

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Аскорбат-глутатионовый цикл в проростках пшеницы и риса при аноксии и последующей реэрации

В.В. Емельянов^{1, 2}✉, Е.Г. Приказюк^{2, 3}, В.В. Ласточкин², О.М. Арешева², Т.В. Чиркова²

¹ Кафедра генетики и биотехнологии, биологический факультет, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

² Кафедра физиологии и биохимии растений, биологический факультет, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

³ Кафедра водных ресурсов, факультет геоинформатики и наблюдения за Землей, Университет Твенте, Энschede, Нидерланды

✉ bootika@mail.ru

Аннотация. Важной частью антиоксидантной системы растений является аскорбат-глутатионовый цикл (АГЦ), функционирование которого регистрируется при действии разнообразных стрессоров, в том числе дефицита и/или отсутствия O₂, а также окислительного стресса, возникающего сразу после восстановления доступа кислорода (реэрация, или постаноксия). Показана значительная аккумуляция окисленных форм аскорбата и глутатиона в проростках пшеницы (*Triticum aestivum*, сорт Ленинградка, неустойчивое растение) при действии на него 24-часовой аноксии и реэрации, что свидетельствует о развитии окислительного стресса. У риса (*Oryza sativa*, сорт Лиман, устойчивое растение) преобладали восстановленные формы данных антиоксидантов как в контроле, так и при стрессе, что может указывать на их интенсивное восстановление. У пшеницы активности аскорбатпероксидазы и дегидроаскорбатредуктазы в побегах, а также монодегидроаскорбатредуктазы и глутатионредуктазы в корнях снижались под действием аноксии и реэрации. У риса активность антиоксидантных ферментов сохранялась в отсутствие кислорода (аскорбатпероксидаза, глутатионредуктаза) и возрастала при постаноксии (редуктазы АГЦ). Аноксия стимулировала накопление мРНК генов органелльных форм аскорбатпероксидазы *OsAPX3*, *OsAPX5* в побегах и *OsAPX3-5*, *OsAPX7* в корнях проростков риса. При постаноксии во всем растении возрастал вклад генов цитоплазматических форм фермента – *OsAPX1*, *OsAPX2*, а также пластидной *OsAPX8*. При реэрации аккумулировались транскрипты пероксисомной и цитоплазматической монодегидроаскорбатредуктазы *OsMDAR2* и *OsMDAR4*, цитозольной и органелльной глутатионредуктазы *OsGR2* и *OsGR3*. В большинстве случаев недостаток O₂ индуцировал активность генов, кодирующих пероксисомные, пластидные и митохондриальные формы ферментов, а реэрация усиливала работу генов, кодирующих цитоплазматические формы. При действии аноксии и последующей реэрации выявлена инактивация ферментов АГЦ в проростках пшеницы, что нарушало эффективную работу цикла и запускало аккумуляцию окисленных форм аскорбата и глутатиона. У риса аноксия приводила к сохранению активности ферментов АГЦ, а реэрация ее стимулировала, в том числе на уровне экспрессии генов, что обеспечивало эффективное функционирование аскорбат-глутатионового цикла. Ключевые слова: аноксия; реэрация; окислительный стресс; аскорбиновая кислота; глутатион; аскорбат-глутатионовый цикл; пшеница; рис.

Для цитирования: Емельянов В.В., Приказюк Е.Г., Ласточкин В.В., Арешева О.М., Чиркова Т.В. Аскорбат-глутатионовый цикл в проростках пшеницы и риса при аноксии и последующей реэрации. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(1):44-54. DOI 10.18699/vjgb-24-06

Ascorbate-glutathione cycle in wheat and rice seedlings under anoxia and subsequent reaeration

V.V. Yemelyanov^{1, 2}✉, E.G. Prikaziuk^{2, 3}, V.V. Lastochkin², O.M. Aresheva², T.V. Chirkova²

¹ Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology, Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

² Department of Plant Physiology and Biochemistry, Faculty of Biology, Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

³ Department of Water Resources, ITC Faculty of Geo-Information Science and Earth Observation, University of Twente, Enschede, the Netherlands

✉ bootika@mail.ru

Abstract. The most important part of the plant antioxidant system is the ascorbate-glutathione cycle (AGC), the activity of which is observed upon exposure to a range of stressors, including lack of O₂, and oxidative stress occurring immediately after the restoration of oxygen access, hereafter termed reaeration or post-anoxia. The operation of the AGC (enzymes and low-molecular components) in wheat (*Triticum aestivum*, cv. Leningradka, non-resistant to hypoxia) and rice (*Oryza sativa*, cv. Liman, resistant) seedlings after 24 h anoxia and 1 h or 24 h reaeration was studied. Significant accumulation of oxidized forms of ascorbate and glutathione was revealed in the non-resistant plant (wheat) after 24 h of anoxia and reaeration, indicating the development of oxidative stress. In the resistant plant (rice), reduced forms of these antioxidants prevailed both in normoxia and under stress, which may indicate their intensive reduction. In wheat, the activities of ascorbate peroxidase and dehydroascorbate reductase in shoots, and monodehydroascorbate reductase and glutathione reductase in roots decreased under anoxia and reaeration. The activity of antioxidant enzymes was maintained in rice under lack of oxygen (ascorbate peroxidase, glutathione reductase) and increased during post-ano-

xia (AGC reductases). Anoxia stimulated accumulation of mRNA of the organellar ascorbate peroxidase genes *OsAPX3*, *OsAPX5* in shoots, and *OsAPX3-5* and *OsAPX7* in roots. At post-anoxia, the contribution of the *OsAPX1* and *OsAPX2* genes encoding the cytosolic forms of the enzyme increased in the whole plant, and so did that of the *OsAPX8* gene for the plastid form of the enzyme. The accumulation of mRNA of the genes *OsMDAR2* and *OsMDAR4* encoding peroxisomal and cytosolic monodehydroascorbate reductase as well as the *OsGR2* and *OsGR3* for cytosolic and organellar glutathione reductase was activated during reaeration in shoots and roots. In most cases, O₂ deficiency activated the genes encoding the peroxisomal, plastid, and mitochondrial forms of the enzymes, and upon reaeration, an enhanced activity of the genes encoding the cytoplasmic forms was observed. Taken together, the inactivation of AGC enzymes was revealed in wheat seedlings during anoxia and subsequent reaeration, which disrupted the effective operation of the cycle and triggered the accumulation of oxidized forms of ascorbate and glutathione. In rice, anoxia led to the maintenance of the activity of AGC enzymes, and reaeration stimulated it, including at the level of gene expression, which ensured the effective operation of AGC.

Key words: anoxia; reaeration; oxidative stress; ascorbate; glutathione; ascorbate-glutathione cycle; wheat; rice.

For citation: Yemelyanov V.V., Prikaziuk E.G., Lastochkin V.V., Aresheva O.M., Chirkova T.V. Ascorbate-glutathione cycle in wheat and rice seedlings under anoxia and subsequent reaeration. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(1):44-54. DOI 10.18699/vjgb-24-06

Введение

Растения обладают многоуровневой системой защиты от повреждающего действия активных форм кислорода (АФК), накапливающихся в ответ на изменение условий окружающей среды, этапов развития, действие гормонов и т. п. (Halliwell, 2006; Foyer, Noctor, 2009; Шиков и др., 2021). Важной частью антиоксидантной системы является аскорбат-глутатионовый цикл (АГЦ, путь Фойер–Халливелла–Асады), обеспечивающий эффективное восстановление низкомолекулярных антиоксидантов – аскорбата и глутатиона. Аскорбиновая кислота (АК, витамин С) – ключевой водорастворимый антиоксидант, присутствует во всех компартментах клетки, включая апопласт (Noctor, Foyer, 1998). Она нейтрализует большинство АФК, восстанавливает токоферол и эпоксикаротиноиды виолакаротинового цикла. При окислении АК образуется либо короткоживущий радикал – монодегидроаскорбиновая кислота (МДАК), либо нерадикальная окисленная форма – дегидроаскорбиновая кислота (ДАК). Две молекулы МДАК могут вступать в реакцию диспропорционирования с образованием одной молекулы восстановленной АК и одной молекулы ДАК.

Глутатион, еще один низкомолекулярный антиоксидант АГЦ, представляет собой трипептид γ -Glu-Cys-Gly. Он присутствует во всей клетке, но в апопласте лишь в следовых количествах (Noctor, Foyer, 1998; Gill, Tuteja, 2010). Глутатион нейтрализует активные формы кислорода и азота, свободные радикалы и пероксиды жирных кислот, участвует в обезвреживании метилглиоксала, ксенобиотиков и тяжелых металлов, восстанавливает ДАК и сульфгидрильные группы (Hasanuzzaman et al., 2017). Он участвует в различных физиологических процессах, включая окислительно-восстановительную регуляцию, передачу сигналов, конъюгацию и транспорт метаболитов, регуляцию роста и развития растений (Gill, Tuteja, 2010).

