

УДК 581.1

ВОЗРАСТНЫЕ И АДАПТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРО-/АНТИОКСИДАНТНОГО МЕТАБОЛИЗМА И ДЫХАНИЯ ЛИСТЬЕВ ЗИМНЕ-ЗЕЛЕННОГО ТРАВЯНИСТОГО РАСТЕНИЯ *Ajuga reptans* L. В ПРИРОДНЫХ УСЛОВИЯХ ТАЕЖНОЙ ЗОНЫ

© 2024 г. М. А. Шелякин^{a,*}, Е. В. Силина^a, Т. К. Головкин^a^aИнститут биологии Коми научного центра Уральского отделения
Российской академии наук, Сыктывкар, Россия

*e-mail: shelyakin@ib.komisc.ru

Поступила в редакцию 14.06.2023 г.

После доработки 27.07.2023 г.

Принята к публикации 09.08.2023 г.

Онтогенетическое развитие и условия среды являются основными факторами, определяющими жизнедеятельность растений. Исследовали активность антиоксидантных ферментов и дыхательных путей в розеточных листьях летне-зимне-зеленого травянистого многолетника *Ajuga reptans* L. (живучка ползучая) в связи с возрастом и перезимовкой. Сформированные в мае–июне листья перезимовывали и вновь функционировали вплоть до появления новой генерации листьев. Содержание продуктов липопероксидации и пероксида водорода в листьях перезимовавших растений было достоверно выше, чем до перезимовки. Активность антиоксидантных ферментов изменялась разнонаправленно. Повышенный уровень активности аскорбатпероксидазы (APX) отмечали сразу после выхода растений из-под снега, каталазы (CAT) – до и в период перезимовки, супероксиддисмутаза (SOD) – до, в период и сразу после перезимовки. На нативных гелях идентифицировали Mn-SOD, Fe-SOD и три изоформы Cu/Zn-SOD, две изоформы APX и одну – CAT. Скорость дыхания, измеренная при 20°C, была максимальной у молодых растущих листьев и снижалась в 3–4 раза к завершению жизненного цикла. Величина соотношения способности цитохромного и альтернативного дыхательных путей изменялась в пределах от 3 до 1 и менее. Коэффициент энергетической эффективности дыхания ($Y_{\text{АТФ/глюкоза}}$, количество молей АТФ, образующихся при окислении в дыхании 1 моля глюкозы) варьировал в пределах от 17 до 25, снижаясь в период перезимовки и на завершающих этапах онтогенеза. Результаты анализа главных компонент свидетельствуют о взаимосвязи исследованных показателей и вовлеченности закономерных изменений про-/антиоксидантного метаболизма и дыхания в процесс адаптации растений, зимующих с зелеными листьями. В совокупности полученные данные дополняют и углубляют представления о физиологических механизмах, способствующих перезимовке и сохранению фотосинтетического аппарата.

Ключевые слова: *Ajuga reptans*, зимне-зеленые листья, дыхание, дыхательные пути, энергетическая эффективность дыхания, адаптация

DOI: 10.31857/S0015330324010052, EDN: NWDDHY

ВВЕДЕНИЕ

Онтогенетическое развитие растительно-го организма генетически детерминировано. Оно реализуется с участием целой системы сигнальных путей, механизмов и процессов, функционирование которых в значительной

степени зависит от условий внешней среды. В сезонном климате умеренного пояса влияние внешних факторов наиболее значимо для растений, зимующих с зелеными листьями. Зимнезеленость – важный признак растений, ассоциированный с адаптивными процессами, направленными на сохранение фотосинтетического аппарата (ФСА) в период перезимовки. Ранее нами было установлено, что у зимующих листьев травянистого многолетника *Ajuga reptans* L. этому способствует диссоциация пигмент-белковых комплексов фотосистем,

Сокращения: АОХ – альтернативная оксидаза; АП – альтернативный путь дыхания; ФСА – фотосинтетический аппарат; ЦП – цитохромный путь дыхания; ЭЭД – энергетическая эффективность дыхания; APX – аскорбатпероксидаза; CAT – каталаза; SOD – супероксиддисмутаза; TBARS – продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой.

