесценции с использованием биохемилюминометра БХЛ-07 (Россия) с программным обеспечением. Кинетическую кривую регистрировали через 30 с, при этом определяли интенсивность максимальной вспышки (I_{\max}) и светосумму медленной вспышки (S) (Владимиров и др., 2009).

Содержание супероксидного анион-радикала оценивали спектрофотометрически по накоплению адrenoхрома, продукта взаимодействия супероксидного анион-радикала с эпинефрином (адrenalином) (Часов и др., 2002). Оптическую плотность растворов измеряли на СФ-56 («ЛОМО», Россия) при длине волны 480 нм. Содержание супероксидного анион-радикала рассчитывали с учетом коэффициента экстинкции $\epsilon = 4020 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Определение супероксидного анион-радикала в пробах данным методом было подтверждено с помощью ингибирования реакции его образования в присутствии фермента СОД. В предварительных опытах при внесении фермента СОД («Sigma», США) в пробу, содержащую адреналин и растительную фракцию, продукция супероксидного анион-радикала блокировалась на 80-95 %.

Для определения гидропероксидов использовали методику (Романова и др., 1977) в нашей модификации. Оптическую плотность растворов измеряли на СФ-56 при длине волны 480 нм. Для расчета содержания гидропероксидов в тканях растений использовали калибровочную кривую, построенную для различных концентраций пероксида водорода, и рассчитывали на мг белка.

Содержание пероксид водорода в исследуемых пробах определяли энзиматическим методом с использованием пероксидазы и о-дианизидина (Васильева и др., 2007). Оптическую плотность измеряли на СФ-56 при длине волны 460 нм. Количество пероксида водорода в пробах рассчитывали, используя коэффициент экстинкции $\epsilon = 11,3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Определение активности липоксигеназы проводили спектрофотометрическим методом, добавляя в пробу в качестве субстрата линолевую кислоту (Ильинская и др., 2000). Оптическую плотность растворов определяли при длине волны 234 нм. Активность фермента рассчитывали с использованием коэффициента экстинкции ($\epsilon = 25000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) и пересчитывали на мг белка.

Исследование активности антиоксидантных ферментов. Активность супероксиддисмутазы определяли спектрофотометрически по скорости окисления NADH в присутствии нитросинего тетразолия и феназинметасульфата по методике (Прадедова и др., 2009) в нашей модификации. Оптическую плотность определяли на СФ-56 при длине волны 560 нм. Активность фермента рассчитывали с использованием коэффициента экстинкции ($\epsilon = 3,98 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) и пересчитывали на мг белка. Активность каталазы, общей пероксидазы и аскорбатпероксидазы определяли методом (De Marco et al., 1996), с использованием соответствующих коэффициентов экстинкции.

Клеточные фракции (митохондрии, хлоропласты, цитоплазма) получали методом дифференциального центрифугирования (Гавриленко и др., 1975). Чистоту фракций хлоропластов оценивали по содержанию хлорофилла (Гродзинский и др., 1973), а фракций митохондрий – по сукцинатдегидрогеназе (СДГ), активность которой определяли по скорости восстановления дихлорфенолиндофенола в присутствии ФМС в реакции ферментативного окисления сукцината (Cooper et al., 1969).

Электрофоретическое исследование липоксигеназы, выделенной из различных клеточных фракций, проводили в полиакриламидном геле (ПААГ) по методике (Дэвис, 1970). Для концентрирования белковых растворов применяли крупнопористый 2,0 % ПААГ; для разделения –

мелкопористый – 7,5 % гель. Зоны локализации молекулярных форм липоксигеназ выявляли методом, основанным на образовании йод-крахмального комплекса в присутствии йодистого калия и гидроперекисей линолевой кислоты (Heydeck et al., 1985). Перед полимеризацией в нижний гель вносили растворимый крахмал до конечной концентрации 1%. В ячейки геля помещали анализируемые фракции митохондрий, хлоропластов и цитоплазмы (50 мкл). 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...+4⁰С в течение 2-3 часов. После окончания электрофореза пластинки геля разрезались на две части. На одной находились маркерные ферменты, которые проявляли с помощью кумасси R-250. Оставшуюся часть электрофоретической пластинки помещали на 30 мин в раствор, содержащий 0,5% линолевою кислоту в 0,1 М трис-НСl-буфере, рН 6,8. Затем тщательно отмывали дистиллированной водой и помещали в 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.

Содержание белка во всех пробах определяли по методу (Lowry et al., 1951) при длине волны 750 нм.

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 значений и их стандартных отклонений.

ВЛИЯНИЕ РАЗНЫХ ГАЗОВЫХ СРЕД НА ПРОЦЕССЫ ОБРАЗОВАНИЯ АФК В РАСТЕНИЯХ

Метод хемилюминесценции позволяет определить скорость процессов свободнорадикального окисления (СРО) в растениях в стрессовых условиях, включая гипоксию. Нами было показано, что в тканях неустойчивых к гипоксии проростков гороха отмечались более интенсивные изменения показателей хемилюминесценции, в отличие от среднеустойчивых растений сои и кукурузы в условиях дефицита кислорода. С течением времени у этих растений происходила нормализация интенсивности процессов СРО в клетках. В дальнейших исследованиях определяли содержание различных типов АФК в клетках растений при действии гипоксии. При анализе продукции супероксидного анион-радикала нами было показано его накопление в растениях гороха к концу опыта на 25-45 % в различных газовых средах, в отличие от сои, в клетках которой содержание данной АФК после увеличения в первые часы опыта, к концу снижалась до уровня контроля (рис. 1). В проростках кукурузы только к концу опыта (24 ч) происходило небольшое увеличение его концентрации.