Ключевой фермент АГЦ – аскорбатпероксидаза (АПО или АРХ, КФ 1.11.1.11) – окисляет две молекулы АК до двух МДАК. АПО относится к гем-пероксидазам I класса и локализована преимущественно в пластидах (большинство изоформ), а также в цитоплазме и пероксисомах. Ряд стромальных АПО обнаружен и в матриксе митохондрий (Ishikawa, Shigeoka, 2008). МДАК в цикле может восстанавливаться до АК монодегидроаскорбатредуктазой

(МДАР, КФ 1.6.5.4), локализованной в цитозоле, пероксисомах, пластидах и митохондриях. При восстановлении двух молекул МДАК МДАР окисляет одну молекулу НАДН или НАДФН. ДАК может неферментативно восстанавливаться глутатионом, особенно при щелочных значениях pH, характерных для стромы хлоропластов. Тиоредоксины f и m также восстанавливают ДАК (Morell et al., 1997). В АГЦ за восстановление ДАК отвечает дегидроаскорбатредуктаза (ДАР, КФ 1.8.5.1), при этом две молекулы восстановленного глутатиона (GSH) превращаются в окисленную форму – глутатиондисульфид (GSSG). ДАР относится к суперсемейству глутатион-S-трансфераз, хотя и не способна катализировать конъюгацию глутатиона или восстановление пероксида. ДАР локализована в цитозоле, пероксисомах, пластидах и митохондриях, а у ряда растений – в апопласте и вакуолях (Ding et al., 2020). Глутатионредуктаза (ГР, КФ 1.8.1.7) катализирует восстановление глутатиона за счет НАДФН; она функционирует в цитоплазме, пластидах и митохондриях, причем 80 % активности в фотосинтетических тканях приходится на хлоропласты (Gill et al., 2013). Данные протеомного анализа подтверждают наличие ГР в пероксисомах (Palma et al., 2009). ГР участвует не только в АГЦ, она вовлечена в поддержание сульфгидрильных групп и восстановление глутатиона, окисленного непосредственно АФК, пероксидами жирных кислот и S-конъюгатами и т. п. (Gill, Tuteja, 2010; Gill et al., 2013).

Аскорбат-глутатионовый цикл участвует в антиоксидантной защите фотосинтетического аппарата. Именно в связи с этой функцией цикл и был сформулирован (Foyer, Halliwell, 1976). Он также реализуется в цитоплазме и, частично, в пероксисомах и митохондриях. АГЦ важен для адаптации растений к действию неблагоприятных факторов окружающей среды. Повышенная активность и экспрессия генов большинства ферментов АГЦ характерна для растений, устойчивых к засухе, засолению, неблагоприятным температурам, тяжелым металлам, фитопатогенам и т. п. Трансгенные растения со сверхэкспрессией генов цикла демонстрируют повышенную устойчивость к действию стрессоров (Hasanuzzaman et al., 2019).

Одним из распространенных стресс-факторов, действующих на растения, является дефицит (гипоксия) или полное отсутствие (аноксия) кислорода при избыточном

увлажнении, подтоплении почв или затоплении (Chirkova, Yemelyanov, 2018). АФК образуются еще в бескислородной среде, где они участвуют в трансдукции анаэробного сигнала и запускают деструктивные процессы (Blokchina et al., 2001). Последующее окисление кислородом накопленных в ходе аноксии восстановленных продуктов приводит к усилению генерации АФК и развитию пост-аноксического окислительного повреждения (Blokchina et al., 2003; Шиков и др., 2020).

Имеются многочисленные данные об изменении работы компонентов АГЦ под влиянием гипо- и аноксии. Дефицит O_2 снижал активность всех ферментов АГЦ в анаэробно-выращенных проростках риса и лотоса (Ushimaru et al., 1992, 2001), в корнях у пшеницы (Biemelt et al., 1998). Однако в корнях люпина (*Lupinus luteus*) изменений активности выявлено не было (Garnczarska, 2005), а у цитрусов (*Citrus paradisi* L. Macf. × *Poncirus trifoliata* L. Raf.) длительное затопление даже стимулировало большинство ферментов АГЦ (Hossain et al., 2009). В корнях сои при затоплении снижалась активность АПО (Kausar et al., 2012), у лука-батуна – АПО и ГР (Yiu et al., 2009), а в листьях хлопчатника – АПО, ДАР и ГР (Wang et al., 2019). Реаэрация, напротив, стимулировала большинство ферментов АГЦ (Ushimaru et al., 1992, 2001; Garnczarska, 2005).

Отметим, что только в нескольких работах проанализированы различия в функционировании АГЦ у растений с разной устойчивостью к дефициту кислорода. У бобовых растений, голубиногороха (*Cajanus cajan*) и маша (*Vigna radiata*) устойчивые к затоплению формы характеризовались большей активностью АПО и ГР при гипоксии и реэрации, что сопровождалось усилением экспрессии соответствующих генов (Sairam et al., 2009, 2011). Активность АПО при затоплении повышалась у устойчивых медленно растущих сортов риса (Damanik et al., 2010) и райграса (*Lolium perenne*) (Liu, Jiang, 2015). Аноксия и реоксигенация вызывали большую продукцию АФК и окислительные повреждения липидов и белков в проростках неустойчивого растения пшеницы (Чиркова и др., 1998; Shikov et al., 2022) и повышали активность каталазы и пероксидазы III класса у устойчивого растения (риса) (Емельянов и др., 2022).

Цель данного исследования состояла в изучении действия аноксии и постаноксического окислительного стресса на содержание низкомолекулярных антиоксидантов и активность ферментов аскорбат-глутатионового цикла у растений пшеницы и риса, контрастных по устойчивости к недостатку кислорода.

Материалы и методы

Растительный материал. Объектами исследования были 7-дневные проростки пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Ленинградка и 10-дневные проростки риса (*Oryza sativa* L.) сорта Лиман. Семена пшеницы были приобретены в ОПХ «Суйда» (Ленинградская область), семена риса предоставлены ФНЦ риса (Краснодар). Пшеницу использовали в качестве неустойчивого, а рис – устойчивого к гипоксии растения.

Семена поверхностно стерилизовали 5 % раствором гипохлорита натрия и выращивали в гидропонных условиях, как описано нами ранее (Yemelyanov et al., 2020). Анаэроб-

ные условия создавали пропуская газобразного азота (содержание кислорода <0.01 %, «Лентехгаз», Россия) через камеры с растениями, которые затем герметично закрывали и помещали в темноту для предотвращения образования кислорода на свету. Анаэробные условия проверяли с помощью индикатора Anaerotest® (Merck, Германия). Экспозиция в атмосфере азота составляла 24 ч. Контрольные растения помещали в темноту в условиях аэрации. Далее для создания условий реэрации опытные растения вынимали из анаэробных камер и оставляли на воздухе в темноте на 15 мин, 1, 3 и 24 ч в экспериментах по определению низкомолекулярных антиоксидантов и 1 и 24 ч в экспериментах по изучению активности ферментов аскорбат-глутатионового цикла и экспрессии генов, их кодирующих.

Определение содержания аскорбата и глутатиона. Низкомолекулярные антиоксиданты цикла экстрагировали охлажденной 5 % метафосфорной кислотой из 1 г побегов и корней после гомогенизации в жидком азоте (Blokchina et al., 2000). Экстракт фильтровали и центрифугировали 30 мин при 15000 g. Содержание аскорбата и дегидроаскорбата определяли спектрофотометрически бипиридиловым методом (Knörzer et al., 1996). Восстановленный и окисленный глутатион детектировали энзиматическим методом (Law et al., 1983; Knörzer et al., 1996) с помощью глутатионредуктазы (Sigma, США).

Определение активностей ферментов аскорбат-глутатионового цикла. Для экстракции ферментов побеги и корни 10 проростков взвешивали и растирали в ступке с пестиком в охлажденном буфере (соотношение ткань : буфер 1 : 10, w/v) с добавлением кварцевого песка. Все операции проводили при температуре +4 °C. Содержание белка в ферментной вытяжке определяли методом Брэдфорда (Bradford, 1976). Для каждого фермента при расчетах активности учитывалось автоокисление субстратов, которое детектировали без добавления ферментной вытяжки.

Для экстракции *аскорбатпероксидазы* растительную ткань гомогенизировали и экстрагировали 0.05 М К₂Na-фосфатным буфером (pH 7.0). После 15 мин центрифугирования при 8000 g супернатант собирали, а мезгу ресуспендировали с 1/2 первоначального объема буфера, затем экстрагировали 20 мин и снова центрифугировали. Объединенную фракцию использовали для определения активности фермента по уменьшению поглощения при 290 нм (СФ-26, «ЛМО», Россия) вследствие окисления аскорбата (Nakano, Asada, 1981). Реакционная среда для измерения активности АПО состояла из 40 мкл ферментной вытяжки (7.0–23.2 мкг белка) в 0.05 М К₂Na-фосфатном буфере (pH 7.0), куда добавляли 0.5 мл 5 мМ аскорбата (Sigma). Реакцию запускали добавлением H_2O_2 (2.5 мМ), в контрольный вариант добавляли дистиллированную воду. Конечный объем среды – 3 мл. Активность фермента рассчитывали в микромолях окисляемого аскорбата на 1 г сырой массы в минуту, используя коэффициент экстинкции $2.8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Промежуточные редуктазы АГЦ (МДАР и ДАР) экстрагировали 0.05 М К₂Na-фосфатным буфером (pH 7.3), содержащим 2 мМ ЭДТА и 1 % поливинилполипирролидон поперечносшитый (Sigma). Гомогенат фильтровали и центрифугировали при 15000 g в течение 20 мин.

