

**ВЛИЯНИЕ НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ
ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ И АКТИВНОСТЬ
АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ У ПШЕНИЦЫ
ПРИ ОПТИМАЛЬНОМ И ИЗБЫТОЧНОМ СОДЕРЖАНИИ
ЦИНКА В КОРНЕОБИТАЕМОЙ СРЕДЕ**

© 2021 г. Ю. В. Батова*, @, Н. М. Казнина*, А. Ф. Титов*

*Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук, Федеральный исследовательский центр “Карельский научный центр РАН”, ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, 185910 Россия

@E-mail: batova@krc.karelia.ru

Поступила в редакцию 09.07.2019 г.

После доработки 05.11.2019 г.

Принята к публикации 14.11.2019 г.

В условиях лабораторного опыта изучено влияние низкой положительной температуры (4°C) на интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активность супероксиддисмутазы и пероксидазы в корнях и листьях растений озимой пшеницы *Triticum aestivum* L. при оптимальной (2 мкМ) и высокой (1000 мкМ) концентрациях Zn в корнеобитаемой среде. Установлено, что в оптимальных условиях минерального питания действие температуры 4°C не вызывает у пшеницы усиления окислительных процессов в листьях, а в корнях оно носит временный характер, что свидетельствует об успешной адаптации растений к холоду. Отмечено, что при избытке Zn в среде действие низкой температуры вызывает интенсификацию ПОЛ в клетках корня и листа, что в определенной степени обусловлено относительно низкой активностью указанных антиоксидантных ферментов и нарушением согласованности в их работе. Обнаруженное снижение способности растений поддерживать окислительно-восстановительный баланс клеток при одновременном действии изученных стресс-факторов ведет к развитию окислительного стресса, усилению ингибирования роста и, как следствие, негативно сказывается на жизнеспособности растений.

DOI: 10.31857/S0002332921010033

Способность растений адаптироваться к неблагоприятным условиям окружающей среды связана с наличием целого комплекса защитных механизмов, которые, по-видимому, в основном неспецифические, и активизируются в ответ на действие разных стресс-факторов (Титов и др., 1983, 2006; Beck *et al.*, 2007). К ним, в частности, относится система антиоксидантной защиты, обеспечивающая контроль за содержанием в клетках активных форм кислорода (АФК) (Кузнецов, 2009). Результаты многочисленных исследований свидетельствуют о том, что в условиях стресса в клетках нарушается баланс между образованием и нейтрализацией АФК, существующий в норме, в пользу первого процесса. Это приводит к увеличению содержания АФК и повреждению под их воздействием биомолекул и клеточных структур. Активизация компонентов антиоксидантной системы (АОС) (ферментов и неферментативных соединений), наблюдаемая при этом в качестве ответной реакции растений, направлена на вос-

становление указанного баланса (Apel, Hirt, 2004; Gill, Tuteja, 2010; Креславский и др., 2012).

К настоящему времени накоплено достаточно много экспериментальных данных, свидетельствующих о важной роли АОС в устойчивости и адаптации растений к действию различных стресс-факторов (Dat *et al.*, 2000; Mittler, 2002; Gill, Tuteja, 2010; Das, Roychoudhury, 2014; Колупаев, 2016; Czarnocka, Karpiński, 2018). Однако в большинстве случаев эти исследования связаны с изучением действия на растения какого-то одного стрессора, хотя известно, что ответная реакция растений на действие отдельного стресс-фактора может заметно меняться, причем не только количественно, но и качественно, в зависимости от сочетания с другими факторами внешней среды (Mittler, 2006; Sewelam *et al.*, 2014). Например, высокое и низкое значения температуры могут усиливать негативное влияние на растения света высокой интенсивности (Hüner *et al.*, 1993; Ivanov *et al.*, 2012; Mittal *et al.*, 2012) и засухи (Rizhsky *et al.*, 2002, 2004; Koussevitzky *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2010). В услови-

ях засоления устойчивость растений к высоким и низким значениям температуры, наоборот, возрастает (Rivero *et al.*, 2014; Chakraborty, Bhattacharjee, 2015; Matuszak-Slamani, Brzostowicz, 2015). Показано также, что высокая температура смягчает негативный эффект избытка Cd, тогда как низкая температура усиливает его (Chen, Kao, 1995). Одна из возможных причин выявленных эффектов – изменения в работе АОС, в том числе антиоксидантных ферментов. Например, активность ферментов, участвующих в нейтрализации АФК (супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, аскорбатпероксидаза и гваяколзависимая пероксидаза (ПО)), при действии на растения пшеницы низкой температуры изменяется по-разному в зависимости от условий минерального питания (Полесская и др., 2004).

Ранее нами было показано, что при действии низкой положительной температуры (4°C) на проростки озимой пшеницы, испытывающие одновременно с этим воздействие высокой концентрации ионов Zn, происходит более выраженное торможение роста побега и снижение скорости фотосинтеза по сравнению с проростками, находящимися в оптимальных условиях минерального питания (Казнина и др., 2019). Исходя из анализа опубликованных данных, можно предположить, что эти изменения, хотя бы частично, могут быть связаны с развитием в клетках окислительного стресса.

Цель работы – изучение влияния низкой положительной температуры на интенсивность окислительных процессов и активность двух ключевых антиоксидантных ферментов СОД и ПО в корнях и листьях растений озимой пшеницы, растущих при оптимальной или высокой концентрации Zn в корнеобитаемой среде.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растения озимой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Московская 39 выращивали в камере искусственного климата при 22°C, относительной влажности воздуха 60–70%, фотосинтетически активной радиации (ФАР) 100 мкмоль/(м² с), 14-часовом фотопериоде на питательном растворе Хогланда–Арнона с оптимальным (вариант 22°C и 2 мкМ Zn) или высоким (вариант 22°C и 1000 мкМ Zn) содержанием Zn. Спустя 7 сут (исходная точка) одну часть растений обоих вариантов перенесли в климатическую камеру с температурой 4°C (варианты 4°C и 2 мкМ Zn; 4°C и 1000 мкМ Zn), а другая их часть оставалась в прежних условиях. Значения и концентрации Zn 1000 мкМ и температуры 4°C, выбранные на основе предварительных опытов, находятся в пределах субповреждающих для данного сорта пшеницы. В исходной точке, а также через 1, 3 и 7 сут у растений всех вариантов измеряли показатели, характеризующие их рост

(длина корня, высота побега, сырая и сухая биомасса подземных и надземных органов), интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ), активность СОД и ПО, а также содержание Zn в органах растений.