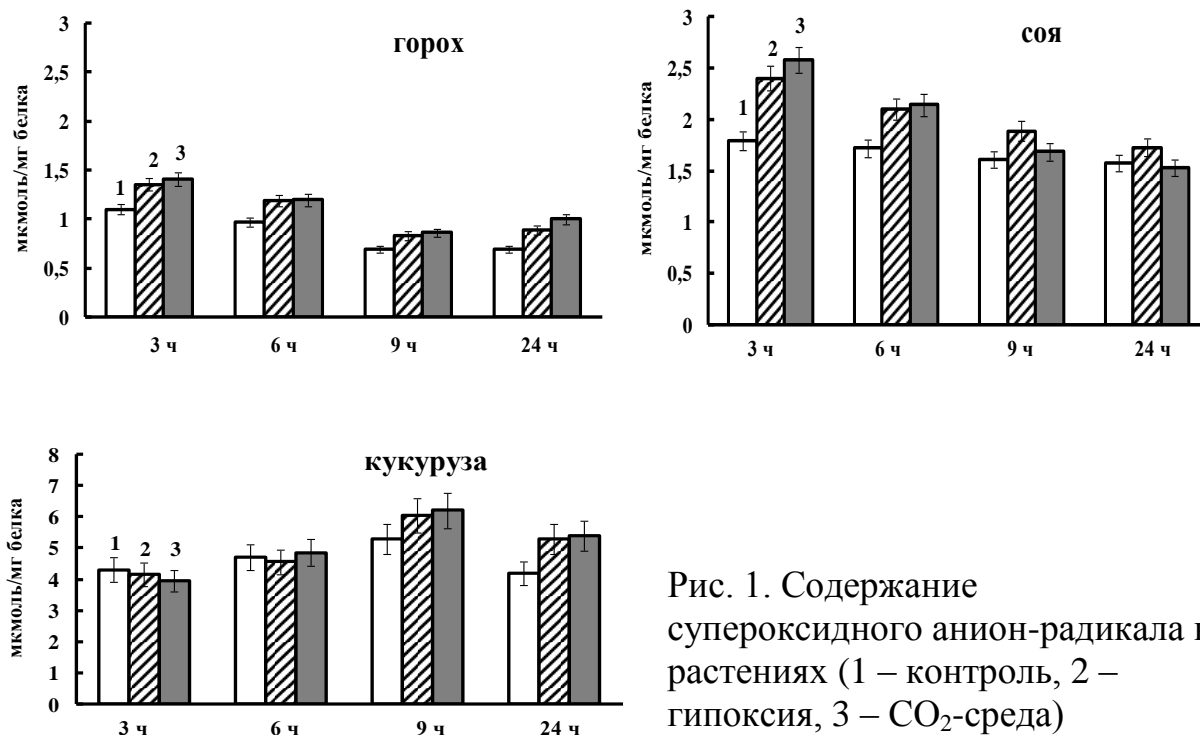


Рис. 1. Содержание супероксидного анион-радикала в растениях (1 – контроль, 2 – гипоксия, 3 – СО₂-среда)

Известно, что супероксид в клетках растений может быть источником гидропероксидных радикалов, наиболее сильных окислителей из рассматриваемых типов АФК (Альмейда и др., 2003). Было обнаружено, что несмотря на более высокое исходное содержание гидропероксидных радикалов в более устойчивых растениях сои и кукурузы не было отмечено существенного накопления данной АФК в условиях кратковременной (до суток) гипоксии и СО₂ – среды.

В неустойчивых к гипоксии растениях гороха его содержание возросло к концу опыта в 1,7 раза. Наиболее же стабильным типом АФК в клетках растений является пероксид водорода. Проведенный анализ показал наиболее существенное накопление пероксида водорода именно в растениях гороха в 1,8 и 4 раза при действии гипоксии и СО₂ – среды соответственно (рис. 2).

Липоксигеназный путь образования АФК в растениях в условиях гипоксии является дискуссионным вопросом. В связи с этим была проанализирована активность фермента в растениях в условиях кратковременной (до суток) гипоксии и СО₂ – среды. Результаты опытов, приведенные в табл. 1 показали, что в тканях неустойчивых проростков гороха после повышения в первые 3 и 6 часов действия гипоксии, происходило более значительное падение активности липоксигеназы по сравнению проростками сои и кукурузы, в которых активность фермента к концу опыта сохранялась близкой к контролю или была немного ниже его. Было отмечено, что СО₂ – среда усиливала эффекты гипоксии на активность липоксигеназы, что подтверждает высказанное ранее мнение (Ершова, 2007) о специфичности действия данного компонента газовой среды на метаболические процессы растений, включая и процессы накопления АФК.

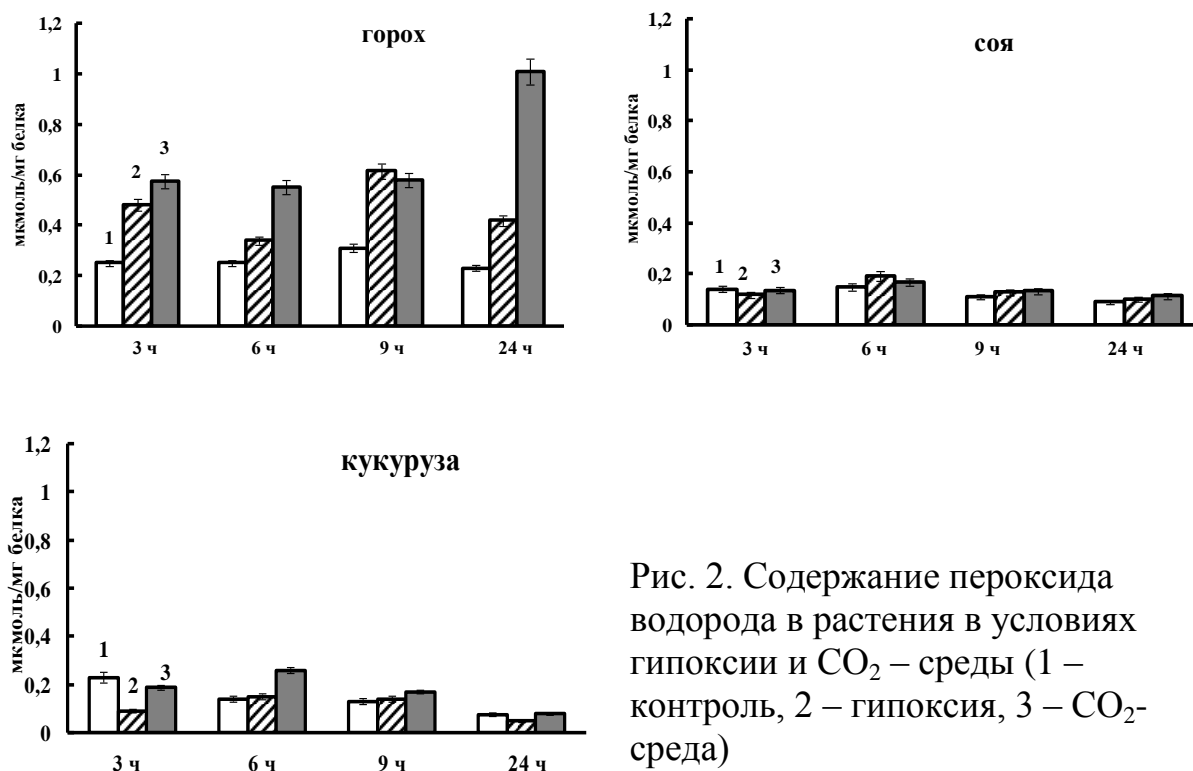


Рис. 2. Содержание пероксида водорода в растениях в условиях гипоксии и CO₂ – среды (1 – контроль, 2 – гипоксия, 3 – CO₂-среда)

Таблица 1.