снижение содержания хлорофиллов, накопление антоцианов, повышение уровня дезоксидации пигментов виолаксантинового цикла и тепловой диссипации поглощенной световой энергии, снижение фотохимической эффективности ФС II [1, 2].

Известно, что в большинстве случаев неблагоприятные воздействия факторов среды являются причиной избыточного накопления АФК в клетках и развития окислительного стресса. Это приводит к торможению роста, снижению продуктивности и даже гибели растений. В то же время АФК и продукты их взаимодействия являются важными компонентами сигнальных путей, участвующих в запуске и развитии адаптивных реакций [3]. Существенную роль в поддержании физиологически приемлемых концентраций АФК в клетках играет антиоксидантная система и ее ключевые компоненты — антиоксидантные ферменты. Антиоксидантная система в совокупности с другими механизмами защиты, позволяет растениям успешно реализовывать генетически обусловленную программу онтогенеза [4, 5].

Дыхание снабжает растительный организм энергией и метаболитами в соответствии с этапом онтогенетического развития и изменениями условий среды [6]. Вовлечение альтернативного пути дыхания (АП) способствует координации механизмов адаптации фотосинтезирующей клетки. АП участвует в регуляции редокс-баланса и контроле генерации АФК [7, 9], защищая тем самым ФСА [6, 10, 11]. Вовлечение АП приводит к снижению выхода энергии при окислении дыхательного субстрата [12]. При АП ток e^- минует комплексы III и IV митохондриальной ЭТЦ, связанные с образованием протонного потенциала, являющегося мерой свободной энергии, которая реализуется в синтезе АТФ с участием АТФ-синтазы [13]. Мы полагаем, что исследования функционирования антиоксидантной системы и дыхания листьев могут существенно дополнить и углубить представления о защитных механизмах, способствующих перезимовке растений и сохранению ФСА.

Целью данной работы было изучить динамику изменения компонентов про-/антиоксидантного метаболизма, активности дыхательных путей и энергетической эффективности дыхания в жизненном цикле розеточных листьев травянистого летне-зимне-зеленого растения *Ajuga reptans* L.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Ajuga reptans L. (живучка ползучая) — летне-зимне-зеленый травянистый многолетник сем. Lamiaceae со сложным онтогенезом, включающим смену вегетативных поколений. На северной границе ареала большинство растений

являются побегами вегетативного происхождения (раметами) [14]. В подзоне средней тайги европейского северо-востока России растения перезимовывают под слоем снега. После схода снега в конце апреля — начале мая растения появляются с зелеными листьями, которые в июне заменяются новой генерацией листьев. Перезимовавшие листья являются источником продуктов текущего фотосинтеза, реутилизируемых органических соединений и минеральных элементов для соцветий и формирующихся молодых розеточных листьев.

Исследования проводили в 2017–2022 гг. Растения *A. reptans* произрастали в смешанном елово-осиновом лесу в окрестностях г. Сыктывкара (61°3' с. ш., 50°33' в. д.). Среднегодовая температура воздуха в районе исследований 1°C, среднесуточная температура самого теплого месяца (июля) 17°C, самого холодного (января) — минус 16°C.

Образцы листьев отбирали со средней части розетки побегов: 1) вновь формирующиеся, активно растущие листья (июнь); 2) функционально зрелые, завершившие рост листья (июль); 3) зрелые листья перед перезимовкой (конец сентября); 4) зрелые листья в период перезимовки (декабрь) и 5) после выхода растений из-под снега (конец апреля); 6) перезимовавшие функционально активные листья (середина мая); 7) стареющие листья на завершающих этапах жизненного цикла растений (начало июня).