Интенсивность ПОЛ оценивали по содержанию малонового диальдегида (МДА), которое определяли с использованием реакционной среды, содержащей 0.25%-ный раствор тиобарбитуровой кислоты в 10%-ной трихлоруксусной кислоте (Neath, Packer, 1968). Растительный материал гомогенизировали в реакционной среде. Гомогенат выдерживали на водяной бане при 95°C в течение 30 мин, быстро охлаждали и центрифугировали 10 мин при 10000 g. Оптическую плотность супернатанта измеряли с использованием спектрофотометра СФ-2000 (Спектр, Россия) при 532 и 600 нм. Для расчета содержания МДА (мкмоль/г сырой массы) использовали коэффициент экстинкции (ϵ), равный 155 мМ⁻¹ см⁻¹.

Для определения активности СОД (КФ 1.15.1.1) и ПО (КФ 1.11.1.7) листья гомогенизировали в 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.8). Гомогенат центрифугировали при 15000 g в течение 20 мин при 4°C, полученный супернатант использовали для определения содержания белка и активности ферментов спектрофотометрическим методом. Активность СОД определяли по способности ингибировать фотохимическое восстановление нитросинего тетразолия (Beauchamp, Fridovich, 1971). Оптическую плотность раствора измеряли при 560 нм. За единицу активности принимали количество фермента, вызывающее 50%-ное ингибирование реакции. Активность ПО определяли с помощью гваякола в качестве субстрата ($\epsilon = 26.6$ мМ⁻¹ см⁻¹). Динамику изменения оптической плотности раствора регистрировали при длине волны 470 нм (Maehly, Chance, 1954). Активность ферментов рассчитывали на 1 мг белка. Общее содержание белка определяли методом Брэдфорд с помощью бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта (Bradford, 1976). Содержание Zn в корнях и побегах измеряли на атомно-абсорбционном спектрофотометре AA-7000 (Shimadzu, Япония).

Все ростовые показатели изучали на выборке, представленной в каждом варианте опыта 12 растениями. Биологическая повторность при изучении биохимических показателей была 2–3-кратная, аналитическая – 3–4-кратная. Весь опыт повторяли дважды. В таблицах представлены средние значения по двум независимым опытам и их стандартные ошибки. О достоверности различий судили по критерию Стьюдента при $P < 0.05$.

Исследования были выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования ФИЦ “Карельский научный центр РАН”.

Таблица 1. Влияние температуры на содержание Zn (г/кг сухой массы) в корнях и побегах пшеницы при его оптимальном (2 мкМ) и высоком (1000 мкМ) содержании в корнеобитаемой среде

Вариант		Исходное содержание	Экспозиция, сут		
T, °C	Zn, мкМ		1	3	7
Корни					
22	2	0.13 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.26 ± 0.04*	0.38 ± 0.06*
22	1000	6.68 ± 1.07	6.54 ± 1.05	12.00 ± 1.92*	13.00 ± 2.01*
4	2	0.13 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.15 ± 0.04
4	1000	6.68 ± 1.07	5.46 ± 0.87	5.22 ± 0.83	7.53 ± 1.20
Побеги					
22	2	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.001	0.04 ± 0.01
22	1000	1.27 ± 0.20	1.26 ± 0.20	1.38 ± 0.22	2.27 ± 0.36
4	2	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00
4	1000	1.27 ± 0.20	0.94 ± 0.15	1.12 ± 0.18	1.19 ± 0.19

Примечание. * – отличия от исходного содержания достоверны при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ содержания Zn в органах растений показал, что спустя 7 сут экспозиции на растворе с высокой концентрацией металла (исходная точка) его содержание в корнях и листьях пшеницы было соответственно в 50 и 40 раз выше, чем у растений, находящихся при его оптимальной концентрации (табл. 1). В дальнейшем при 22°C содержание металла в органах растений продолжало возрастать, а при 4°C практически не менялось.

Воздействие высокой концентрации Zn ингибировало рост проростков пшеницы. Так, через 7 сут (исходная точка) длина корней и высота побегов были соответственно на 33 и 23% меньше, чем при оптимальном содержании Zn в корнеобитаемой среде (табл. 2). Помимо этого наблюдалось снижение накопления сырой и сухой биомасс корней, а также сырой биомассы побегов (на 17, 19 и 14% соответственно). В дальнейшем при 22°C в условиях избытка Zn рост проростков продолжался, хотя ингибирующее влияние высокой концентрации металла сохранялось.

Действие температуры 4°C вызывало остановку роста проростков как при оптимальном, так и при высоком содержании Zn в среде. При этом рост корней в условиях действия холода отсутствовал, а при высокой концентрации Zn в корнеобитаемой среде к концу опыта наблюдалось даже некоторое снижение их сырой биомассы. Рост побега в высоту также существенно тормозился. Однако накопление биомассы побегов в оптимальных условиях минерального питания спустя 3 сут возобновлялось. В условиях избытка Zn увеличения сырой биомассы побегов не было, а прирост сухой биомассы спустя 7 сут оказался значительно меньше, чем при оптимальном содержании Zn в среде.

Избыток Zn в клетках, как известно, может вызвать окислительный стресс, связанный с увеличением в них количества АФК (Рахманкулова и др., 2008; Wang *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2013; Blasko *et al.*, 2015). Нами было обнаружено, что после 7 сут экспозиции на растворе с высокой концентрацией Zn (исходная точка) содержание МДА, являющегося конечным продуктом ПОЛ, в корнях и листьях пшеницы было соответственно в 1.2 и 1.3 раза выше, чем у растений в оптимальных условиях минерального питания (табл. 3). В дальнейшем в варианте опыта 22°C и 1000 мкМ Zn интенсивность ПОЛ в корнях снижалась практически до контрольного значения, а в листьях продолжала увеличиваться и к концу опыта превышала исходную в 1.5 раза.