Влияние условий кратковременной гипоксии и CO₂ – среды на активность липоксигеназы в проростках растений (мкМоль/ мг белка)

| Вариант | 3 ч | 6 ч | 9 ч | 24 ч |
|-------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| горох | | | | |
| контроль | 64,5 ± 6,0 | 70,8 ± 8,1 | 70,0 ± 7,5 | 67,0 ± 7,3 |
| гипоксия | 90,3 ± 4,5 | 84,9 ± 1,5 | 63,7 ± 5,9 | 20,8 ± 2,2 |
| CO ₂ - среда | 77,4 ± 9,4 | 76,5 ± 3,5 | 74,2 ± 8,2 | 10,7 ± 0,9 |
| соя | | | | |
| контроль | 98,3 ± 6,3 | 122,3 ± 9,4 | 152,3 ± 20,0 | 150,5 ± 13,7 |
| гипоксия | 160,5 ± 10,5 | 161,2 ± 4,9 | 145,2 ± 25,0 | 155,3 ± 12,0 |
| CO ₂ - среда | 168,8 ± 1,0 | 155,4 ± 20,0 | 173,8 ± 1,7 | 136,4 ± 15,0 |
| кукуруза | | | | |
| контроль | 118,1 ± 1,1 | 94,4 ± 1,5 | 87,4 ± 6,8 | 135,4 ± 12,1 |
| гипоксия | 110,4 ± 7,9 | 103,4 ± 18,4 | 61,1 ± 6,7 | 115,8 ± 2,9 |
| CO ₂ - среда | 157,5 ± 13,0 | 155,6 ± 6,4 | 126,0 ± 11,9 | 93,9 ± 8,5 |

АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В РАСТЕНИЯХ ПРИ ДЕЙСТВИИ ГИПОКСИИ

Среди высокомолекулярных антиоксидантов важнейшую роль в растениях играют ферменты супероксиддисмутаза, каталаза и группа пероксидаз. Ранее (Калашников и др., 1994; Шалыго и др., 2012) было показано изменение активности антиоксидантных ферментов у растений, подвергнутых действию гипоксии, однако для условий кратковременной экспозиции (до 24 час.) такие исследования не проводились.

В связи с этим нами было проведено исследование активности антиоксидантных ферментов в растениях в условиях кратковременного гипоксического стресса. В растения гороха активность СОД через 6 часов гипоксии возрастала на 75 %, однако затем снижалась (рис. 3). При действии CO_2 – среды активность фермента возрастала в 1,5 раза, но только к 9 часам, однако к концу опыта падала до уровня контроля. В клетках сои активность СОД была выше аэрируемых растений уже через три часа опыта почти в 2,5 раза. К 6 часам она достигала 300 %, и оставалась значительной до конца опыта. Влияние CO_2 – среды вызвало еще большее повышение активности СОД. В клетках кукурузы активность СОД возрастала почти в 6 раз уже в первые часы действия гипоксии, а в условиях CO_2 – среды она достигала до 900 % по отношению к аэрируемым растениям. К 9 часам активность фермента в 3 раза превышала уровень аэрируемых растений.

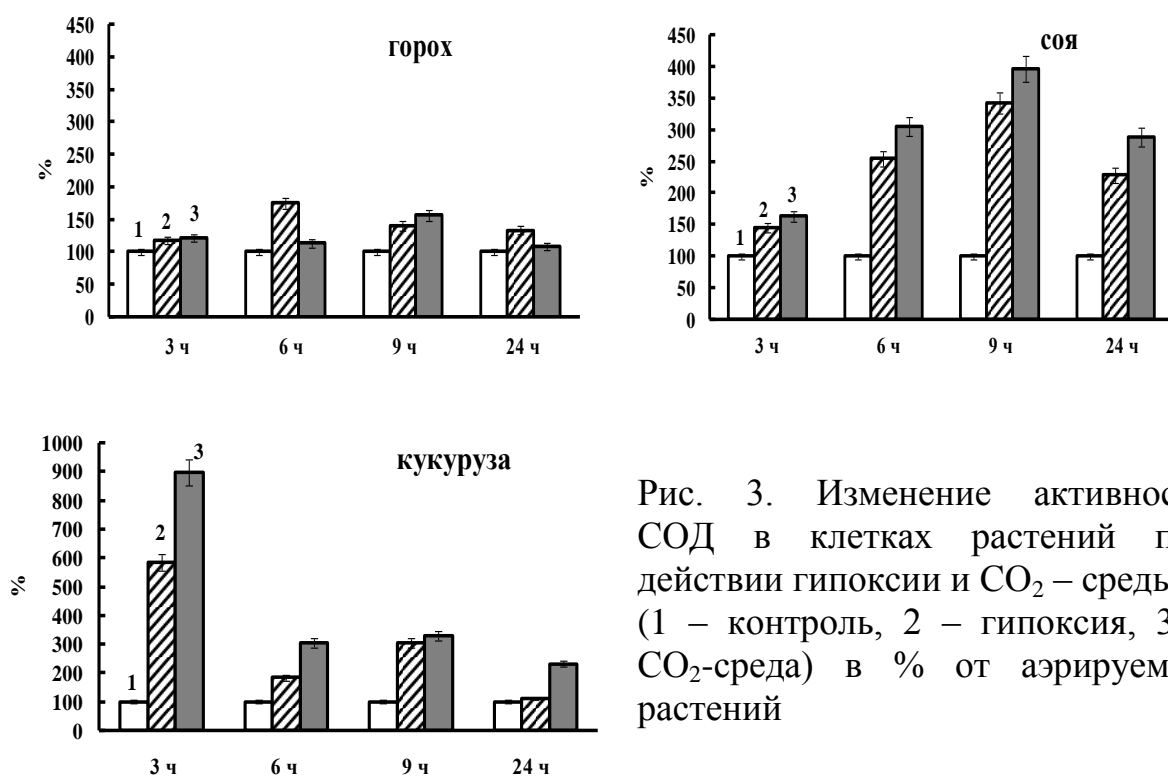


Рис. 3. Изменение активности СОД в клетках растений при действии гипоксии и CO_2 – среды (1 – контроль, 2 – гипоксия, 3 – CO_2 -среда) в % от аэрируемых растений