Часть растительного материала фиксировали в жидком азоте для определения показателей про-/антиоксидантного статуса листьев. Дыхание измеряли у свежесобранных листьев.

Измерение показателей про-/антиоксидантного статуса листьев. Активность перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по содержанию продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (TBARS) [15]. Оптическую плотность регистрировали при длинах волн 532 и 600 нм. Количество TBARS рассчитывали с учетом коэффициента молярной экстинкции $\varepsilon = 156$ мМ/см после вычитания неспецифического поглощения при 600 нм и выражали в мкмоль/г сырой массы. Содержание H_2O_2 определяли хемилюминесцентным методом, основанном на перекисном окислении люминола [16]. Уровень хемилюминесценции регистрировали с помощью хемилюминометра [17]. Количество H_2O_2 рассчитывали по графику градуировочной зависимости и выражали в мкмоль/г сырой массы. Проверку на специфичность проводили по ингибированию образования H_2O_2 добавлением каталазы (“Sigma”, США). Общую активность супероксиддисмутазы (SOD) определяли по способности фермента подавлять фотохимическое восстановление нитросинего тетразолия (НСТ) (“DDL”, США) [18]. Поглощение ре-

гистрировали при длине волны 560 нм. Активность аскорбатпероксидазы (APX) определяли при длине волны 290 нм по изменению оптической плотности раствора в результате окисления аскорбата [19]. Активность APX рассчитывали, используя коэффициент экстинкции аскорбата $\epsilon = 2.8 \text{ мМ/см}$ и выражали в мкмоль аскорбата/мг белка мин. Активность каталазы (CAT) измеряли при длине волны 240 нм по количеству разложившегося H_2O_2 ("Sigma", США) за единицу времени [20], рассчитывали, используя коэффициент экстинкции H_2O_2 ($\epsilon = 0.0436 \text{ мМ/см}$) и выражали в мкмоль H_2O_2 /мг белка мин. Содержание растворимого белка анализировали по методу Бредфорда [21], используя в качестве стандарта БСА ("Sigma", США). Процедуры выделения белка проводили при температуре 4°C.

Определение активности изоформ антиоксидантных ферментов. Для определения изоферментного состава SOD, APX и CAT применяли метод нативного электрофореза в полиакриламидном геле (12.5% для SOD, 10% для APX и CAT). Нативный форез проводили при температуре 4°C и при стабильном токе 180 В, как описано в работе [22]. В карман геля вносили от 10 до 20 мкг белка. Для визуализации изоформ SOD гели инкубировали в фосфатном буфере с добавлением рибофлавина и нитросинего тетразолия в темноте [18]. Через 30 мин гели переносили на свет до появления светлых полос на фиолетовом фоне. Для идентификации изоформ SOD использовали ингибиторный анализ [22]. Для каждого ингибиторного анализа получали новый гель с разделенными белками. Для ингибирования Cu/Zn-SOD и Fe-SOD в окрашивающий буфер добавляли 5 мМ H_2O_2 , для Cu/Zn-SOD – 3 мМ KCN. Для визуализации изоформ APX гели последовательно инкубировали в фосфатном буфере, содержащем 2 мМ аскорбата, затем – 4 мМ аскорбата и 1 мМ H_2O_2 [23]. Окрашивание гелей проводили в фосфатном буфере с добавлением 14 мМ TEMED (N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин) ("Alfa Aesar", Германия) и 2.45 мМ НСТ до появления светлых полос на фиолетовом фоне, свидетельствующих об активации APX. Активность изоформ CAT на гелях определяли по методу, основанному на восстановлении гексацианоферрата калия (III) до гексацианоферрата калия (II) и последующей реакцией гексацианоферрата калия (II) с хлоридом железа (III) с образованием окрашенного соединения [24]. Гели помещали в 4 мМ раствор H_2O_2 , промывали дистиллированной водой и окрашивали в 1% (мас./об.) растворе FeCl_3 ("Fisher Chemical", Великобритания) и $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ("Лабтех", Россия). Для обработки изображений белковых профилей изоформ антиоксидантных ферментов на гелях использовали гель-документирующую систему

GelDoc-ChemiDocXRS ("Bio-Rad", США) и программное обеспечение Quantity One Analysis Software, Version 4.6.9. ("Bio-Rad", США). В расчетах использовали показатель средней плотности пикселей полос за вычетом значений плотности пикселей фона геля.