При воздействии на растения температуры 4°C в корнях в течение первых 3 сут количество МДА повышалось, причем независимо от содержания Zn во внешней среде (табл. 3). Однако к 7-м сут в варианте с концентрацией Zn 2 мкМ интенсивность ПОЛ несколько снижалась, тогда как в варианте с концентрацией 1000 мкМ она продолжала увеличиваться. В листьях при 4°C содержание МДА возрастало только при избытке Zn в корнеобитаемой среде (табл. 3).

Изучение активности антиоксидантных ферментов показало, что у растений, находящихся в течение 7 сут в условиях избытка Zn (исходная точка), активность СОД в корнях и листьях была практически такой же, как у проростков, находящихся при оптимальной концентрации металла, активность же ПО в корнях была в 2 раза выше (табл. 3). На протяжении следующих 7 сут при 22°C активность обоих ферментов увеличивалась, и к концу опыта активность СОД в корнях и листьях превышала исходную в 3 и 1.7, а активность ПО – в 3.5 и 7 раз соответственно.

Таблица 2. Влияние температуры на рост пшеницы при оптимальном (2 мкМ) и высоком (1000 мкМ) содержании Zn в корнеобитаемой среде

Вариант		Значение показателя в исходной точке	Экспозиция, сут		
T, °C	Zn, мкМ		1	3	7
Длина корня, см					
22	2	11.14 ± 0.40	11.58 ± 0.25	13.11 ± 0.40*	15.57 ± 0.51*
22	1000	7.51 ± 0.14	7.27 ± 0.27	8.86 ± 0.21*	9.15 ± 0.20*
4	2	11.14 ± 0.40	10.33 ± 0.45	11.10 ± 0.22	11.20 ± 0.29
4	1000	7.51 ± 0.14	7.75 ± 0.22	7.63 ± 0.15	7.47 ± 0.26
Сырая биомасса корня, мг					
22	2	48.06 ± 2.77	48.57 ± 1.84	51.27 ± 3.07	67.12 ± 2.85*
22	1000	39.91 ± 1.95	38.70 ± 2.00	44.50 ± 2.55	51.23 ± 2.33*
4	2	48.06 ± 2.40	47.26 ± 2.22	46.57 ± 1.40	49.55 ± 1.98
4	1000	39.91 ± 1.95	40.58 ± 2.17	37.89 ± 2.48	31.00 ± 2.31*
Сухая биомасса корня, мг					
22	2	5.43 ± 0.38	4.79 ± 0.76	5.08 ± 0.26	6.80 ± 0.14*
22	1000	4.43 ± 0.11	4.10 ± 0.14	4.51 ± 0.25	5.06 ± 0.14*
4	2	5.43 ± 0.28	4.71 ± 0.27	4.62 ± 0.16	6.46 ± 0.16*
4	1000	4.43 ± 0.11	4.45 ± 0.31	4.69 ± 0.26	3.90 ± 0.20
Высота побега, см					
22	2	17.60 ± 0.29	18.17 ± 0.37	22.15 ± 0.47*	31.85 ± 0.58*
22	1000	13.62 ± 0.40	13.95 ± 0.46	17.23 ± 0.34*	22.90 ± 0.56*
4	2	17.60 ± 0.29	16.48 ± 0.73	18.39 ± 0.41	18.38 ± 0.44
4	1000	13.62 ± 0.40	13.74 ± 0.52	14.84 ± 0.42	15.35 ± 0.51
Сырая биомасса побега, мг					
22	2	140.41 ± 4.23	160.10 ± 5.85*	217.73 ± 6.92*	326.52 ± 13.96*
22	1000	120.45 ± 5.04	119.57 ± 4.64	166.40 ± 6.00*	217.86 ± 8.99*
4	2	140.41 ± 4.23	134.44 ± 5.23	159.85 ± 2.51*	167.78 ± 4.95*
4	1000	120.45 ± 5.04	114.44 ± 5.48	130.61 ± 2.87	133.09 ± 4.05
Сухая биомасса побега, мг					
22	2	12.78 ± 0.84	14.67 ± 0.54	18.99 ± 0.74*	30.36 ± 1.05*
22	1000	12.22 ± 0.44	12.38 ± 0.47	17.33 ± 0.83*	27.02 ± 1.27*
4	2	12.78 ± 0.84	12.24 ± 0.59	15.69 ± 0.50*	19.74 ± 1.63*
4	1000	12.22 ± 0.44	11.08 ± 0.71	14.77 ± 0.42*	16.89 ± 0.54*

Примечание. * – здесь и в табл. 3 отличия от исходных значений достоверны при $P < 0.05$.

При 4°C активность ферментов в целом была заметно ниже, чем при 22°C. При этом в корнях у проростков, находившихся в оптимальных условиях минерального питания, наблюдались разнонаправленные ее изменения. Так, активность СОД начиная с 1-х сут воздействия снижалась (по сравнению с исходной) и оставалась пониженной до конца опыта, тогда как активность ПО увеличивалась, достигая максимальных значений через 7 сут действия низкой температуры (табл. 3). В листьях активность СОД первоначально (1–3 сут) также снижалась, а активность ПО не менялась, но спустя 7 сут в листьях было зафиксировано по-

вышение активности обоих ферментов. При этом активность СОД увеличивалась в 1.3, а активность ПО – более чем в 3 раза.