Полученные данные по изменению активности СОД у различных растений подтверждают результаты проведенных ранее исследований, в которых был отмечен более низкий уровень накопления всех типов АФК в клетках более устойчивых проростков сои и кукурузы, чем у менее устойчивых проростков гороха. Было показано, что высокие концентрации CO_2 , в отличие от условий гипоксии, оказывали более существенное влияние и на активность СОД во всех анализируемых растениях, что проявлялось в более значительном повышении активности фермента в их клетках, начиная уже с первых часов действия CO_2 – среды. В дальнейших опытах определяли

активность антиоксидантных ферментов каталазы, аскорбатпероксидазы и пероксидазы у растений в те же сроки экспозиции. Было обнаружено (рис. 4), что в условиях гипоксии у растений сои в первые часы опыта активность каталазы возрастала в 3 раза, а к концу опыта она увеличивалась почти в 10 раз по отношению к контролю.

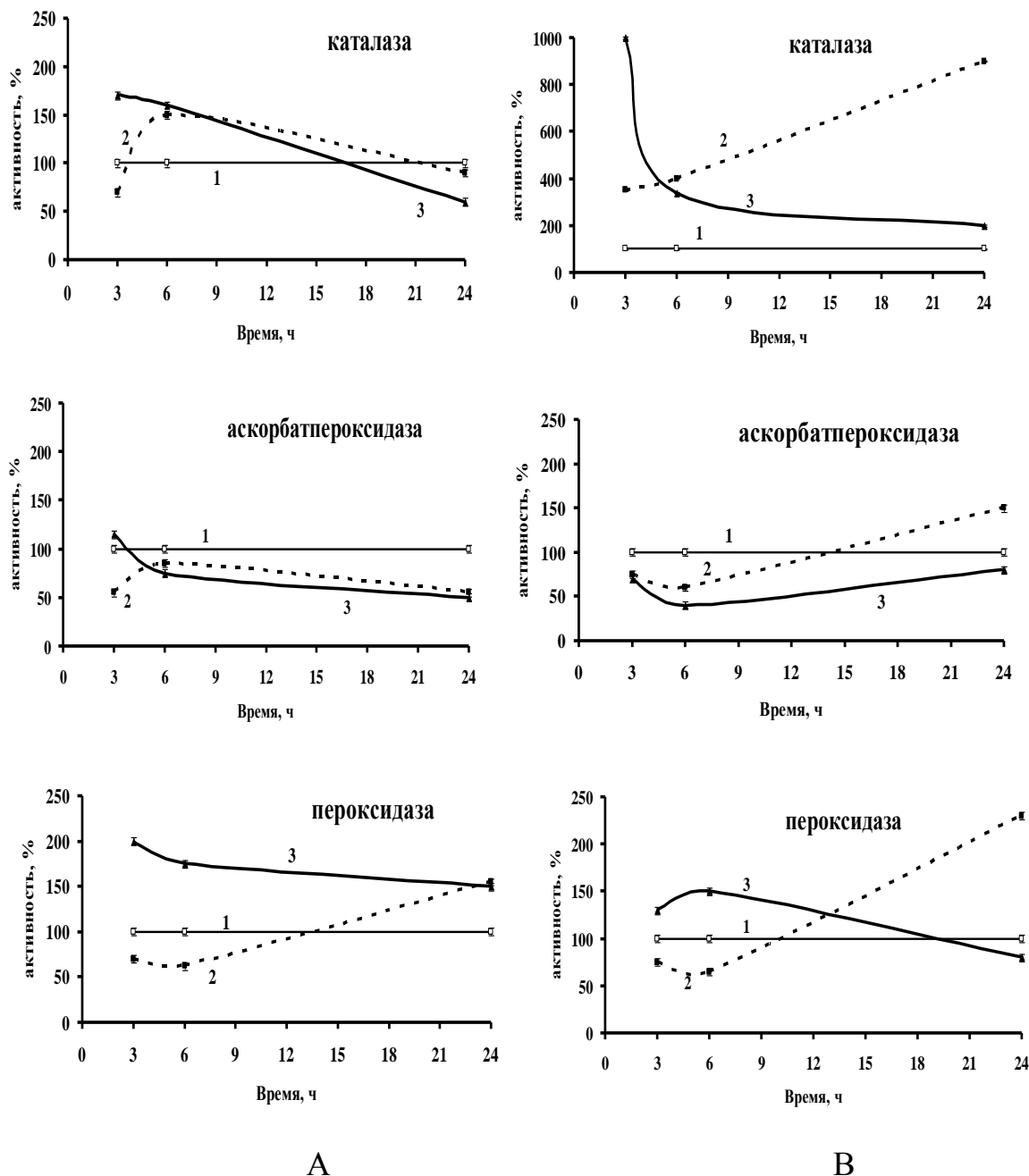


Рис. 4. Изменение активности ферментов антиоксидантной системы клеток растений гороха (А) и сои (В) при действии гипоксии и CO₂ – среды (1 – контроль, 2 – гипоксия, 3 – CO₂-среда)

При действии CO₂ - среды уже в первые часы экспозиции отмечали такое же 10-кратное увеличение активности фермента. С увеличением сроков экспозиции растений в условиях гипоксии до 24 часов функция защиты от АФК, вероятно, переходила к ферментам пероксидазной группы, что

подтверждалось повышением активности общей пероксидазы и аскорбатпероксидазы в клетках растений в этот период. У более устойчивых проростков сои отмечался и более низкий уровень накопления в клетках разных типов АФК. К концу опыта активность каталазы снижалась, но все еще оставалась выше, чем в контроле, в 2,5 раза. У проростков гороха активность каталазы повышалась менее значительно и только в среде CO_2 .

Активность аскорбатпероксидазы и общей пероксидазы у исследуемых растений менялась в меньшей степени.