Активность МДАР определяли в реакции, сопряженной с аскорбатоксидазой (Arrigoni et al., 1981). Состав реакционной среды: 100 мкл 0.3 мМ аскорбиновой кислоты, 200 мкл 0.3 мМ НАДН (Sigma), 0.5 ед. аскорбатоксидазы (Sigma), 300 мкл пробы (экстракт из побегов) или 500 мкл (экстракт из корней) и 0.05 М К,Na-фосфатный буфер (рН 6.3). Конечный объем среды – 3 мл. Реакцию запускали, добавляя аскорбатоксидазу. Оптическую плотность измеряли при 340 нм на спектрофотометре СФ-46 («ЛЮМО», Россия). Активность фермента рассчитывали в наномолях окисляемого НАДН на 1 г сырой массы в минуту (коэффициент экстинкции НАД(Ф)Н $6.22 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$).

Активность ДАР детектировали в реакционной среде, содержащей: 100 мкл 0.5 мМ дегидроаскорбиновой кислоты (Sigma), 100 мкл 1 мМ восстановленного глутатиона (Sigma), 50 мкл ферментной вытяжки (из побегов) или 100 мкл (из корней) и 0.05 М К,Na-фосфатный буфер (рН 7.0) (Kpörzger et al., 1996). Конечный объем – 3 мл. Реакцию запускали, добавляя ДАК, которую растворяли непосредственно перед измерением активности в дистиллированной воде, насыщенной газообразным азотом. Оптическую плотность измеряли при 265 нм на спектрофотометре СФ-46. Активность фермента рассчитывали в микромолях восстанавливаемого аскорбата на 1 г сырой массы в минуту.

Глутатионредуктазу экстрагировали 0.1 М К,Na-фосфатным буфером (рН 7.5), содержащим 2 мМ ЭДТА и 1 % поливинилпирролидон поперечносшитый. Гомогенат фильтровали и центрифугировали при 15000 г в течение 20 мин. Активность ГР определяли в среде следующего состава: 300 мкл экстракта, 100 мкл 0.5 мМ окисленного глутатиона (Sigma), 200 мкл 0.2 мМ НАДФН (Sigma) в 0.1 М К,Na-фосфатном буфере (Rao et al., 1995). Конечный объем среды – 3 мл. Реакцию запускали добавлением НАДФН. Оптическую плотность измеряли при 340 нм на спектрофотометре СФ-46. Активность фермента рассчитывали в наномолях окисляемого НАДФН на 1 г сырой массы в минуту.

Анализ экспрессии генов, кодирующих ферменты аскорбат-глутатионного цикла. Экспрессию генов изучали в проростках риса, поскольку в них сохранялась или возрастала активность большинства изучаемых ферментов. Для подбора праймеров использовали базы данных аннотированного генома риса (Rice Genome Annotation Project, <http://rice.uga.edu/> и The rice annotation project database, <http://rapdb.dna.affrc.go.jp/tools/search/>), а также референсный геном риса IRGSP-1.0 *Oryza sativa* var. *japonica* сорта Nipponbare, доступный на сайте (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_001433935.1/).

Были найдены последовательности нуклеотидов генов, кодирующих все типы аскорбатпероксидаз (8 генов), монодегидроаскорбатредуктаз (5 генов), дегидроаскорбатредуктаз (2 гена) и глутатионредуктаз (3 гена). Исследованы кодирующие последовательности ДНК (CDS). Среди аскорбатпероксидаз несколько CDS имел ген *OsAPX8* (2), среди монодегидроаскорбатредуктаз – гены *OsMDAR2* и *OsMDAR4* (по 2), среди глутатионредуктаз несколько CDS обнаружено у *OsGR2* (3) и *OsGR3* (2). В программе MegAlign 5.05 из набора DNASTar были выравнены

все CDS соответствующих генов по алгоритму ClustalW. К консенсусным участкам, ближайшим к 3'-концу CDS, в программе VectorNTI 8 были подобраны праймеры (Приложения 1 и 2)¹, т.е. разработанные нами праймеры позволяют оценить экспрессию любых вариантов альтернативного сплайсинга по изучаемым генам. В качестве гена сравнения (референсного) использовали *OsTUB4*, кодирующий β -тубулин-4 и продемонстрировавший наиболее стабильную экспрессию (Емельянов и др., 2022). Специфичность праймеров проверяли с помощью поиска гомологии с геномом и транскриптомом риса по алгоритму BLASTn на сайте базы данных NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Праймеры заказывали в компании «Бигль» (Россия, <http://www.biobeagle.com/>).

Методы выделения и очистки РНК, обратной транскрипции и количественной ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) были подробно описаны ранее (Емельянов и др., 2022). ОТ-ПЦР-РВ проводили с помощью наборов с красителем SYBRGreen («Синтол», Россия, <http://www.syntol.ru>) на термочиклере С1000 с оптическим модулем CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США) согласно рекомендациям производителя. Использовали оборудование ресурсного центра СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий».

Для получения относительного количества транскриптов из пороговых циклов амплификации (C_t) использовали метод $2^{-\Delta C_t}$, а для получения степени изменения относительного количества транскриптов каждого гена – метод $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak, Schmittgen, 2001). Изменение уровня экспрессии рассчитывали относительно контрольных (нормоксических) значений, принимая их за единицу.

Статистическая обработка. Все опыты выполняли в 4–8-кратной биологической и 3-кратной аналитической повторности. Статистическую обработку данных проводили с помощью GraphPad Prism 8.0.1 для Windows. На графиках приведены средние значения величин и их стандартные ошибки. Значения с разными буквами достоверно различаются при $p < 0.05$ (взвешенное среднее Тьюки). Тепловые карты строили с помощью пакета tidyverse (Wickham et al., 2019) в программной среде R (R Core Team, 2023). Звездочками на теплокарте обозначены статистически значимые отличия от контроля (U-критерий Манна–Уитни, $p < 0.05$).

Результаты

Действие аноксии и реэрации

на низкомолекулярные антиоксиданты АГЦ

Исходный уровень аскорбата у пшеницы был выше, чем у риса: в 2 раза в побегах и в 1.5 раза в корнях (рис. 1). Восстановленная форма АК доминировала в проростках обоих растений (80 и 70 % в побегах и корнях пшеницы и 60 % в органах проростков риса). 24-часовая аноксия проростков пшеницы вызывала падение уровня АК в побегах (в 4 раза) и корнях (в 5 раз) (см. рис. 1, а, в), при этом происходила аккумуляция ДАК (в 3.5 и 3 раза соответственно). В результате окисленная форма в них доминировала (80 % в побегах и 90 % в корнях). У риса в

¹ Приложения 1–6 см. по адресу:

<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2024-28/appx2.pdf>

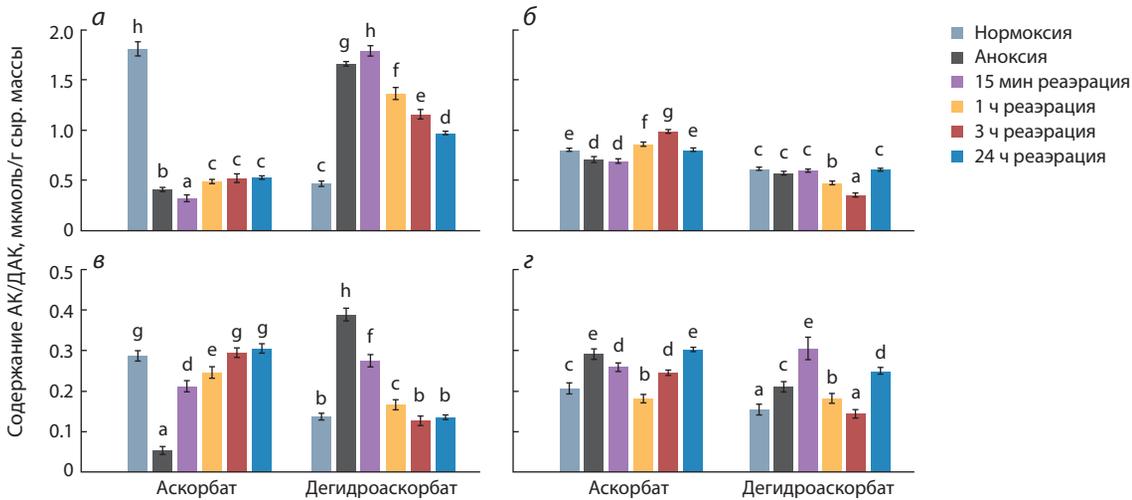


Рис. 1. Содержание аскорбиновой (АК) и дегидроаскорбиновой кислоты (ДАК) в побегах (а, б) и корнях (в, з) проростков пшеницы (а, в) и риса (б, з) при действии 24-часовой аноксии и последующей реаэрации. Значения с разными буквами (а–h) достоверно различаются (взвешенное среднее Тьюки, $p < 0.05$).