Все биохимические анализы проводили в 2–3-кратной аналитической повторности на 3–4 независимых образцах.

Измерения активности дыхания и дыхательных путей. Скорость дыхания листьев определяли по поглощению O_2 в темноте при 20°C полярографически с помощью Oxytherm system ("Hansatech Inst.", Англия). Высечки средней части свежесобранных листьев помещали в реакционный сосуд, содержащий буферный раствор HEPES ("Helicon", Россия) (50 мМ, pH 7.2). Скорость отдельных дыхательных путей определяли с добавлением специфических ингибиторов, оптимальные концентрации которых были подобраны в предварительных экспериментах. В качестве ингибитора альтернативной оксидазы (АОХ) использовали 8 мМ раствор салицилгидроксамовой кислоты ("Lancaster", Англия). Активность цитохромоксидазы подавляли 6 мМ раствором KCN ("Sigma", США).

Интенсивность общего дыхания образцов определяли по скорости поглощения O_2 тканями без добавления ингибиторов. Ингибиторы дыхательных путей добавляли последовательно после измерения интенсивности общего поглощения O_2 . Скорость поглощения кислорода представляли в виде суммы отдельных компонент и выражали в нмоль O_2 /г сухой массы мин: $V_t = V_{\text{alt}} + V_{\text{cy}} + V_{\text{res}}$, где V_t – общее дыхание; V_{alt} – альтернативное дыхание, подавляемое ингибитором АОХ салицилгидроксамовой кислотой, V_{cyt} – цитохромное (цианидчувствительное) дыхание; V_{res} – остаточное дыхание, регистрируемое в присутствии ингибиторов альтернативного и цитохромного дыхательных путей (ЦП). Определения проводили в 4–7-кратной биологической повторности.

Энергетическую эффективность дыхания (ЭДД) листьев оценивали, рассчитывая коэффициент $Y_{\text{АТФ/глюкоза}}$ – эффективность окисления глюкозы для образования АТФ с учетом вклада дыхательных путей, используя величины выхода АТФ при дыхании по ЦП и АП [12]. Предварительно количество поглощенного в дыхании O_2 (за вычетом компоненты остаточного дыхания) выражали в эквивалентах дыхательного субстрата (глюкозы). Согласно балансовому уравнению, поглощение 1 мг O_2 в дыхании эквивалентно окислению 0.937 мг глюкозы.

Статистическая обработка данных была проведена с использованием программы Statistica 10 ("StatSoft Inc.", США). Нормальность распределения данных оценивали с помощью критерия

Шапиро-Уилкса. Значимость различий между средними величинами измеряемых показателей оценивали с применением однофакторного дисперсионного анализа ANOVA, использовали критерий Дункана или непараметрический критерий Краскела—Уоллиса. Расчеты осуществляли при заданном уровне значимости $P \leq 0.05$. В таблицах и на рисунках приведены средние арифметические значения и их стандартные ошибки. Для оценки и визуализации возможных взаимосвязей между изменениями исследуемых показателей про-/антиоксидантного метаболизма и дыхания листьев в течение их жизненного цикла использовали анализ главных компонент (PCA). Перед процедурой анализа абсолютные значения подвергали ранжированию и приводили к одним относительным значениям. Количество главных компонент (PC) определяли, используя критерий Кайзера. При анализе были выбраны компоненты с собственными значениями более 1.5. Значимыми считали переменные (показатели) с факторной нагрузкой на компоненты выше 0.7.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Про-/антиоксидантный статус листьев