В клетках растений сои активность этих ферментов увеличивалась только через 24 ч действия гипоксии до 150 и 235 % соответственно. Высокие концентрации CO_2 вызывали в начале опыта снижение активности аскорбатпероксидазы и увеличение активности общей пероксидазы. К концу опыта в клетках проростков сои активность ферментов возвращалась к норме. У гороха активность ферментов пероксидазной группы в условиях высокого содержания 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 наблюдалось повышение активности только общей пероксидазы к концу опыта. Показано, что CO_2 – среда вызывала более значительные изменения активности ферментов антиоксидантной системы, чем условия обычной гипоксии. У растений сои особенно это было выражено в изменения активности каталазы, когда уже при 3-часовой экспозиции в среде с CO_2 ее активность возрастала до такой величины, которая была характерна для фермента, но только через 24 часа действия гипоксии.

ВЛИЯНИЕ ФИТОГОРМОНОВ НА ОБРАЗОВАНИЕ АФК В РАСТЕНИЯХ В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ И CO_2 -СРЕДЫ

Известно, что фитогормоны участвуют в процессах адаптации растений к различным неблагоприятным факторам внешней среды (Шакирова, 2001). Было показано, что фитогормоны подавляли процессы пероксидации липидов, которые активизировались у растений при действии гипоксического стресса (Ершова и др., 1996). В связи с этим в дальнейших исследованиях у растений, предварительно обработанных кинетином и эпибрассинолидом, определяли скорость процессов СРО методом хемилюминесценции.

Полученные нами данные показали, что действие эпибрассинолида на процессы СРО было более выраженным, чем действие кинетина, но только у неустойчивых проростков гороха. У более устойчивых растений кукурузы значительное снижение процессов СРО (в 1,5 раза) наблюдалось после обработки их кинетином, также как и у сои, где эпибрассинолид практически не влиял на скорость данных процессов. Отмечено, что подобное действие фитогормонов проявлялось у исследуемых растений и в среде высоких концентраций диоксида углерода.

Одновременно определяли действие фитогормонов на содержание различных типов АФК у растений в условиях гипоксии (рис. 5).

Предобработка растений гороха кинетином снижала уровень пероксида на 40-50%. В клетках сои предобработка кинетином приводила к уменьшению концентрации пероксида водорода как при действии гипоксии, так и в CO_2 – среде. Эпибрассинолид снижал содержания АФК почти в 2 раза, особенно через 6-часов действия газовых сред. У кукурузы предобработка кинетином привела к снижению содержания пероксида водорода к концу опыта в 1,8 раза в условиях гипоксии и в 1,5 раза – в CO_2 – среде.

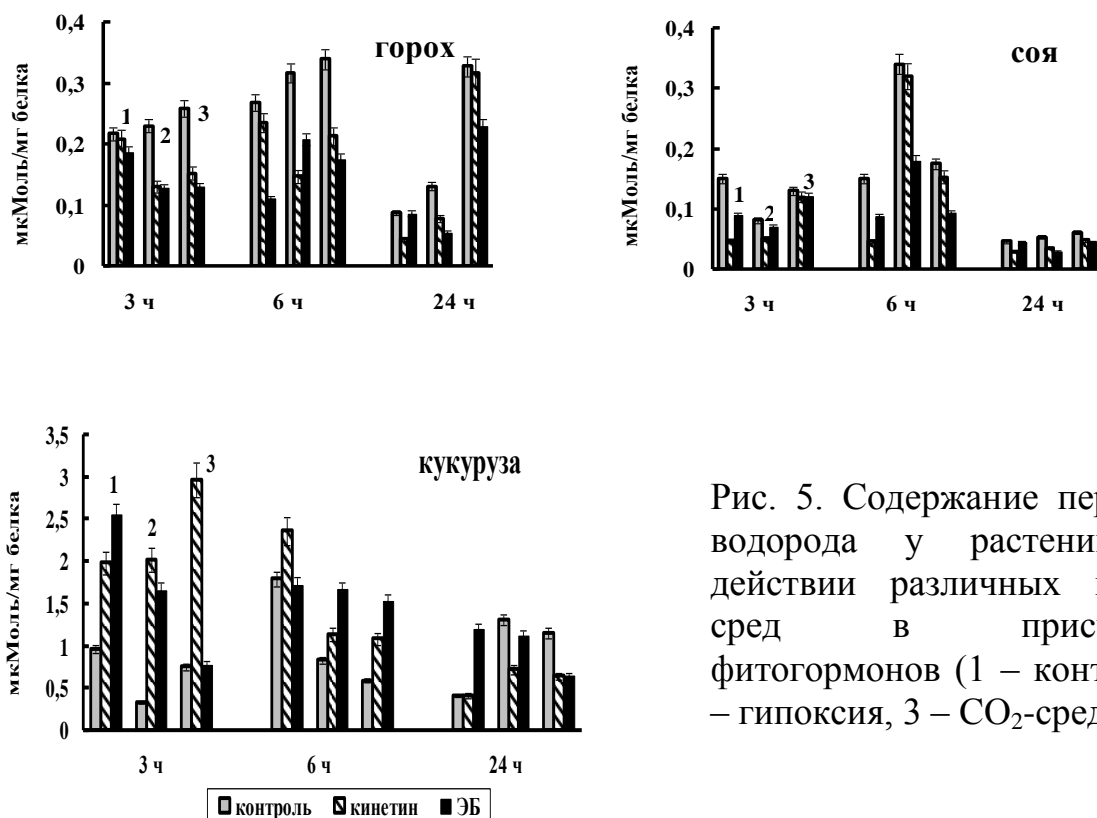


Рис. 5. Содержание пероксида водорода у растений при действии различных газовых сред в присутствии фитогормонов (1 – контроль, 2 – гипоксия, 3 – CO_2 -среда)

ОБРАЗОВАНИЕ АФК И АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ В КЛЕТОЧНЫХ ОРГАНЕЛЛАХ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ РАЗНЫХ ГАЗОВЫХ СРЕД

Клеточные компартменты могут вносить вклад в процесс накопления активных форм кислорода в растениях в условиях гипоксического стресса (Sairam et al., 2008). В дальнейших опытах исследовали роль разных органоидов в образовании АФК и активности ферментов в исследуемых растениях в условиях гипоксии и CO_2 – среды. Чистота выделенных фракций растений устанавливалась с использованием маркерного фермента СДГ и содержания хлорофилла. Полученные результаты показали высокую степень чистоты фракции митохондрий, в которой активность СДГ составляла 82-92 %, а содержание хлорофилла 1,1-1,5 %.

В дальнейших опытах исследовали скорость образование различных типов АФК в клеточных компартментах растений в условиях гипоксического стресса. В митохондриях анализируемых растений было показано изменение содержания пероксида водорода при действии разных газовых сред. В табл. 2

представлены результаты опытов по накоплению пероксида водорода в различных компартментах через 24 часа действия газовых сред.