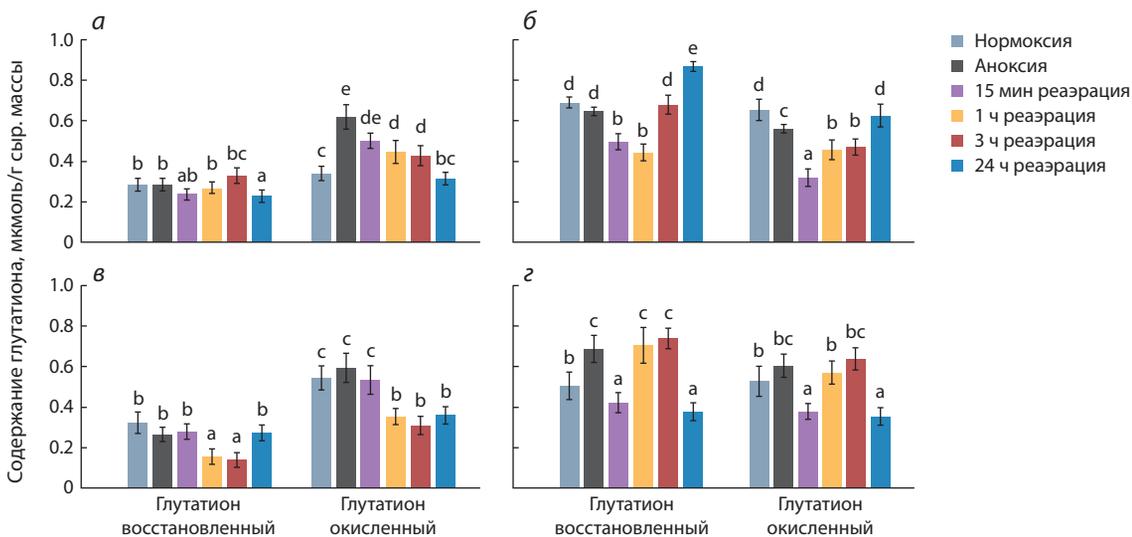


Рис. 2. Содержание восстановленной (ГSH) и окисленной (ГSSG) форм глутатиона в побегах (а, б) и корнях (в, з) проростков пшеницы (а, в) и риса (б, з) при действии 24-часовой аноксии и последующей реаэрации. Значения с разными буквами (а–e) достоверно различаются (взвешенное среднее Тьюки, $p < 0.05$).

побегах при действии аноксии содержание АК снижалось на 10 %, ДАК – не изменялось (см. рис. 1, б), тогда как в корнях уровень обеих форм аскорбата увеличивался на 40 % (см. рис. 1, з). 15-минутная реаэрация приводила к дальнейшему снижению содержания АК и накоплению ДАК в побегах пшеницы. Более длительная постаноксия (1–24 ч) вызывала аккумуляцию АК и падение уровня ДАК (см. рис. 1, в), причем обе формы достигали контрольных значений. Важно, что суммарный уровень аскорбата (АК+ДАК) под действием аноксии и последующей аэрации снижался с 2.3 до 1.5 мкмоль/г сыр. массы в побегах пшеницы и сохранялся в корнях. Изменения аскорбата в проростках риса были противоположены: в побегах уровень АК/ДАК сначала возрастал/снижался (соответственно), а затем возвращался к контрольному

(см. рис. 1, б), а в корнях, наоборот, сначала снижался/возрастал, однако к концу эксперимента оба параметра превосходили контрольные значения (см. рис. 1, з). Суммарный уровень аскорбата в проростках риса не изменялся (за исключением 24 ч реаэрации, когда в корнях он повышался в 1.5 раза).

Рассмотрим теперь динамику содержания глутатиона. Исходное содержание восстановленного глутатиона (GSH) и общего глутатиона (GSH+GSSG) было выше в проростках риса, особенно в побегах (рис. 2). Содержание обеих форм глутатиона, GSH и GSSG, было примерно равным. Соотношение GSH/GSSG составило 1.3 в побегах и 1.1 в корнях риса. У пшеницы доминировала окисленная форма (GSSG), соотношение GSH/GSSG – 0.6 и 0.9 соответственно. Отсутствие кислорода не оказывало воздействия

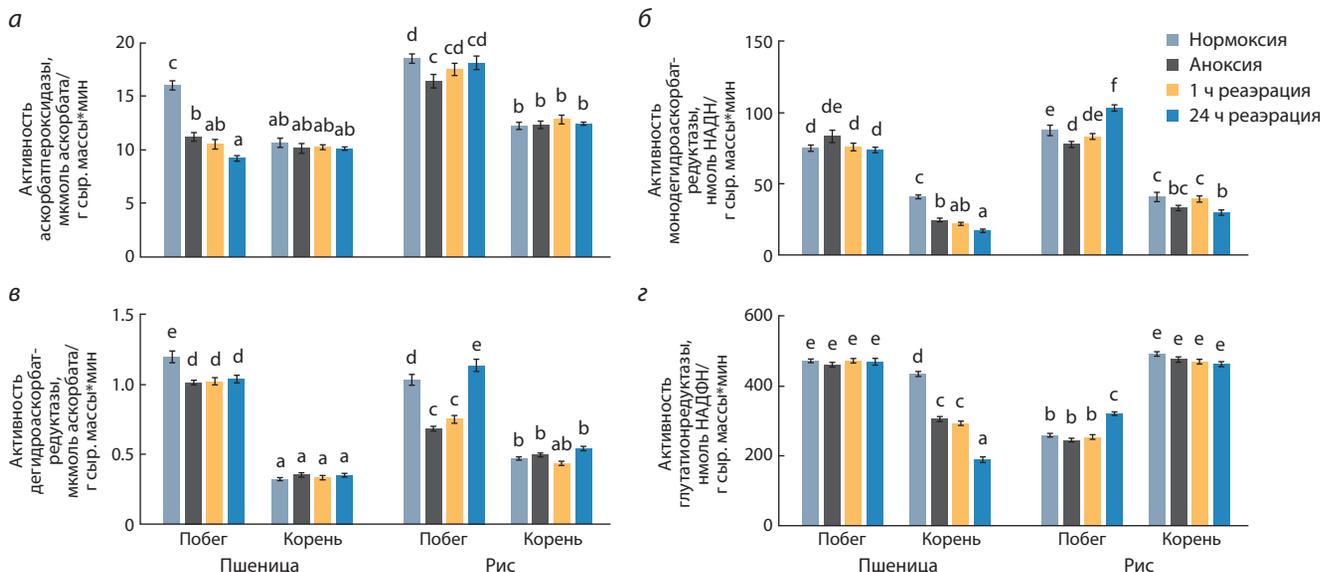


Рис. 3. Активность ферментов аскорбат-глутатионового цикла в побегах и корнях проростков пшеницы и риса при действии 24-часовой аноксии и последующей реэрации: *а* – аскорбатпероксидаза (АПО), *б* – монодегидроаскорбатредуктаза (МДАР), *в* – дегидроаскорбатредуктаза (ДАР), *г* – глутатионредуктаза (ГР).

Значения с разными буквами (а–f) достоверно различаются (взвешенное среднее Тьюки, $p < 0.05$).

на уровень ГSH в проростках пшеницы и побегах риса, тогда как в корнях риса он возрастал на 25 % (см. рис. 2, *з*). Содержание ГSSG изменялось под действием аноксии только в побегах изученных растений: у пшеницы увеличивалось в 2 раза, у риса снижалось на 15 % (см. рис. 2, *а, б*). Уровень ГSH снижался в побегах пшеницы при 24 ч реэрации, а в корнях на более коротких сроках (1–3 ч), после чего возвращался к контрольному (см. рис. 2, *а, в*). Содержание ГSSG при постаноксии уменьшалось в побегах до, а в корнях – ниже контроля (нормоксии). Уровень общего глутатиона (ГSH+ГSSG) при действии стресса существенно не изменялся, а доля ГSH уменьшалась с 46 % (побеги) и 40 % (корни) при нормоксии до 31–35 % при аноксии и краткосрочной реэрации, после чего возвращалась к контрольным значениям. На уровень обеих форм глутатиона в проростках риса постаноксия действовала сходным образом. В побегах он снижался при краткосрочной реэрации (15 мин–3 ч) и повышался к 24 ч постаноксии (см. рис. 2, *б*). В корнях риса содержание обеих форм снижалось после 15-минутной реоксигенации, повышалось к 1–3 ч и снова снижалось к 24 ч постаноксии (см. рис. 2, *з*). Уровень общего глутатиона у риса снижался при действии аноксии и краткосрочной (15 мин) реэрации, а затем возвращался к контролю. Соотношение ГSH/ГSSG в проростках риса было больше единицы на всем протяжении эксперимента, т. е. ГSH преобладал.