В случае когда температура 4°C действовала на проростки, находившиеся в условиях избытка Zn, в корнях спустя 1 сут произошло резкое снижение (по сравнению с исходным) активности ПО при сохранении неизменной активности СОД. Однако в дальнейшем активность обоих ферментов возрастала и в корнях, и в листьях, достигая максимальных значений через 7 сут. При этом в течение всего периода действия низкой темпера-

Таблица 3. Влияние температуры на содержание МДА и активность антиоксидантных ферментов в органах пшеницы при оптимальном (2 мкМ) и высоком (1000 мкМ) содержании Zn в корнеобитаемой среде

Вариант		Значение показателя в исходной точке	Экспозиция, сут		
T, °C	Zn, мкМ		1	3	7
Содержание МДА, мкмоль/г сырой массы					
Корни					
22	2	1.24 ± 0.04	1.28 ± 0.05	1.23 ± 0.04	1.44 ± 0.07
22	1000	1.50 ± 0.04	1.64 ± 0.02*	1.40 ± 0.06	1.31 ± 0.09
4	2	1.24 ± 0.04	1.39 ± 0.09	2.11 ± 0.09*	1.89 ± 0.07*
4	1000	1.50 ± 0.04	1.75 ± 0.11*	1.99 ± 0.08*	2.40 ± 0.05*
Листья					
22	2	5.67 ± 0.16	4.40 ± 0.36*	4.55 ± 0.24*	3.97 ± 0.18*
22	1000	7.17 ± 0.08	6.61 ± 0.15*	7.07 ± 0.11	10.58 ± 0.45*
4	2	5.67 ± 0.16	5.43 ± 0.06	5.79 ± 0.23	5.89 ± 0.40
4	1000	7.17 ± 0.08	6.60 ± 0.09*	7.90 ± 0.12*	9.34 ± 0.11*
Активность СОД, усл. ед. активности/мг белка					
Корни					
22	2	4.51 ± 0.19	6.10 ± 0.21*	7.07 ± 0.31*	5.94 ± 0.11*
22	1000	4.51 ± 0.09	7.44 ± 0.27*	8.32 ± 0.16*	14.00 ± 0.53*
4	2	4.51 ± 0.19	3.78 ± 0.15*	3.56 ± 0.13*	3.68 ± 0.20*
4	1000	4.51 ± 0.09	4.31 ± 0.34	4.22 ± 0.09	5.59 ± 0.14*
Листья					
22	2	2.57 ± 0.13	2.19 ± 0.08	3.53 ± 0.21*	4.01 ± 0.25*
22	1000	2.54 ± 0.06	2.91 ± 0.05*	3.48 ± 0.26*	4.19 ± 0.08*
4	2	2.57 ± 0.13	2.26 ± 0.15	1.81 ± 0.14*	3.21 ± 0.13*
4	1000	2.54 ± 0.06	2.51 ± 0.19	2.58 ± 0.08	3.36 ± 0.16*
Активность ПО, мкмоль гваякола/(мг белка · мин)					
Корни					
22	2	12.22 ± 0.37	22.77 ± 1.57*	25.09 ± 0.75*	31.73 ± 0.92*
22	1000	22.90 ± 0.22	32.89 ± 1.10*	50.05 ± 2.10*	80.69 ± 5.07*
4	2	12.22 ± 0.37	10.44 ± 1.48	17.66 ± 0.72*	21.04 ± 1.62*
4	1000	22.90 ± 0.22	11.98 ± 0.38*	21.57 ± 1.10	27.96 ± 0.77*
Листья					
22	2	0.82 ± 0.04	1.04 ± 0.09	2.35 ± 0.19*	4.23 ± 0.06*
22	1000	0.80 ± 0.07	2.11 ± 0.09*	5.66 ± 0.30*	5.65 ± 0.45*
4	2	0.82 ± 0.04	0.80 ± 0.03	0.94 ± 0.13	2.70 ± 0.17*
4	1000	0.80 ± 0.07	1.09 ± 0.09	1.51 ± 0.15*	2.82 ± 0.11*

туры активность СОД и ПО в органах проростков, находившихся в условиях избытка Zn, была несколько выше, чем у растущих при нормальной концентрации металла.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ответная реакция растений пшеницы на действие низкой температуры существенно изменялась в зависимости от концентрации Zn в корнеобитаемой среде. При этом наблюдаемые изменения интенсивности окислительных процессов и активности ключевых антиоксидантных ферментов в подземных и надземных органах проростков также различались.

Как известно, при избытке Zn во внешней среде у растений, не являющихся аккумуляторами (накопителями) тяжелых металлов, ионы металла в основном задерживаются в корнях (Титов и др., 2007). Вследствие этого их содержание в клетках корня сильно увеличивается, что в свою очередь приводит к развитию окислительного стресса (Ли и др., 2008; Wang *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2013; Cuypers *et al.*, 2016). Однако благодаря функционирующей эффективных механизмов детоксикации металла, а также наличию общих механизмов устойчивости, в частности активизации компонентов АОС, растения были способны достаточно успешно адаптироваться к высоким концентрациям Zn (Broadley *et al.*, 2007; Титов и др., 2014; Ricachen-evsky *et al.*, 2015). В наших опытах у проростков

пшеницы в условиях избытка Zn в корнях первоначально наблюдалось заметное повышение содержания МДА, свидетельствующее об усилении интенсивности ПОЛ и развитии окислительного стресса. Но в дальнейшем при 22°C в клетках корня значительно увеличивалась активность СОД — ключевого фермента антиоксидантной защиты, который нейтрализует супероксид-радикал, преобразуя его в менее агрессивную АФК — перекись водорода, а также активность ПО, участвующей в разложении перекиси. Согласованная работа СОД и ПО, очевидно, способствовала восстановлению про- и антиоксидантного равновесия, о чем свидетельствует снижение интенсивности ПОЛ к концу опыта практически до ее уровня у контрольных растений. Отметим и то, что активизация ПО вносит свой вклад в ускорение процесса лигнификации клеточных стенок, что является одним из защитных механизмов, позволяющих растениям снизить поступление тяжелых металлов в клетки (Lux *et al.*, 2011). Об отсутствии серьезных повреждений корневой системы свидетельствует и то, что в таких условиях рост и накопление биомассы корней продолжались, хотя и несколько медленнее, чем при нормальной концентрации Zn в среде.