Таблица 2.

Содержание пероксида водорода клеточных компартментах растений через 24 часа действия гипоксии и CO₂ – среды (мкМоль/ мг белка)

| вариант | митохондрии | хлоропласты | цитоплазма |
|-------------------------|---------------|---------------|---------------|
| <i>горох</i> | | | |
| контроль | 0,79 ± 0,09 | 0,84 ± 0,07 | 1,67 ± 0,12 |
| гипоксия | 1,11 ± 0,20 | 2,04 ± 0,16 | 1,39 ± 0,13 |
| CO ₂ - среда | 0,90 ± 0,11 | 5,09 ± 0,33 | 1,40 ± 0,36 |
| <i>соя</i> | | | |
| контроль | 1,05 ± 0,09 | 4,16 ± 0,50 | 1,86 ± 0,19 |
| гипоксия | 0,82 ± 0,09 | 4,99 ± 0,64 | 1,37 ± 0,15 |
| CO ₂ - среда | 0,99 ± 0,11 | 5,66 ± 0,46 | 2,59 ± 0,28 |
| <i>кукуруза</i> | | | |
| контроль | 0,302 ± 0,020 | 1,960 ± 0,110 | 0,345 ± 0,030 |
| гипоксия | 0,141 ± 0,010 | 1,145 ± 0,060 | 0,339 ± 0,025 |
| CO ₂ - среда | 0,120 ± 0,015 | 2,490 ± 0,190 | 0,326 ± 0,038 |

Обнаружено, что в митохондриях гороха отмечалось наибольшее накопление пероксида водорода, в отличие от среднеустойчивых растений сои и кукурузы.

Впервые показана возможность накопления супероксидного анион-радикала и пероксида водорода в митохондриях растений в условиях кратковременной (до суток) гипоксии. При этом их образование зависело от сроков действия и степени устойчивости растений к дефициту кислорода. Отмечено, что действие CO₂ – среды на растения гороха и сои было на некоторых этапах более эффективным в отношении образования АФК, чем условия обычной гипоксии.

В дальнейших опытах нами был проведен электрофоретический анализ белковых компонентов митохондрий растений через 3 часа действия газовых сред, с последующим специфическим окрашиванием на присутствие фермента липоксигеназы. Как видно (рис. 6), в митохондриях гороха проявлялись четко выраженные полосы липоксигеназы с величиной Rf=0,72, для хлоропластов и цитоплазмы Rf фермента составила 0,80 и 0,66 соответственно.

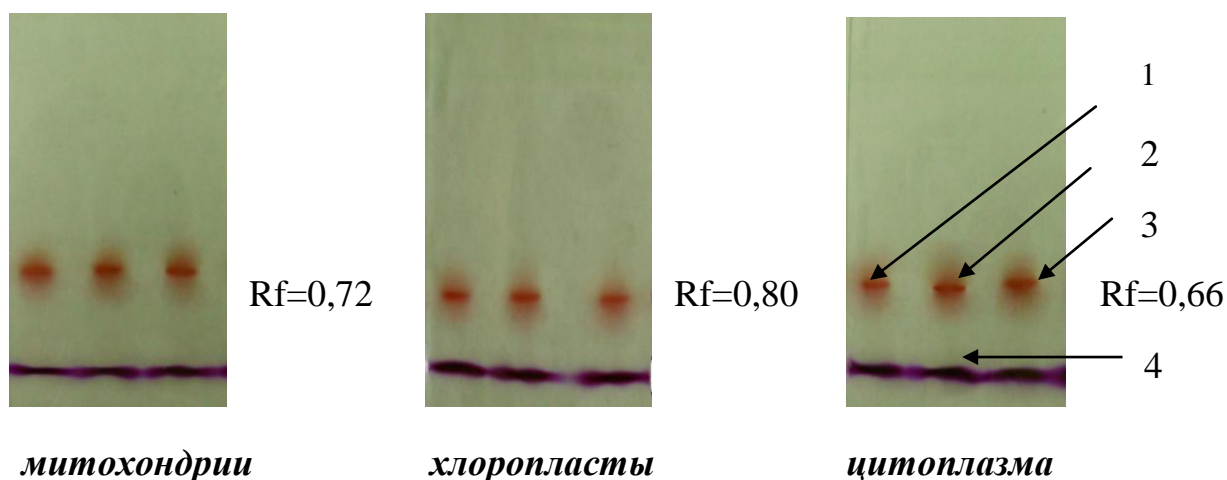


Рис. 6. Специфическое проявление липоксигеназы клеточных компартментов растений гороха, находившихся 3 ч в условиях разных газовых сред (1 – воздух; 2 – гипоксия; 3 – CO₂-среда; 4 – фронт красителя)

Было показано не только присутствие достаточно значительной активности липоксигеназы в митохондриях растений гороха, сои, но и изменение ее активности в условиях гипоксии (рис. 7). В первые часы действия гипоксии активность фермента значительно возросла как у неустойчивых проростков гороха, так и у сои и кукурузы. К концу опыта (24 ч) активность липоксигеназы падала, но только у проростков гороха. Впервые обнаружено, что высокие концентрации CO₂ повышали активность митохондриальной липоксигеназы у всех исследуемых растений.