Действие аноксии и реэрации на ферменты АГЦ

Данные об изменении активности высокомолекулярных компонентов АГЦ представлены на рис. 3. Отметим, что исходный уровень активности ферментов АГЦ, за исключением ГР риса, был выше в побегах растений обоих видов (см. рис. 3). Аноксия и последующая реэрация вызвали существенное снижение активности АПО в побегах пшеницы, а в побегах риса 10 % подавление актив-

ности при кислородной недостаточности сменялось возвращением к контрольному уровню при постаноксии (см. рис. 3, *а*). В корнях растений обоих видов ни аноксия, ни реэрация не вызвали изменения активности АПО, так же как и МДАР в побегах пшеницы (см. рис. 3, *б*). В корнях пшеницы активность МДАР снижалась под действием кислородного голодания и реоксигенации почти в два раза. В побегах риса изменение активности МДАР было сходным с таковым у АПО, только при 24 ч постаноксии активность превышала контрольное значение. В корнях риса МДАР стабильно работала на протяжении всего эксперимента и ингибировалась на 25 % только после 24 ч реэрации (см. рис. 3, *б*).

Инактивацию ДАР регистрировали при аноксии в побегах обоих растений, но если у риса при реэрации происходило восстановление и дальнейшая активация фермента, то у пшеницы – нет (см. рис. 3, *в*). В корнях обоих растений активность ДАР оставалась неизменной при всех применяемых воздействиях, как и активность ГР в побегах пшеницы и корнях риса (см. рис. 3, *г*). В корнях пшеницы фермент под действием стрессоров инактивировался, а у риса происходила его стимуляция при 24 ч реэрации (см. рис. 3, *г*).

Действие аноксии и реэрации на экспрессию генов, кодирующих ферменты АГЦ у риса

Проведен анализ экспрессии генов, кодирующих ферменты АГЦ у риса, в тканях которого была показана активация ферментов при постаноксии. АПО у риса кодируется восемью генами: *OsAPX1* и 2 кодируют цитозольные изоформы, *OsAPX3* и 4 – пероксисомные, *OsAPX5* и 6 – изоформы с двойной плазмидно-митохондриальной локализацией, *OsAPX7* – стромальную изоформу пластид, *OsAPX8* – тилакоидную (см. Приложение 1). В побегах риса 24-часовая аноксия приводила к незначительному

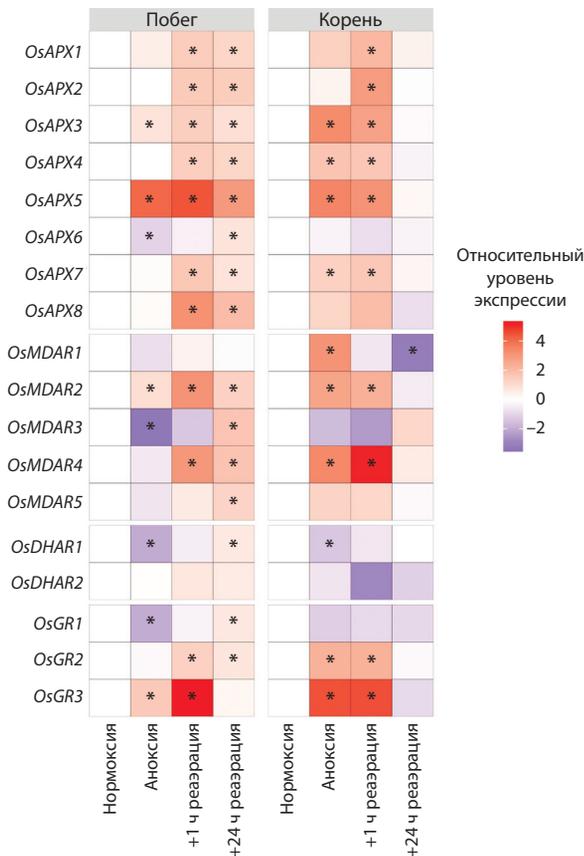


Рис. 4. Теплокарта относительного уровня транскрипции генов, кодирующих ферменты аскорбат-глутатионового цикла, в побегах и корнях проростков риса при действии 24-часовой аноксии и последующей реэрации.

За единицу принят уровень экспрессии в контроле (нормоксия). Звездочками на теплокарте обозначены статистически значимые отличия от контроля (U-критерий Манна-Уитни, $p < 0.05$).

увеличению экспрессии пероксисомного *OsAPX3*, 15-кратному увеличению экспрессии *OsAPX5* и небольшому уменьшению экспрессии *OsAPX6*, продукт которых локализован в пластидах и митохондриях (рис. 4, Приложение 3).

Реаэрация одинаково влияла на все гены семейства *OsAPX*, приводя к активации экспрессии как после 1 ч, так и после 24 ч. Статистически значимые различия в накоплении мРНК между часом и сутками реэрации детектировали у *OsAPX6*, экспрессия которого возрастала после суток реэрации, а также у *OsAPX7*, экспрессия которого тоже возросла после часа реэрации, но начинала уменьшаться после суток реэрации. При постаноксии в наибольшей степени активировались *OsAPX5* и *OsAPX8*. В корнях риса изменения экспрессии были более выражены (см. рис. 4 и Приложение 3). Под действием аноксии увеличилась экспрессия пероксисомных форм (*OsAPX3* и *OsAPX4*), пластидно-митохондриальной формы *OsAPX5* и стромальной формы *OsAPX7*. Через час реэрации экспрессия всех генов, кроме *OsAPX6*, возрастала, однако через сутки реэрации уровень мРНК всех генов возвращался к исходному значению. Наиболее активными при реэрации в корнях были *OsAPX2*, *OsAPX3* и *OsAPX5*.

В обоих органах ген *OsAPX5* был самым отзывчивым в ответ на аноксию и реэрацию.

Семейство генов, кодирующих МДАР у риса, насчитывает пять генов. Продукты генов *OsMDAR1* и *OsMDAR2* локализуются в пероксисомах, *OsMDAR3* и *OsMDAR4* – в цитозоле, *OsMDAR5* – в пластидах и митохондриях (см. Приложение 2). В побегах 24 ч аноксии приводили к увеличению экспрессии *OsMDAR2* и уменьшению экспрессии *OsMDAR3* (см. рис. 4, Приложение 4). После часа реэрации экспрессия *OsMDAR2* и *OsMDAR4* достигала пика, а после суток реэрации намечалась тенденция к возврату к исходному уровню экспрессии. Накопление мРНК *OsMDAR3* и *OsMDAR5* также возрастало после часа реэрации и продолжало расти после 24 ч реэрации. В корнях аноксия активировала экспрессию *OsMDAR1*, *OsMDAR2* и *OsMDAR4*. После часа реэрации количество транскриптов *OsMDAR1* возвращалось к исходному, нормоксическому уровню, а экспрессия генов *OsMDAR2* и *OsMDAR4* оставалась на повышенном аноксическом уровне. Через сутки реэрации активность всех генов возвращалась к исходному значению, а в случае гена *OsMDAR1* даже падала ниже него.

Среди двух генов, кодирующих ДАР у риса, изменения были показаны для *OsDHAR1*. В побегах и корнях экспрессия менялась схожим образом: 24 ч аноксии приводили к двукратному уменьшению количества транскриптов, после часа реэрации намечался возврат к исходным значениям, который успешно восстанавливался после суток реэрации (см. рис. 4, Приложение 5).

В геноме риса обнаружены три гена ГР: *OsGR1* и *OsGR3* кодируют изоформы фермента с пластидно-митохондриальной локализацией, а *OsGR2* – цитозольную изоформу (см. Приложение 2). В побеге после 24 ч аноксии экспрессия *OsGR1* снижалась, *OsGR2* – не изменялась, а *OsGR3* – возрастала (см. рис. 4, Приложение 6). После часа реэрации накопление мРНК *OsGR1* восстанавливалось до уровня нормоксии, *OsGR2* – возрастало, а *OsGR3* – продолжало возрастать, в 30 раз превышая контрольный уровень. Через сутки реэрации количество транскриптов *OsGR1* продолжало возрастать, *OsGR2* – оставалось на достигнутом уровне, *OsGR3* – возвращалось к исходному значению. В корнях риса наблюдалась абсолютная синхронность изменений *OsGR2* и *OsGR3*: возрастание после аноксии, сохранение достигнутого уровня через час реэрации, восстановление до исходного уровня через сутки реэрации. Экспрессия *OsGR1* не изменялась. *OsGR3* был ведущим в ответе на аноксию и реэрацию в обоих органах.