Судя по исследованным показателям, про-/антиоксидантный статус листьев *A. reptans* довольно сильно изменялся в онтогенезе. Формирующиеся в конце мая—июне розеточные листья новой генерации отличались от зрелых (июль) более высоким уровнем активности антиоксидантных ферментов, особенно SOD и CAT (табл. 1). Однако достоверных отличий между молодыми и зрелыми листьями по содержанию TBARS и H_2O_2 обнаружено не было. Перед перезимовкой (сентябрь) в зрелых листьях наблюдали существенное повышение активности SOD и CAT, в 2.7 и 1.5 раза соответственно. Активность APX увеличивалась в среднем на 40%. Зимой (декабрь), на

фоне сохранения повышенного уровня активности SOD и CAT, проявлялась тенденция к накоплению TBARS и H_2O_2 . Весной после перезимовки (апрель) содержание H_2O_2 увеличивалось почти вдвое, достигая максимальных значений за весь исследуемый период, тогда как содержание TBARS практически не изменялось. В то же время, отмечали значительное (в 2.3 раза) увеличение активности пероксидазы и существенное (в 1.7 раза) снижение активности CAT. Активность SOD сохранялась на высоком уровне. С началом активной вегетации (май) содержание H_2O_2 в перезимовавших листьях достоверно (в 1.7 раза) уменьшалось, а TBARS — почти не изменялось. Активность SOD и APX снижалась в среднем в 1.5 раза. У стареющих листьев (июнь) наблюдали значительное, более чем в 10 раз, уменьшение содержания H_2O_2 и снижение активности SOD. Активность APX практически не изменялась, а CAT повышалась в 1.5 раза.

Полученные данные свидетельствуют о снижении про-/антиоксидантного статуса листьев с возрастом и активации их про-/антиоксидантного метаболизма в связи с перезимовкой. После перезимовки проявлялась тенденция к накоплению продуктов ПОЛ и содержания H_2O_2 .

Изоферментный анализ SOD выявил наличие одной изоформы Mn-SOD, одной изоформы Fe-SOD и двух изоформ Cu/Zn-SOD у вновь формирующихся (июнь) и интенсивно растущих (июль) листьев (рис. 1а). В зрелых листьях, отобранных до (конец сентября) и во время (декабрь) перезимовки, а также сразу после схода снега (конец апреля) отмечали появление новой изоформы Cu/Zn-SOD. В перезимовавших (май) и стареющих (июнь) листьях качественный состав изоформ SOD был сопоставим с таковым молодых листьев. Согласно расчетам, минимальная активность идентифицированных изоформ SOD наблюдалась в июле, тогда как

Таблица 1. Динамика изменения показателей про-/антиоксидантного метаболизма листьев *Ajuga reptans*

Месяц	TBARS	H_2O_2	SOD	APX	CAT
VI	4.1 ± 1.0^c	0.59 ± 0.06^b	2.9 ± 0.1^c	1.8 ± 0.2^{abc}	26.2 ± 0.9^a
VII	4.9 ± 0.6^{abc}	0.44 ± 0.02^{ab}	1.8 ± 0.1^b	1.3 ± 0.2^a	18.2 ± 0.4^b
IX	4.5 ± 0.2^{ac}	0.35 ± 0.08^a	4.8 ± 0.4^a	1.8 ± 0.1^{bc}	27.8 ± 1.9^a
XII	6.2 ± 0.1^{ab}	0.56 ± 0.04^{ab}	4.9 ± 0.1^a	1.4 ± 0.1^{ab}	28.6 ± 3.1^a
IV*	6.7 ± 0.8^b	1.04 ± 0.01^d	4.6 ± 0.2^a	3.2 ± 0.4^d	16.8 ± 2.8^b
V*	6.3 ± 0.2^{ab}	0.61 ± 0.01^c	3.4 ± 0.1^d	2.0 ± 0.4^c	17.9 ± 1.2^b
VI*	5.8 ± 0.3^{abc}	0.05 ± 0.01^c	2.2 ± 0.1^b	1.6 ± 0.2^{abc}	27.1 ± 0.1^a