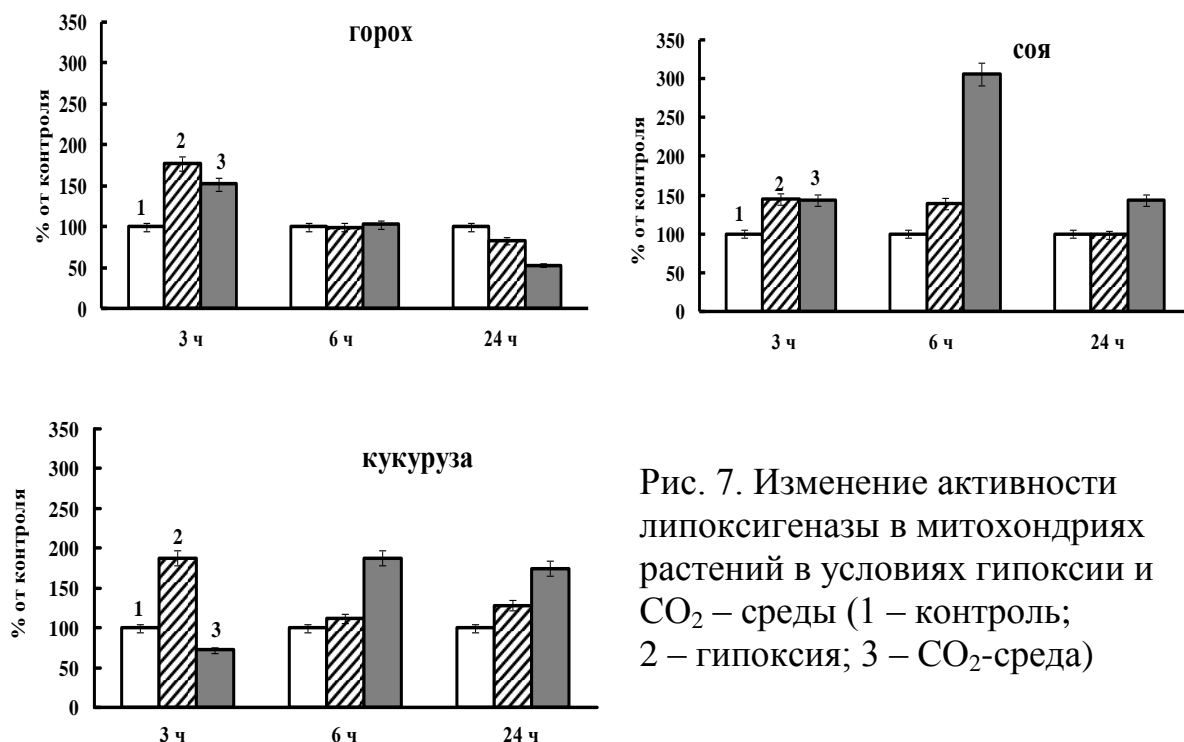


Рис. 7. Изменение активности липоксигеназы в митохондриях растений в условиях гипоксии и CO₂ – среды (1 – контроль; 2 – гипоксия; 3 – CO₂-среда)

Одновременно в клеточных компартментах растений проводили определение активности антиоксидантного фермента СОД в условиях гипоксического стресса (табл. 3).

Таблица 3.

Активность СОД в различных клеточных компартментах растений при 3-х часовом действии гипоксии и СО₂ – среды (удельная активность – мкМоль/ мг белка)

| вариант | митохондрии | хлоропласты | цитоплазма |
|-------------------------|---------------|---------------|---------------|
| горох | | | |
| контроль | 0,171 ± 0,005 | 0,179 ± 0,050 | 0,034 ± 0,004 |
| гипоксия | 0,187 ± 0,040 | 0,160 ± 0,007 | 0,015 ± 0,004 |
| СО ₂ - среда | 0,123 ± 0,020 | 0,072 ± 0,001 | 0,019 ± 0,007 |
| соя | | | |
| контроль | 0,101 ± 0,008 | 0,098 ± 0,006 | 0,170 ± 0,020 |
| гипоксия | 0,308 ± 0,011 | 0,305 ± 0,045 | 0,528 ± 0,065 |
| СО ₂ - среда | 0,307 ± 0,004 | 0,308 ± 0,026 | 0,550 ± 0,070 |
| кукуруза | | | |
| контроль | 0,127 ± 0,004 | 0,240 ± 0,036 | 0,013 ± 0,001 |
| гипоксия | 0,137 ± 0,023 | 0,163 ± 0,007 | 0,016 ± 0,001 |
| СО ₂ - среда | 0,131 ± 0,016 | 0,225 ± 0,002 | 0,018 ± 0,001 |

Анализ активности фермента показал, что у среднеустойчивых проростков сои активность митохондриальной СОД значительно повышалась уже на ранних сроках экспозиции как при гипоксии, так и в СО₂ – среде. Подобные изменения обнаружены и в других клеточных фракциях растений сои. В тоже время у неустойчивых проростков гороха активность СОД во всех клеточных компартментах была низкой. Полученные данные свидетельствуют о том, что фермент СОД может вносить существенный вклад в снижение содержания супероксидного анион-радикала в клеточных компартментах более устойчивых к гипоксии проростков сои и кукурузы, но только в начальные периоды опыта, в отличие от неустойчивых растений гороха.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В условиях дефицита кислорода в растениях происходят значительные изменения метаболических процессов, изменяется скорость процессов пероксидации 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, пероксидный 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 приспособливаться 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 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 (Калашников и др., 1994; Kaveri et al., 2004).

Было показано, что 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 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 (Землянухин и др., 1986; Ершова, 1996-2012) 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 как у неустойчивых растений гороха, так и у более устойчивых растений сои и кукурузы, но только в первые часы действия гипоксии и 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 CO_2 – среды на процессы образования АФК в растениях 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 возросла при гипоксии во всех клеточных компартментах устойчивых проростков сои, а у растений гороха это происходило лишь в митохондриях.
7. Показано, что в условиях 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.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК

1. Ершова А.Н. Продукция активных форм кислорода и антиоксидантные ферменты растений гороха и сои при действии гипоксии и CO₂ – среды / А.Н. Ершова, Н.В. Попова, О.С. Бердникова // Физиология растений. – 2011. – Т. 58, № 6. – С. 834-843.
2. Ершова А.Н. Роль ферментов СОД и липоксигеназы в процессах накопления АФК в клетках растений в условиях кратковременной гипоксии и CO₂ – среды / А.Н. Ершова, О.С. Бердникова // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2013, № 1. – С. 132-136.
3. Ершова А.Н. Влияние кинетина и эпибрассинолида на продукцию АФК в растениях в условиях гипоксии и высоких концентраций CO₂ / А.Н. Ершова, О.С. Бердникова // Вестник ТГУ. Серия: Естественные и технические науки. – 2013. – Т. 18, вып. 6. – С. 3192-3195.