Сведений о реакции корневой системы растений на низкотемпературное воздействие в литературе сравнительно немного. Тем не менее известно, что, например, у растений пшеницы (Rogozin *et al.*, 2001) и табака (Попов и др., 2010) низкая закаливающая температура вызывает увеличение содержания МДА в клетках корня, т.е. усиление интенсивности ПОЛ. Предполагается, что это может быть связано с нарушением транспорта электронов в реакциях, протекающих на мембранах митохондрий, активизацией окислительных реакций в пероксисомах, ингибированием ферментов, участвующих в нейтрализации радикалов кислорода (del Rio *et al.*, 2002; Mittler, 2002; John *et al.*, 2016). В наших опытах в начальный период (1–3 сут) действия температуры 4°C содержание МДА в корнях пшеницы также увеличивалось, причем независимо от содержания Zn в корнеобитаемой среде. Однако спустя 7 сут в варианте опыта с оптимальным содержанием Zn количество продуктов ПОЛ снижалось, свидетельствуя об ослаблении окислительного стресса, тогда как в условиях избытка Zn оно продолжало возрастать.

Как следует из полученных нами данных, в корнях проростков, находящихся при оптимальной концентрации Zn во внешней среде, усиление интенсивности ПОЛ при низкой температуре происходит на фоне снижения активности СОД. Сходные данные были получены и другими авторами на растениях сои (Poznyk *et al.*, 2005) и пшеницы (Scabba *et al.*, 1998). Снижение активности СОД в таких условиях могло быть следствием ингибирующего действия низкой температуры или

связано с уменьшением содержания в клетках ее субстрата — супероксид-радикала, например, из-за замедления процесса дыхания (Гармаш, Головкин, 2009). Некоторое же уменьшение содержания МДА, наблюдаемое через 7 сут действия холода, возможно, объясняется активизацией ПО, что ранее отмечали и другие авторы (Rogozin *et al.*, 2001). О частичном восстановлении уровня метаболических процессов, нарушенного действием низкой температуры, свидетельствует и зафиксированное в этот период увеличение сухой биомассы корней.

При воздействии низкой температуры на растения, находящиеся в условиях избытка Zn в корнях, через 1 сут наблюдалось резкое снижение активности ПО. Возможно, это связано с высокой чувствительностью к холоду изоформ фермента, активизировавшихся под влиянием избытка Zn. Активность СОД при этом не менялась. Разнонаправленные изменения активности этих ферментов могли стать причиной накопления в клетках избыточных количеств перекиси водорода и усиления интенсивности ПОЛ. В дальнейшем (спустя 7 сут), несмотря на то что активность СОД и ПО в этом варианте опыта несколько увеличивалась, интенсивность окислительных процессов в клетках продолжала возрастать. По-видимому, относительно небольшое увеличение активности СОД и ПО (в 1.2 раза по отношению к исходной), наблюдаемое при одновременном действии избытка Zn и низкой температуры, было недостаточным для предотвращения развития окислительного стресса. Дополнительный негативный эффект в таких условиях могло вызывать нарушение баланса и других компонентов АОС, в частности основных низкомолекулярных антиоксидантов — аскорбата и глутатиона, как показано, например, в опытах с растениями *Arabidopsis thaliana* (Remans *et al.*, 2012). Важно, что в наших опытах в таких условиях у растений пшеницы полностью прекращался рост корневой системы и даже наблюдалось некоторое уменьшение ее биомассы по сравнению с исходной, что может быть связано с частичным отмиранием клеток корня. Все это свидетельствует о том, что совместное действие изученных стресс-факторов оказывает более сильное отрицательное влияние на корневую систему растений пшеницы по сравнению с их отдельным действием.

В листьях, как правило, накапливается значительно меньше ионов металла, чем в корнях, однако при высоких концентрациях Zn в корнеобитаемой среде в клетках листа также усиливается процесс образования радикалов кислорода. В наших опытах при избытке Zn в корнеобитаемой среде его содержание в листьях было примерно в 2 раза ниже, чем в корнях. При этом на протяжении всего опыта в клетках листа наблюдалось увеличение содержания МДА, несмотря на повыше-

ние активности СОД и ПО. Обнаруженная интенсификация ПОЛ могла быть связана со снижением пула низкомолекулярных антиоксидантов, в частности каротиноидов и восстановленного глутатиона, который, как известно, расходуется на образование комплексов с ионами металла и синтез фитохелатинов (Barrameda-Medina *et al.*, 2014). Нельзя также исключать, что увеличение содержания продуктов ПОЛ в таких условиях могло быть следствием активизации липоксигеназы – фермента, катализирующего ПОЛ, в условиях стресса, вызванного действием тяжелых металлов (Remans *et al.*, 2012; Liptáková *et al.*, 2013; Barrameda-Medina *et al.*, 2014).

Действие низкой положительной температуры независимо от содержания Zn в среде первоначально вызывало у растений торможение роста побегов, что было связано с происходящими структурно-функциональными изменениями, необходимыми для повышения холодоустойчивости растений (Титов и др., 2006). Однако в оптимальных условиях минерального питания уже через 3 сут действия температуры 4°C накопление биомассы побегов возобновлялось, свидетельствуя об успешной адаптации растений. При избытке же Zn ингибирующий эффект низкой температуры на показатели роста сохранялся до конца опыта.