Примечание: содержание продуктов перекисного окисления липидов (TBARS) и H_2O_2 выражали в мкмоль/г сырой массы, активность супероксиддисмутазы (SOD) — в ед/мг белка, аскорбатпероксидазы (APX) — в мкмоль аскорбата/мг белка мин, каталазы (CAT) — в мкмоль H_2O_2 /мг белка мин. Символом “*” отмечены данные для перезимовавших листьев. Представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки. Разными латинскими буквами обозначены статистически значимые различия исследуемого показателя в течение года (ANOVA, критерий Дункана, $n = 8 - 9$, $P \leq 0.05$).

максимальная — до, в период и сразу после перезимовки (рис. 1а). Основной вклад (68%) в суммарную активность изоформ SOD вносили Cu/Zn-содержащие изоформы, относительная доля активности Mn-SOD составляла в среднем 26%, а на Fe-SOD приходилось не более 6%.

При анализе изоформ утилизирующих H_2O_2 ферментов в листьях *A. reptans* выявлены две изоформы APX и одна изоформа CAT (рис. 1б, в). Основной вклад в изменения суммарной активности APX вносила более подвижная изоформа — APX-2 (в среднем 60%). Относительная активность APX-2 была высокой в

молодых и перезимовавших листьях (рис. 1б). Динамика изменения относительной активности изоформы каталазы была сопоставима с изменениями общей активности фермента (рис. 1в).

Дыхание и соотношение дыхательных путей

Молодые розеточные листья *A. reptans* характеризовались высокой дыхательной активностью (табл. 2). С возрастом дыхание листьев снижалось, и у зрелых листьев перед перезимовкой скорость поглощения O_2 была на 40% ниже, чем у молодых активно растущих листьев.