Обсуждение

Полученные результаты показали, что в условиях нормоксии неустойчивое к гипоксии растение (пшеница) накапливало большие количества аскорбиновой кислоты, а устойчивое растение (рис) продуцировало больше глутатиона (см. рис. 1 и 2). При действии 24-часовой аноксии и краткосрочной (15 мин–1 ч) реэрации происходила аккумуляция окисленных форм аскорбата и глутатиона в тканях пшеницы. Соотношение содержания восстановленных форм к содержанию окисленных (АК/ДАК, ГSH/ГSSG) становилось ниже единицы, что указывает

на развитие окислительного стресса. Важно, что в корнях пшеницы к 24 ч постаноксии уровни восстановленных антиоксидантов (АК, ГSH) возвращались к контрольным (см. рис. 1, в и рис. 2, в), тогда как в побегах этого не происходило: накапливалось больше ДАК (см. рис. 1, а) и снижался суммарный уровень аскорбата (АК+ДАК), что свидетельствует о большем развитии окислительных процессов в побегах пшеницы. Это согласуется с ранее полученными нами данными о сильных окислительных повреждениях липидов в побегах по сравнению с корнями пшеницы при действии аноксии и реэрации (Чиркова и др., 1998; Shikov et al., 2022).

У риса в проростках преобладали восстановленные формы антиоксидантов АГЦ как в контроле, так и при стрессе (см. рис. 1, б, з и рис. 2, б, з), что может свидетельствовать об эффективной антиоксидантной защите, купирующей развитие окислительного стресса. Меньшие окислительные повреждения липидов и белков (Чиркова и др., 1998; Shikov et al., 2022) и более низкая продукция H_2O_2 (Емельянов и др., 2022) были выявлены нами в проростках риса по сравнению с пшеницей.

В исследованиях других авторов в корнях пшеницы была показана аккумуляция АК и ДАК, а также понижение уровней обеих форм глутатиона при корневой аноксии (Biemelt et al., 1998). Далее краткосрочная реэрация вызывала снижение уровня АК, аккумуляцию ДАК и ГSH. При неизменном суммарном содержании аноксия приводила к истощению пула АК и накоплению ДАК, а реэрация стимулировала восстановление ДАК в листьях ячменя (*Hordeum vulgare*) (Skutnik, Rychter, 2009) и суспензионной культуре клеток резуховидки (*Arabidopsis thaliana*) (Paradiso et al., 2016). При продолжительной тотальной аноксии содержание всех форм низкомолекулярных антиоксидантов АГЦ уменьшалось в корнях проростков пшеницы и риса, а также в корневищах различающихся по устойчивости видов ириса, причем у устойчивых к гипоксии растений снижение было менее интенсивным (Blokshina et al., 2000). Листья среднеустойчивого к затоплению сорта цитрумело СРВ4475 содержали большие количества АК и ГSH при длительном затоплении и последующей реэрации (Hossain et al., 2009). Устойчивые к затоплению и реоксигенации трансгенные формы резуховидки со сверхэкспрессией гена *MYC2*, кодирующего фактор транскрипции сигналинга жасмоновой кислоты, аккумулялировали при затоплении и реэрации больше АК и ГSH, чем растения дикого типа и нокаутные мутанты *myc2* (Yuan et al., 2017). Таким образом, можно заключить, что для устойчивых к затоплению растений характерно преобладание восстановленных форм аскорбата и глутатиона при кислородном голодании и последующей реэрации, что может быть следствием их интенсивного восстановления в ходе аскорбат-глутатионового цикла.

Активность ферментов АГЦ в проростках неустойчивого растения (пшеница) под действием аноксии и реэрации либо не изменялась, либо подавлялась (АПО и ДАР в побегах, МДАР и ГР в корнях) (см. рис. 3). В результате эффективное функционирование АГЦ становилось невозможным. Снижение активности ферментов аскорбатной части АГЦ (АПО и ДАР) может быть связано с неспособностью побегов пшеницы восстанавливать дострессовый

уровень АК и ДАК при кислородной недостаточности и последующей реоксигенации (см. рис. 1, а). В то же время сохранение активности этих ферментов, возможно, обуславливает достижение этих уровней в корнях пшеницы (см. рис. 1, в). В корнях устойчивого растения (рис) активность ферментов АГЦ в условиях кислородной недостаточности и постаноксии также не изменялась (за исключением МДАР при 24 ч реэрации, см. рис. 3). В побегах риса аноксия вызывала снижение активности АПО, МДАР и ДАР, а возвращение кислорода стимулировало все ферменты цикла, что приводило к аккумуляции восстановленных форм АК и ГSH (см. рис. 1 и 2).

Ранее было показано, что недостаток/отсутствие O_2 вызывал снижение активности всех ферментов АГЦ в корнях пшеницы (Biemelt et al., 1998), а также выращенных в условиях гипоксии проростках риса и лотоса (Ushimaru et al., 1992, 2001). Для ряда неустойчивых к затоплению растений тоже получены данные о некоторых ферментах цикла. Так, дефицит кислорода подавлял активность АПО, ДАР и ГР в листьях хлопчатника (Wang et al., 2019) и ячменя (Skutnik, Rychter, 2009), АПО и ГР – в корнях лука-багуна (Yiu et al., 2009), активность АПО – у сои (Kausar et al., 2012). В корнях люпина дефицит O_2 влиял на работу ферментов АГЦ (Garczarska, 2005), а в листьях среднеустойчивого к затоплению сорта цитрумело СРВ4475 стимулировал активность большинства ферментов АГЦ, за исключением МДАР (Hossain et al., 2009). В суспензионной культуре клеток резуховидки работа АПО и ГР подавлялась аноксией и стимулировалась реоксигенацией, активности МДАР и ДАР при этом оставались неизменными (Paradiso et al., 2016). В корнях пшеницы происходила стимуляция ГР во время постигипоксии; при постаноксии стимуляции ферментов АГЦ не выявлено (Biemelt et al., 1998). Реэрация стимулировала активность всех ферментов АГЦ в проростках риса и лотоса (Ushimaru et al., 1992, 2001), в корнях люпина (Garczarska, 2005) и ГР в корнях ячменя (Skutnik, Rychter, 2009). Активность ГР в побегах ячменя, а также активности АПО и ДАР во всем растении не изменялись при постаноксии (Skutnik, Rychter, 2009). Сопоставление растений, различающихся по устойчивости к затоплению, выявило большую активацию АПО и ГР при гипоксии и реэрации у устойчивых форм голубинового гороха, маша (Sairam et al., 2009, 2011), сортов риса (Damanik et al., 2010) и райграса (Liu, Jiang, 2015). Можно заключить, что у устойчивых к затоплению растений кислородная недостаточность приводит к сохранению или активации ферментов АГЦ, а возвращение O_2 в окружающую среду стимулирует их активность, что позволяет восстанавливать низкомолекулярные антиоксиданты цикла и обеспечивать их эффективную рециклизацию.

Для более глубокого анализа функционирования АГЦ в проростках устойчивого к аноксии риса нами изучена экспрессия генов, кодирующих ферменты цикла. Хотя при аноксии активность АПО в побегах риса снижалась (см. рис. 3, а), подавление экспрессии было обнаружено только у гена *OsAPX6*, кодирующего пластидно-митохондриальную изоформу (см. рис. 4, Приложение 3). Наоборот, для *OsAPX5*, кодирующего фермент этой же локализации, и пероксисомного *OsAPX3* показана активация экспрессии в

побегах риса в анаэробной среде. Возвращение кислорода в окружающую среду стимулировало накопление мРНК всех *OsAPX*, включая цитозольные *OsAPX1* и *OsAPX2*, что соответствовало возрастанию активности АПО до контрольных нормоксических значений. В наибольшей степени при постаноксии активировались гены *OsAPX5* и *OsAPX8*, кодирующие пластидные изоформы. В корнях активность фермента не изменялась, однако уровень экспрессии пероксисомных (*OsAPX3* и *OsAPX4*) и пластидных (*OsAPX5* и *OsAPX7*) форм возрастал уже под действием аноксии, а при постаноксии к ним присоединялись цитозольные (*OsAPX1* и *OsAPX2*) и пластидная (*OsAPX8*) формы. Сильная стимуляция была показана для *OsAPX2*, *OsAPX3* и *OsAPX5*, т. е. цитозольной, пероксисомной и пластидно-митохондриальной форм соответственно. Ген *OsAPX5* активировался сильнее всех других и в обоих органах проростка.