Известно, что, подобно другим стрессорам, низкие температуры могут вызывать в клетках листа растений окислительный стресс. Вместе с тем было показано, что холодостойкие виды способны препятствовать повышению интенсивности ПОЛ при охлаждении (Синькевич и др., 2011, 2015; Колупаев и др., 2015). Это подтверждают и наши опыты. При воздействии температуры 4°C на растения пшеницы, находившиеся в условиях сбалансированного минерального питания, содержание МДА в листьях не менялось. При этом первоначально в клетках не наблюдалось увеличения активности СОД и ПО и только спустя 7 сут была отмечена их активизация. По-видимому, на начальных этапах холодовой адаптации окислительно-восстановительный баланс в клетках листа поддерживается за счет низкомолекулярных соединений, обладающих антиоксидантными свойствами, таких как аскорбиновая кислота, восстановленный глутатион. Значительное увеличение содержания в клетках аскорбиновой кислоты и глутатиона при действии низкой температуры наблюдали у пшеницы и ячменя (Радюк и др., 2009; Dai *et al.*, 2009; Репкина и др., 2014). Так, у ячменя уже в 1-е сут действия температуры 2°C содержание аскорбиновой кислоты и глутатиона в листьях увеличивалось в 3 и 1.3 раза соответственно (Радюк и др., 2009). У пшеницы в ответ на низкотемпературное воздействие значительно увеличивается содержание в клетках листа сахаров и пролина, которые также выполняют антиоксидантные функции (Климов и др., 2010; Keunen *et al.*,

2013; John *et al.*, 2016). Активизация же СОД и ПО при длительном (7 сут) воздействии холода, возможно, связана с необходимостью превентивной защиты клеток от окислительных повреждений в случае дальнейшего снижения температуры.

При низкой температуре в листьях растений, испытывающих действие избытка Zn, интенсивность ПОЛ увеличивалась, указывая на активизацию окислительных процессов. В это же время, как было обнаружено нами ранее, в таких условиях у пшеницы резко тормозилась скорость фотосинтеза (Казнина и др., 2019). Однако активность СОД и ПО в условиях избытка Zn при низкой температуре была примерно такой же, как при оптимальном уровне Zn или даже несколько превышала ее. Следовательно, присутствие в клетках большого количества ионов металла не оказывало негативного влияния на динамику СОД и ПО в условиях гипотермии. Повышение же содержания МДА в условиях избытка Zn при 4°C, возможно, объясняется снижением активности других ферментов, участвующих в антиоксидантной защите, таких как каталаза и аскорбатпероксидаза (Panda *et al.*, 2003; Рахманкулова и др., 2008; Wang *et al.*, 2009), или уменьшением содержания восстановленного глутатиона и аскорбата вследствие ингибирования ферментов, участвующих в их восстановлении, что наблюдали при избытке Zn (Di Vaccio *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2009; Remans *et al.*, 2012).

В целом проведенные исследования показали, что при оптимальном содержании Zn в корнеобитаемой среде действие низкой положительной температуры не вызывает усиления окислительных процессов в листьях пшеницы, а в корнях повышение интенсивности ПОЛ носит временный (транзиторный) характер. Увеличение же активности СОД и ПО в корнях и листьях, наблюдаемое через 7 сут низкотемпературного воздействия, свидетельствует об активизации антиоксидантной защиты, что необходимо для успешной адаптации растений к холоду. В отличие от этого относительно низкая активность антиоксидантных ферментов и нарушение согласованности в их работе, наблюдаемые при низкой температуре в условиях избытка Zn, а также возможное снижение в таких условиях количества неферментативных компонентов антиоксидантной системы не позволяют предотвратить развитие окислительного стресса, что неизбежно ведет к снижению способности растений к низкотемпературной адаптации.

Работа выполнена при финансовом обеспечении из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН № 0221-2017-0051 и № 0218-2019-0074.