Статьи в сборниках научных трудов, тезисы докладов

4. Ершова А.Н. Образование АФК у растений в условиях гипоксического стресса и высоких концентраций диоксида углерода / А.Н. Ершова, О.С. Бердникова // Материалы международной научной конференции «Проблемы биоэкологии и пути их решения», Саранск, 15-18 мая 2008 г. – Саранск, 2008. – С. 232-233.
5. Ершова А.Н. Влияние высоких концентраций диоксида углерода и гипоксии на образование активных форм кислорода и активность антиоксидантных ферментов *Pisum sativum* (L) / А.Н. Ершова, Н.В. Попова, О.С. Бердникова // Материалы XII Съезда Русского ботанического общества «Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники в начале XXI века», Петрозаводск, 22-27 сентября 2008 г. – Петрозаводск, 2008. – С. 49-52.
6. Ершова А.Н. Генерация активных форм кислорода и процессы перекисидации липидов у растений в условиях гипоксии и высоких концентраций CO₂ / А.Н. Ершова, О.С. Бердникова // Материалы Всероссийской научной конференции «Устойчивость организмов к неблагоприятным факторам внешней среды», Иркутск, 24-28 августа 2009 г. – Иркутск, 2009. – С. 150-153.
7. Бердникова О.С. Влияние гипоксии и CO₂ – среды на активность липоксигеназы в растениях / О.С. Бердникова, А.Н. Ершова // Сборник тезисов 13-й Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XIX века», Пущино, 28 сентября-2 октября 2009 г. – Пущино, 2009. – С. 61-62.

8. Ершова А.Н. Активность липоксигеназы в различных компартментах клеток проростков гороха при действии гипоксии и CO₂ – среды / А.Н. Ершова, О.С. Бердникова // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: межрегиональный сборник научных работ. – Воронеж, 2010. – Вып. 12. – С. 80-83.
9. Бердникова О.С. Содержание АФК в различных компартментах растительных клеток в условиях гипоксического стресса / О.С. Бердникова, А.Н. Ершова // Материалы III Всероссийского с международным участием конгресса студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-Россия 2010», Нижний Новгород, 24-28 мая 2010 г. – Нижний Новгород, 2010. – С. 44-45.
10. Ershova A.N. Lipoxygenase activity and ROS formation in cell compartments under hypoxia and CO₂ – media / A.N. Ershova, O.S. Berdnikova // Abstract Book. FESPB Congress, Valencia, 4-9 July 2010. – Valencia, 2010. – P. 111.
11. Ершова А.Н. Влияние кинетина и эпибрассинолида на содержание различных типов АФК в растениях в условиях гипоксии и CO₂ – среды / А.Н. Ершова, О.С. Бердникова // Тезисы докладов Всероссийского симпозиума «Растение и стресс», Москва, 9-12 ноября 2010 г. – Москва, 2010. – С. 144-145.
12. Бердникова О.С. Влияние гипоксического стресса на содержание пероксида водорода в различных компартментах клеток растений сои / О.С. Бердникова, А.Н. Ершова // Сборник тезисов 15-й Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XIX века», Пущино, 18-22 апреля 2011 г. – Пущино, 2011. – С. 85.
13. Бердникова О.С. Образование активных форм кислорода у растений кукурузы в условиях гипоксического стресса / О.С. Бердникова, А.Н. Ершова // Материалы IV Всероссийского с международным участием конгресса студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-Россия 2011», Воронеж, 23-27 мая 2011 г. – Воронеж, 2011. – Т II. – С. 108-110.
14. Ершова А.Н. Влияние гипоксии и CO₂ – среды на активность липоксигеназы в различных клеточных компартментах проростков сои / А.Н. Ершова, О.С. Бердникова // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: межрегиональный сборник научных работ. – Воронеж, 2011. – Вып. 13. – С. 66-69.
15. Ершова А.Н. Генерация активных форм кислорода у растений в условиях гипоксического стресса: скорость и механизмы образования, роль диоксида углерода / А.Н. Ершова, О.С. Бердникова // Материалы VII Съезда ОФР России, Нижний Новгород, 4-10 июля 2011 г. – Нижний Новгород, 2011. – Часть I. – С. 245-246.
16. Бердникова О.С. Влияние разных газовых сред на продукцию АФК в проростках кукурузы в присутствии фитогормонов / О.С. Бердникова, А.Н. Ершова, Е.С. Семендяева // Сборник тезисов 16-й Международной

- Пушинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XIX века», Пущино, 16-21 апреля 2012 г. – Пущино, 2012. – С. 168.
17. Ершова А.Н. Активность СОД и интенсивность свободнорадикального окисления в растениях в условиях дефицита кислорода / А.Н. Ершова, О.С. Бердникова, Е.С. Семендяева // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: межрегиональный сборник научных работ. – Воронеж, 2012. – Вып. 14. – С. 68-71.
 18. Ershova A.N. Role of superoxide dismutase in controlling of ROS rate of formation in plants under short-term hypoxia and CO₂ – media / A.N. Ershova, O.S. Berdnikova // Abstract Book. FESPB/EPSO, Freiburg, 29 July-3 August 2012. – Freiburg, 2012. – P. 322.
 19. Ершова А.Н. Активность СОД и накопление АФК в клеточных компартментах растений в условиях гипоксии и CO₂-среды / А.Н. Ершова, О.С. Бердникова, О.С. Попова // Материалы Всероссийской (с международным участием) научной конференции «Актуальные проблемы экологии и физиологии живых организмов», Саранск, 15-17 мая 2013 г. – Саранск, 2013. – С. 63-66.
 20. Ершова А.Н. Роль СОД и липоксигеназы в регуляции содержания АФК в митохондриях клеток растений при дефиците кислорода / А.Н. Ершова, О.С. Бердникова // Материалы Всероссийской научной конференции «Факторы устойчивости растений в экстремальных природных условиях и техногенной среде», Иркутск, 10-13 июня 2013 г. – Иркутск, 2013. – С. 71-74.
 21. Бердникова О.С. Активность липоксигеназы в отдельных компартментах клеток проростков кукурузы в условиях различных газовых сред / О.С. Бердникова, А.Н. Ершова // Сборник тезисов 17-й Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XIX века», Пущино, 22-26 апреля 2013 г. – Пущино, 2013. – С. 259-260.
 22. Ershova A. Impact of hypoxia and CO₂ – media on free-radical in cell compartments of pea and soy plants / A. Ershova, O. Berdnikova // Abstract Book. FESPB/EPSO, Dublin, 22-26 June 2014. – Dublin, 2014. – P. 59.
 23. Ершова А.Н. Активность супероксиддисмутазы клеточных компартментов растений в условиях гипоксии и CO₂ – среды / А.Н. Ершова, О.С. Бердникова // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: межрегиональный сборник научных работ. – Воронеж, 2015. – Вып. 17. – С. 73-76.
 24. Бердникова О.С. Влияние кинетина и эпибрассинолида на процессы свободнорадикального окисления растений в условиях разных газовых сред (гипоксия, CO₂ – среда) / О.С. Бердникова, А.Н. Ершова // Материалы VIII Съезда ОФР России, Петрозаводск, 21-26 сентября 2015 г. – Петрозаводск, 2015. – С. 67.