В литературе данные об экспрессии генов *APX* немногочисленны. В проростках сои затопление подавляло гены цитозольных АПО *GmAPX1* и *GmAPX2* (Nishizawa et al., 2013). У голубиногороха и маша устойчивые к гипоксии формы характеризовались повышенной экспрессией генов, кодирующих цитозольную АПО при гипоксии, по сравнению с неустойчивыми к затоплению формами (Sairam et al., 2009, 2011). Повышенная экспрессия *OsAPX1* при затоплении была обнаружена у устойчивого сорта риса, несущего аллель *Sub1A* (Parlanti et al., 2011). Устойчивые к затоплению трансгенные формы резуховидки, экспрессирующие ген *MYC2*, и растения дикого типа отличались при затоплении активацией генов, кодирующих ферменты АГЦ (*AtAPX2*, *AtMDHAR3*, *AtDHAR1* и *AtGR1*) (Yuan et al., 2017). В культуре клеток резуховидки уровень мРНК *AtAPX2*, кодирующего цитозольную изоформу, тоже возрастал при аноксии, но еще больше он повышался при краткосрочной реэрации, как и у других цитозольных форм (*AtAPX1* и *AtAPX6*). Гены других АПО не исследовали (Paradiso et al., 2016). Нами показана активация генов цитозольных форм АПО у риса только в условиях постаноксии (см. рис. 4, Приложение 3).

В наших экспериментах активность промежуточных редуктаз АГЦ (МДАР и ДАР) изменялась в побегах сходным образом: снижалась при аноксии и возрастала выше контроля при реэрации. У ДАР такой паттерн совпадал с изменением экспрессии *OsDHAR1* (см. рис. 4, Приложение 5). Уменьшение активности МДАР в побеге происходило на фоне снижения количества транскриптов *OsMDAR3*, кодирующего цитозольную форму, и накопления транскриптов пероксисомной формы *OsMDAR2* (см. рис. 4, Приложение 4). При действии краткосрочной реэрации возрастала экспрессия *OsMDAR2* и *OsMDAR4*, кодирующих цитозольную изоформу. После суток постаноксии к ним присоединялись *OsMDAR3* и *OsMDAR5*, кодирующие цитозольную и пластидно-митохондриальную формы соответственно. В корнях, несмотря на отсутствие изменения активности фермента, аноксия активировала экспрессию *OsMDAR1*, *OsMDAR2* и *OsMDAR4*. При реэрации, как и в побеге, возрастало количество мРНК генов *OsMDAR2* и *OsMDAR4*. В научной литературе удалось обнаружить только вышеупомянутую статью (Yuan

et al., 2017), авторы которой изучали экспрессию генов, кодирующих редуктазы АГЦ при гипоксии и постгипоксии. Поддержание активности ГР при действии аноксии в побегах и корнях риса, а также стимуляция при реэрации в побегах связаны в первую очередь с экспрессией *OsGR2* и *OsGR3*, кодирующих цитозольную и пластидно-митохондриальную изоформы соответственно (см. рис. 4, Приложение 6).

Таким образом, в большинстве случаев недостаток O_2 индуцировал активность генов, кодирующих пероксисомные, пластидные и митохондриальные формы ферментов, а по возвращении в условия нормоксии наблюдалось также усиление работы генов, кодирующих цитоплазматические формы. Возможно, подобное вовлечение разных изоформ ферментов является важным физиологическим механизмом адаптации клетки при переходе от условий дефицита кислорода к реэрации. С другой стороны, подключение при реоксигенации цитоплазматических форм ферментов к органелльным, активированным еще при аноксии, может быть следствием усиления окислительного стресса при возвращении уровня кислорода к нормоксическим значениям. Активация ферментов АГЦ при постаноксии в большинстве случаев соответствовала изменениям экспрессии.

Заключение

Проведенное комплексное изучение работы АГЦ при действии аноксии и последующей реэрации выявило инактивацию АПО и ДАР в побегах, а также МДАР и ГР в корнях неустойчивого растения (пшеница), что нарушало эффективную работу цикла, запускало аккумуляцию окисленных форм аскорбата и глутатиона и способствовало развитию значительных окислительных повреждений. У устойчивого к затоплению растения (рис) кислородная недостаточность приводила к сохранению активности ферментов АГЦ, а реэрация ее стимулировала, в том числе на уровне экспрессии генов, что, по-видимому, позволяет восстанавливать низкомолекулярные антиоксиданты цикла и обеспечивать антиоксидантную защиту, препятствующую развитию окислительного стресса. Таким образом, выработанная растениями устойчивость к недостатку кислорода включает и механизмы устойчивости к окислительному стрессу.

Список литературы / References

- Емельянов В.В., Ласточкин В.В., Приказюк Е.Г., Чиркова Т.В. Активность каталазы и пероксидазы в растениях пшеницы и риса в условиях аноксии и постаноксической аэрации. *Физиология растений*. 2022;69(6):675-690. DOI 10.31857/S0015330322060033
- [Yemelyanov V.V., Lastochkin V.V., Prikaziuk E.G., Chirkova T.V. Activities of catalase and peroxidase in wheat and rice plants under conditions of anoxia and post-anoxic aeration. *Russ. J. Plant Physiol.* 2022;69(6):1-15. DOI 10.1134/S1021443722060036]
- Чиркова Т.В., Новицкая Л.О., Блохина О.Б. Перекисное окисление липидов и антиоксидантные системы в условиях аноксии у растений, различающихся по устойчивости к кислородной недостаточности. *Физиология растений*. 1998;45(1):65-73
- [Chirkova T.V., Novitskaya L.O., Blokhina O.B. Lipid peroxidation and antioxidant systems under anoxia in plants differing in their tolerance to oxygen deficiency. *Russ. J. Plant Physiol.* 1998;45(1): 55-62]