СПИСОК ЛИТРАТУРЫ

- Гармаш Е.В., Головки Т.К. Влияние кадмия на рост и дыхание ячменя при двух температурных режимах выращивания // Физиология растений. 2009. Т. 56. С. 382–387.
- Казнина Н.М., Батова Ю.В., Лайдинен Г.Ф., Шерудило Е.Г., Титов А.Ф. Способность проростков озимой пшеницы к низкотемпературной адаптации в условиях избыточного содержания цинка в корнеобитаемой среде // Физиология растений. 2019. Т. 66. № 5. С. 375–383.
- Климов С.В., Бураханова Е.А., Алиева Г.П., Суворова Т.А. Способность растений закаливаться к морозу связана с особенностями CO₂-газообмена, синтезом биомассы и различных форм водорастворимых углеводов // Изв. РАН. Сер. биол. 2010. № 2. С. 210–216.
- Колупаев Ю.Е. Антиоксиданты растительной клетки, их роль в АФК-сигналинге и устойчивости растений // Успехи соврем. биологии. 2016. Т. 136. № 2. С. 181–198.
- Колупаев Ю.Е., Рябчун Н.И., Вайнер А.А., Ястреб Т.О., Обозный А.И. Активность антиоксидантных ферментов и содержание осмолитов в проростках озимых злаков при закаливании и криострессе // Физиология растений. 2015. Т. 62. С. 533–541.
- Креславский В.Д., Лось Д.А., Аллахвердиев С.И., Кузнецов В.В. Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений // Физиология растений. 2012. Т. 59. № 2. С. 163–178.
- Кузнецов В.В. Физиологические механизмы адаптации и создание стресс-толерантных трансгенных растений // Проблемы экспериментальной ботаники. VII Купревичские чтения. Минск: Тэхналогія, 2009. С. 5–78.
- Ли Т.К., Лу Л.Л., Жу Е., Гупта Д.К., Ислам Е., Янг Х.Е. Антиоксидантная система в корнях двух контрастных экотипов *Sedum alfredii* при повышенных концентрациях цинка // Физиология растений. 2008. Т. 55. С. 886–894.
- Полесская О.Г., Каширина Е.И., Алехина Н.Д. Изменение активности антиоксидантных ферментов в листьях и корнях пшеницы в зависимости от формы и дозы азота в среде // Физиология растений. 2004. Т. 51. С. 686–691.
- Попов В.Н., Антипина О.В., Трунова Т.И. Перекисное окисление липидов при низкотемпературной адаптации листьев и корней теплолюбивых растений табака // Физиология растений. 2010. Т. 57. С. 153–156.
- Радюк М.С., Доманская И.Н., Щербаков Р.А., Шальго Н.В. Влияние низкой положительной температуры на содержание низкомолекулярных антиоксидантов и активность антиоксидантных ферментов в зеленых листьях ячменя // Физиология растений. 2009. Т. 56. С. 193–199.
- Рахманкулова З.Ф., Федяев В.В., Абдуллина О.А., Усманов И.Ю. Формирование адаптационных механизмов у пшеницы и кукурузы к повышенному содержанию цинка // Вестн. Башкирск. ун-та. 2008. Т. 13. № 1. С. 43–46.
- Репкина Н.С., Таланова В.В., Титов А.Ф., Букарева И.В. Реакция растений пшеницы (*Triticum aestivum* L.) на раздельное и совместное действие низкой температуры и кадмия // Тр. КарНЦ РАН. Сер. Эксперим. биол. 2014. № 5. С. 133–139.
- Синькевич М.С., Кропачева Е.В., Трунова Т.И. Изменение активности супероксиддисмутазы у растений *Arabidopsis thaliana* в процессе закаливания // Новые и нетрадиционные растения и перспектива их использования. М.: ВНИИССОК, 2015. С. 157–162.
- Синькевич М.С., Нарайкина Н.В., Трунова Т.И. Процессы, препятствующие повышению интенсивности перекисного окисления липидов у холодостойких растений при гипотермии // Физиология растений. 2011. Т. 58. С. 875–882.
- Титов А.Ф., Казнина Н.М., Таланова В.В. Тяжелые металлы и растения // Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2014. 194 с.
- Титов А.Ф., Акимова Т.В., Таланова В.В., Топчиева Л.В. Устойчивость растений в начальный период действия неблагоприятных температур. М.: Наука, 2006. 143 с.
- Титов А.Ф., Дроздов С.Н., Кретенко С.П., Таланова В.В. О роли специфических и неспецифических реакций в процессах термоадаптации активно вегетирующих растений // Физиология растений. 1983. Т. 30. № 3. С. 544–551.
- Титов А.Ф., Таланова В.В., Казнина Н.М., Лайдинен Г.Ф. Устойчивость растений к тяжелым металлам // Ин-т биологии КарНЦ РАН. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2007. 172 с.
- Apel K., Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction // Ann. Rev. Plant Biol. 2004. V. 55. P. 373–399.
- Barrameda-Medina Y., Montesinos-Pereira D., Romero L., Blasco B., Ruiz J.M. Role of GSH homeostasis under Zn toxicity in plants with different Zn tolerance // Plant Sci. 2014. V. 227. P. 110–121.
- Beauchamp C., Fridovich I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // Anal. Biochem. 1971. V. 44. P. 276–287.
- Beck E.H., Fettig S., Kanake C., Hartig K., Bhattari T. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress // J. Biosci. 2007. V. 32. P. 501–510.
- Blasco B., Graham N., Broadley M.R. Antioxidant response and carboxylate metabolism in *Brassica rapa* exposed to different external Zn, Ca and Mg supply // J. Plant Physiol. 2015. V. 176. P. 16–24.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.
- Broadley M.R., White P.J., Hammond J.P., Zelko I., Lux A. Zinc in plants // New Phytologist. 2007. V. 173. P. 677–702.
- Chakraborty A., Bhattacharjee S. Differential competence of redox-regulated mechanism under extremes of temperature determines growth performances and cross tolerance in two indica rice cultivars // J. Plant Physiol. 2015. V. 176. P. 65–77.