- Шиков А.Е., Чиркова Т.В., Емельянов В.В. Понимание у растений: причины, последствия и возможные механизмы. *Физиология растений*. 2020;67(1):50-66. DOI 10.31857/S0015330320010200
[Shikov A.E., Chirkova T.V., Yemelyanov V.V. Post-anoxia in plants: reasons, consequences, and possible mechanisms. *Russ. J. Plant Physiol.* 2020;67(1):45-59. DOI 10.1134/S1021443720010203]
- Шиков А.Е., Чиркова Т.В., Емельянов В.В. Функции активных форм кислорода в растительных клетках в норме и при адаптации. *Экол. генетика*. 2021;19(4):343-363. DOI 10.17816/ecogen 75975
[Shikov A.E., Chirkova T.V., Yemelyanov V.V. Functions of reactive oxygen species in plant cells under normal conditions and during adaptation. *Ecol. Genet.* 2021;19(4):343-363. DOI 10.17816/ecogen 75975]
- Arrighoni O., Dipierro S., Borraccino G. Ascorbate free radical reductase, a key enzyme of the ascorbic acid system. *FEBS Lett.* 1981; 125(2):242-244. DOI 10.1016/0014-5793(81)80729-6
- Biemelt S., Keetman U., Albrecht G. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. *Plant Physiol.* 1998;116(2):651-658. DOI 10.1104/pp.116.2.651
- Blokhina O.B., Virolainen E., Fagerstedt K.V., Hoikkala A., Wähälä K., Chirkova T.V. Antioxidant status of anoxia-tolerant and -intolerant plant species under anoxia and reoxygenation. *Physiol. Plant.* 2000; 109(4):396-403. DOI 10.1034/j.1399-3054.2000.100405.x
- Blokhina O.B., Chirkova T.V., Fagerstedt K.V. Anoxic stress leads to hydrogen peroxide formation in plant cells. *J. Exp. Bot.* 2001; 52(359):1179-1190. DOI 10.1093/jxb/52.359.1179
- Blokhina O.B., Virolainen E., Fagerstedt K.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann. Bot.* 2003; 91(2):179-194. DOI 10.1093/aob/mcf118
- 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;72(1-2):248-254. DOI 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Chirkova T., Yemelyanov V. The study of plant adaptation to oxygen deficiency in Saint Petersburg University. *Biol. Commun.* 2018; 63(1):17-31. DOI 10.21638/spbu03.2018.104
- Damanik R.I., Maziah M., Ismail M.R., Ahmad S., Zain A.M. Responses of the antioxidative enzymes in Malaysian rice (*Oryza sativa* L.) cultivars under submergence condition. *Acta Physiol. Plant.* 2010;32(4):739-747. DOI /10.1007/s11738-009-0456-3
- Ding H., Wang B., Han Y., Li S. The pivotal function of dehydroascorbate reductase in glutathione homeostasis in plants. *J. Exp. Bot.* 2020;71(12):3405-3416. DOI 10.1093/jxb/eraa107
- Foyer C.H., Halliwell B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*. 1976;133(1):21-25. DOI 10.1007/BF00386001
- Foyer C.H., Noctor G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid. Redox Signal.* 2009;11(4):861-905. DOI 10.1089/ars.2008.2177
- Garnczarska M. Response of the ascorbate-glutathione cycle to reoxygenation following hypoxia in lupine roots. *Plant Physiol. Biochem.* 2005;43(6):583-590. DOI 10.1016/j.plaphy.2005.05.003
- Gill S.S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 2010;48:909-930. DOI 10.1016/j.plaphy.2010.08.016
- Gill S.S., Anjum N.A., Hasanuzzaman M., Gill R., Trivedi D.K., Ahmad I., Pereira E., Tuteja N. Glutathione and glutathione reductase: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiol. Biochem.* 2013;70:204-212. DOI 10.1016/j.plaphy.2013.05.032
- Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 2006;141(2):312-322. DOI 10.1104/pp.106.077073
- Hasanuzzaman M., Nahar K., Anee T.I., Fujita M. Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 2017;23(2):249-268. DOI 10.1007/s12298-017-0422-2
- Hasanuzzaman M., Bhuyan M.H.M.B., Anee T.I., Parvin K., Nahar K., Mahmud J.A., Fujita M. Regulation of ascorbate-glutathione pathway in mitigating oxidative damage in plants under abiotic stress. *Antioxidants.* 2019;8(9):384. DOI 10.3390/antiox8090384
- Hossain Z., Lopez-Climent M.F., Arbona V., Perez-Clemente R.M., Gomez-Cadenas A. Modulation of the antioxidant system in citrus under waterlogging and subsequent drainage. *J. Plant Physiol.* 2009; 166(13):1391-1404. DOI 10.1016/j.jplph.2009.02.012
- Ishikawa T., Shigeoka S. Recent advances in ascorbate biosynthesis and the physiological significance of ascorbate peroxidase in photosynthesizing organisms. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2008;72(5): 1143-1154. DOI 10.1271/bbb.80062
- Kausar R., Hossain Z., Makino T., Komatsu S. Characterization of ascorbate peroxidase in soybean under flooding and drought stresses. *Mol. Biol. Rep.* 2012;39(12):10573-10579. DOI 10.1007/s11033-012-1945-9
- Knörzer O.C., Durner J., Boger P. Alterations in the antioxidative system of suspension cultured soybean cells (*Glycine max*) induced by oxidative stress. *Physiol. Plant.* 1996;97(2):388-396. DOI 10.1034/j.1399-3054.1996.970225.x
- Law M.Y., Charles S.A., Halliwell B. Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. The effect of hydrogen peroxide and of paraquat. *Biochem. J.* 1983;210(3):899-903. DOI 10.1042/bj2100899
- Liu M., Jiang Y. Genotypic variation in growth and metabolic responses of perennial ryegrass exposed to short-term waterlogging and submergence stress. *Plant Physiol. Biochem.* 2015;95:57-64. DOI 10.1016/j.plaphy.2015.07.008
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods.* 2001;25(4):402-408. DOI 10.1006/meth.2001.1262
- Morell S., Follmann H., De Tullio M., Haberlein I. Dehydroascorbate and dehydroascorbate reductase are phantom indicators of oxidative stress in plants. *FEBS Lett.* 1997;414(3):567-570. DOI 10.1016/S0014-5793(97)01074-0
- Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 1981;22(5):867-880. DOI 10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232
- Nishizawa K., Hiraga S., Yasue H., Chiba M., Tougou M., Nanjo Y., Komatsu S. The synthesis of cytosolic ascorbate peroxidases in germinating seeds and seedlings of soybean and their behavior under flooding stress. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2013;77(11):2205-2209. DOI 10.1271/bbb.130384
- Noctor G., Foyer C.H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1998; 49:249-279. DOI 10.1146/annurev.arplant.49.1.249
- Palma J.M., Corpas F.J., Del Rio L.A. Proteome of plant peroxisomes: new perspectives on the role of these organelles in cell biology. *Proteomics.* 2009;9(9):2301-2312. DOI 10.1002/pmic.200700732
- Paradiso A., Caretto S., Leone A., Bove A., Nisi R., De Gara L. ROS production and scavenging under anoxia and re-oxygenation in *Arabidopsis* cells: a balance between redox signaling and impairment. *Front. Plant Sci.* 2016;7:1803. DOI 10.3389/fpls.2016.01803
- Parlanti S., Kudahettige N.P., Lombardi L., Mensuali-Sodi A., Alpi A., Perata P., Pucciariello C. Distinct mechanisms for aerenchyma formation in leaf sheaths of rice genotypes displaying a quiescence or escape strategy for flooding tolerance. *Ann. Bot.* 2011;107(8):1335-1343. DOI 10.1093/aob/mcr086
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical computing, Vienna, Austria. 2023. (<https://www.R-project.org/>)
- Rao M.V., Hale B.A., Ormrod D.P. Amelioration of ozone-induced oxidative damage in wheat plants grown under high carbon dioxide. Role of antioxidant enzymes. *Plant Physiol.* 1995;109(2):421-432. DOI 10.1104/pp.109.2.421

- Sairam R.K., Kumutha D., Ezhilmathi K., Chinnusamy V., Meena R.C. Waterlogging induced oxidative stress and antioxidant enzyme activities in pigeon pea. *Biol. Plant.* 2009;53(3):493-504. DOI 10.1007/s10535-009-0090-3
- Sairam R.K., Dharmar K., Lekshmy S., Chinnusamy V. Expression of antioxidant defense genes in mung bean (*Vigna radiata* L.) roots under water-logging is associated with hypoxia tolerance. *Acta Physiol. Plant.* 2011;3(3):735-744. DOI 10.1007/s11738-010-0598-3
- Shikov A.E., Lastochkin V.V., Chirkova T.V., Mukhina Z.M., Yemelyanov V.V. Post-anoxic oxidative injury is more severe than oxidative stress induced by chemical agents in wheat and rice plants. *Acta Physiol. Plant.* 2022;44(9):90. DOI 10.1007/s11738-022-03429-z
- Skutnik M., Rychter A.M. Differential response of antioxidant systems in leaves and roots of barley subjected to anoxia and post-anoxia. *J. Plant Physiol.* 2009;166(9):926-937. DOI 10.1016/j.jplph.2008.11.010
- Ushimaru T., Shibasaka M., Tsuji H. Development of O₂ detoxification system during adaptation to air of submerged rice seedlings. *Plant Cell Physiol.* 1992;33(8):1065-1071. DOI 10.1093/oxfordjournals.pcp.a078357
- Ushimaru T., Kanematsu S., Katayama M., Tsujid H. Antioxidative enzymes in seedlings of *Nelumbo nucifera* germinated under water. *Physiol. Plant.* 2001;112(1):39-46. DOI 10.1034/j.1399-3054.2001.1120106.x
- Wang H., Chen Y., Hu W., Snider J.L., Zhou Z. Short-term soil-waterlogging contributes to cotton cross tolerance to chronic elevated temperature by regulating ROS metabolism in the subtending leaf. *Plant Physiol. Biochem.* 2019;139:333-341. DOI 10.1016/j.plaphy.2019.03.038
- Wickham H., Averick M., Bryan J., Chang W., McGowan L.D., François R., Grolemond G., Hayes A., Henry L., Hester J., Kuhn M., Pedersen T.L., Miller E., Bache S.M., Müller K., Ooms J., Robinson D., Seidel D.P., Spinu V., Takahashi K., Vaughan D., Wilke C., Woo K., Yutani H. Welcome to the tidyverse. *J. Open Source Softw.* 2019;4(43):1686. DOI 10.21105/joss.01686
- Yemelyanov V.V., Lastochkin V.V., Chirkova T.V., Lindberg S.M., Shishova M.F. Indoleacetic acid levels in wheat and rice seedlings under oxygen deficiency and subsequent reoxygenation. *Biomolecules.* 2020;10(2):276. DOI 10.3390/biom10020276
- Yiu J.-C., Liu C.-W., Fang D.Y., Lai Y.-S. Waterlogging tolerance of Welsh onion (*Allium fistulosum* L.) enhanced by exogenous spermidine and spermine. *Plant Physiol. Biochem.* 2009;47(8):710-716. DOI 10.1016/j.plaphy.2009.03.007
- Yuan L.-B., Dai Y.-S., Xie L.-J., Yu L.-J., Zhou Y., Lai Y.-X., Yang Y.-C., Xu L., Chen Q.-F., Xiao S. Jasmonate regulates plant responses to postsubmergence reoxygenation through transcriptional activation of antioxidant synthesis. *Plant Physiol.* 2017;173(3):1864-1880. DOI 10.1104/pp.16.01803

ORCID

V.V. Yemelyanov orcid.org/0000-0003-2323-5235
E.G. Prikaziuk orcid.org/0000-0002-7331-7004
V.V. Lastochkin orcid.org/0000-0001-9540-497X
O.M. Aresheva orcid.org/0009-0000-6024-2966
T.V. Chirkova orcid.org/0000-0002-2315-0816

Благодарности. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-00484 (<https://rscf.ru/project/22-24-00484/>). В экспериментах использовали оборудование Ресурсного центра Санкт-Петербургского государственного университета «Развитие молекулярных и клеточных технологий». Статья посвящается 300-летию Санкт-Петербургского государственного университета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 18.08.2023. После доработки 27.11.2023. Принята к публикации 28.11.2023.