- Chen S.L., Kao C.H. Prior temperature exposure affects subsequent Cd-induced ethylene production in rice leaves // *Plant Sci.* 1995. V. 104. P. 135–138.
- Cuyppers A., Hendrix S., Amaral des Reis R., De Smet S., Deckers J., Gielen H., Jozefczak M., Loix C., Vercaempt H., Vangronsveld J., Keunen E. Hydrogen peroxide, signaling in disguise during metal phytotoxicity // *Frontiers in Plant Sci.* 2016. V. 7: 470.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00470>
- Czarnocka W., Karpiński S. Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses // *Free Radical Biol. Med.* 2018. V. 122. P. 4–20.
- Dai F., Huang Y., Zhou M., Zhang G. The influence of cold acclimation on antioxidative enzymes and antioxidants in sensitive and tolerant barley cultivars // *Biol. Plantarum.* 2009. V. 53. P. 257–262.
- Das K., Roychoudhury A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants // *Front. Environ. Sci.* 2014. V. 2: 53.
<https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053>
- Dat J., Vandenabeele S., Vranová E., Van Montagu M., Inzé D., Van Breusegem F. Dual action of the stress active oxygen species during plant stress responses // *Cell Mol. Life Sci.* 2000. V. 57. P. 779–795.
- del Rio L.A., Corpas F.J., Sandalio L.M., Palma J.M., Gómez M., Barrozo J.B. Reactive oxygen species, antioxidant system and nitric oxide in peroxisomes // *J. Exp. Bot.* 2002. V. 53. P. 1255–1272.
- Di Baccio D., Kopriva S., Sebastiani L., Rennenberg H. Does glutathione metabolism have a role in the defence of poplar against Zn excess? // *New Phytol.* 2005. V. 167. P. 73–80.
- Gill S.S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants // *Plant Physiol. Biochem.* 2010. V. 48. P. 909–930.
- Heath R.L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation // *Arch. Biochem. Biophys.* 1968. V. 125. P. 189–198.
- Hüner N.P.A., Öquist G., Sarhan F. Energy balance and acclimation to light and cold // *Trends Plant Sci.* 1993. V. 3. P. 224–230.
- Ivanov A.G., Rosso D., Savitch L.V., Stachula P., Rosembert M., Öquist G., Hurry V., Hüner N.P.A. Implications of alternative electron sinks in increased resistance of PSII and PSI photochemistry to high light stress in cold-acclimated *Arabidopsis thaliana* // *Photosynth. Res.* 2012. V. 113. P. 191–206.
- John R., Anjum N.A., Sopory S.K., Akram N.A., Ashraf M. Some key physiological and molecular processes of cold acclimation // *Biol. Plant.* 2016. V. 60. P. 603–618.
- Keunen E., Peshev D., Vangronsveld J., Van Den Ende W., Cuyppers A. Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept // *Plant Cell Environ.* 2013. V. 36. P. 1242–1255.
- Koussevitzky S., Suzuki N., Huntington S., Armijo L., Sha W., Cortes D., Shulaev V., Mittler R. Ascorbate peroxidase 1 plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 49. P. 34197–34203.
- Li X., Yang Y., Jia L., Chen H., Wei X. Zn-induced oxidative damage, antioxidant enzyme response and proline metabolism in roots and leaves of wheat plants // *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 2013. V. 89. P. 150–157.
- Liptáková L., Huttová J., Mistrík I., Tamás L. Enhanced lipoxygenase activity is involved in the stress response but not in the harmful lipid peroxidation and cell death of short-term cadmium-treated barley root tip // *J. Plant Physiol.* 2013. V. 170. P. 646–652.
- Lux A., Martinka M., Vaculík., White P.J. Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review // *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. P. 21–37.
- Maehly A. C., Chance B. The assay of catalase and peroxidase // *Meth. Biochem. Anal.* 1954. V. 1. P. 357–424.
- Matuszak-Slamani R., Brzóstowicz A. Influence of salt stress on growth and frost resistance of three winter cereals // *Int. Agrophys.* 2015. V. 29. P. 193–200.
- Mittal D., Madhyastha D.A., Grover A. Gene expression analysis in response to low and high temperature and oxidative stresses in rice: combination of stresses evokes different transcriptional changes as against stresses applied individually // *Plant Sci.* 2012. V. 197. P. 102–113.
- Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // *Trends Plant Sci.* 2002. V. 7. P. 405–410.
- Mittler R. Abiotic stress, the field environment and stress combination // *Trends Plant Sci.* 2006. V. 11. P. 15–19.
- Panda S.K., Chaudhury I., Khan M.H. Heavy metals induce lipid peroxidation and affect antioxidants in wheat leaves // *Biol. Plant.* 2003. V. 46. P. 289–294.
- Posmyk M.M., Bailly C., Szafranska K., Janas K.M., Corbin-eau F. Antioxidant enzymes and isoflavonoids in chilled soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seedlings // *J. Plant Physiol.* 2005. V. 162. P. 403–412.
- Remans T., Opedenacker K., Guisez Y., Carleer R., Schat H., Vangronsveld J., Cuyppers A. Exposure of *Arabidopsis thaliana* to excess Zn reveals Zn-specific oxidative stress signature // *Environ. Exp. Bot.* 2012. V. 84. P. 61–71.
- Ricachenevsky F.K., Menguer P.K., Sperotto R.A., Fett J.P. Got to hide your Zn away: molecular control of Zn accumulation and biotechnological application // *Plant Sci.* 2015. V. 236. P. 1–17.
- Rivero R.M., Mestre T.C., Mittler R., Rubio F., Garsia-Sanchez F., Martinez V. The combined effect of salinity and heat reveals a specific physiological, biochemical and molecular response in tomato plants // *Plant Cell Environ.* 2014. V. 37. P. 1059–1073.
- Rizhsky L., Liang H., Mittler R. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco // *Plant Physiol.* 2002. V. 130. P. 1143–1151.
- Rizhsky L., Liang H., Shuman J., Shulaev V., Davletova S., Mittler R. When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress // *Plant Physiol.* 2004. V. 134. P. 1683–1696.
- Rogozhin V.V., Verkhoturov V.V., Kurilyuk T.T. The antioxidant system of wheat seeds during germination // *Biol. Bull.* 2001. V. 28. P. 126–133.
- Scebba F., Sebastian L., Vitagliano C. Changes in activity of antioxidative enzymes in wheat (*Triticum aestivum*)

- seedlings under cold acclimation // *Physiol. Plant.* 1998. V. 104. P. 747–752.
- Sewelam N., Oshima Y., Mitsuda N., Ohme-Takegi M. A step towards understanding plant responses to multiple environmental stresses: a genome-wide study // *Plant Cell Environ.* 2014. V. 37. P. 2024–2035.
- Silva E.N., Ferreira-Silva S.L., Fontenele A.V., Ribeiro R.V., Viégas R.A., Silveira J.A.G. Photosynthetic changes and protective mechanisms against oxidative damage subjected to isolated and combined drought and heat stresses in *Jatropha curcas* plants // *J. Plant Physiol.* 2010. V. 167. P. 1157–1164.
- Wang C., Zhang S.H., Wang P.F., Hou J., Zhang W.J., Li W., Lin Z.P. The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in rapeseed seedlings // *Chemosphere.* 2009. V. 75. P. 1468–1476.

Effect of Low Temperature on the Oxidative Processes Intensity and Antioxidant Enzymes Activity in Wheat, Under Optimal and Excess Zinc Concentration in the Root Medium

Yu. V. Batova^{1, #}, N. M. Kaznina¹, and A. F. Titov¹

¹*Institute of Biology of the Karelian Research Centre Russian Academy of Sciences, ul. Pushkinskaya, 11, Petrozavodsk, 185910 Russia*

[#]*e-mail: batova@krc.karelia.ru*

The effect of a low temperature (4°C) on the intensity of lipid peroxidation and the activity of superoxide dismutase and peroxidase in the roots and leaves of *Triticum aestivum* L. winter wheat plants was studied in a laboratory condition at optimal (2 μM) and high (1000 μM) Zn concentrations in the root medium. It was found that under optimal mineral nutrition 4°C does not cause intensification of oxidative processes in wheat leaves, whereas in roots such an increase is temporary. This indicates the successful adaptation of plants to cold. It was revealed that with an excess of zinc, the action of low temperature causes an intensification of lipid peroxidation in the roots and leaves of plants, which, to a certain extent, is due to the relatively low activity of said antioxidant enzymes and incoordination in work. Detected decrease in the ability of plants to maintain the redox balance in cells under the simultaneous action of the studied stress factors leads to oxidative stress, inhibition of growth, and, as a consequence, negatively effects plants viability.