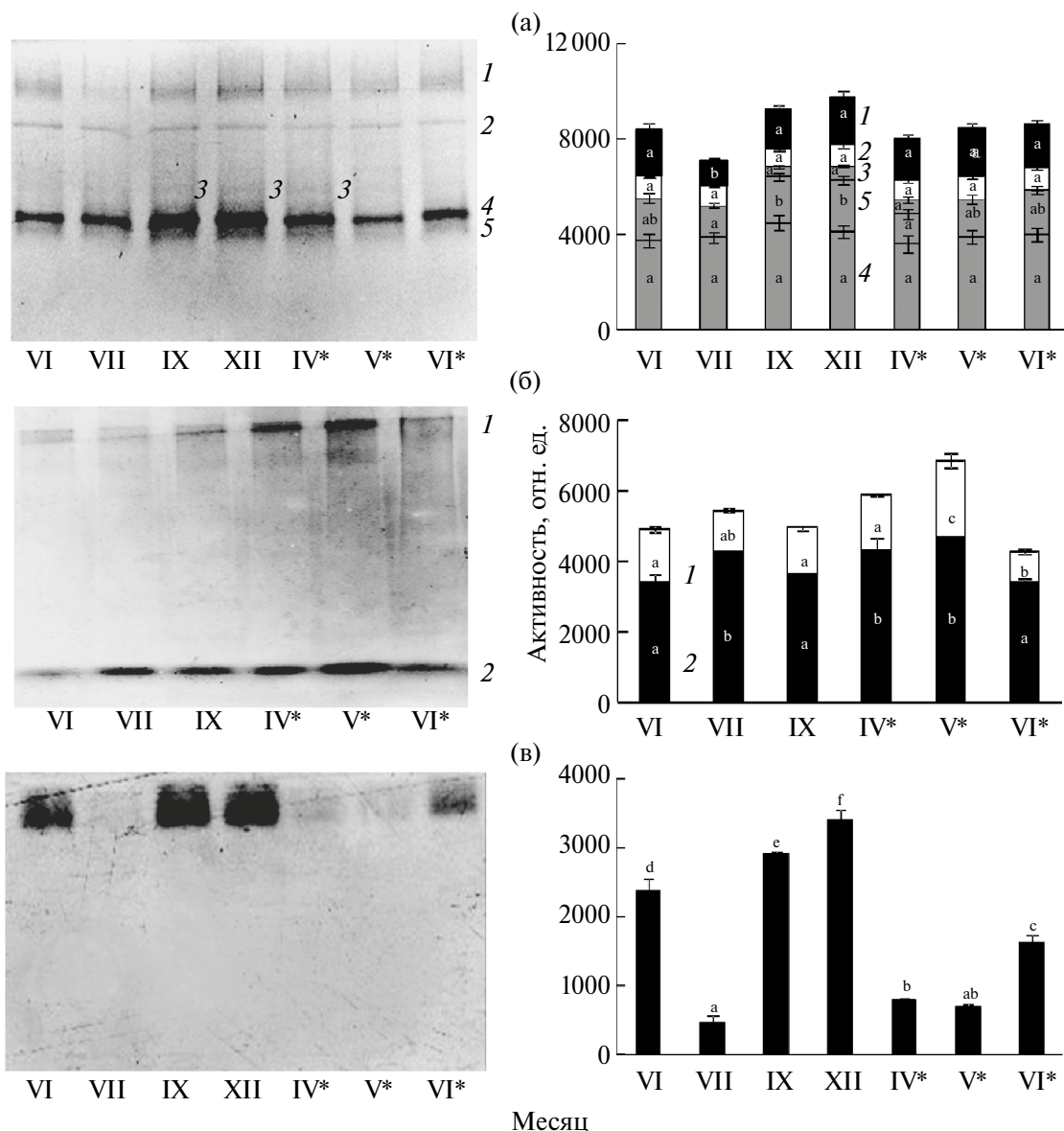


Рис. 1. Белковые профили изоформ супероксиддисмутазы (SOD) (а), аскорбатпероксидазы (APX) (б), каталазы (CAT) (в) (слева) и их относительная активность (справа) в разные периоды жизненного цикла листьев *Ajuga reptans*. Для SOD цифрами отмечены: 1 — Mn-содержащие изоформы (■), 2 — Fe-содержащие изоформы (□), 3–5 — Cu/Zn-содержащие изоформы (■). Для APX цифрами 1 и 2 отмечены изоформы APX-1 (□) и APX-2 (■) соответственно. Символом “*” отмечены данные для перезимовавших листьев. Представлены средние арифметические показатели относительной активности изоформ и их стандартные ошибки. Разные латинские буквы столбцов обозначают статистическую значимость различий между активностью изоформ ферментов в разные периоды жизненного цикла листьев (критерий Краскела-Уоллиса, $P < 0.05$, $n = 3-9$).

Скорость поглощения O_2 зимующих листьев (декабрь) была довольно низкой, в 1.5 ниже, чем до перезимовки. Однако сразу после схода снега и в весенний период отмечали заметное (в среднем на 30%) повышение дыхательной активности листьев. Дыхание стареющих листьев было более чем в 3 раза ниже по сравнению с формирующимися листьями новой генерации.

Результаты определения поглощения O_2 с применением ингибиторов позволили оценить способность дыхательных путей (табл. 2), их соотношение и вклад в общее дыхание (рис. 2). Скорость цитохромного пути (V_{cyt}) превышала скорость дыхания по альтернативному пути (V_{alt}) у молодых и зрелых листьев до перезимовки. Величина соотношения $V_{\text{cyt}}/V_{\text{alt}}$ увеличивалась по мере завершения роста листьев почти вдвое и достигала значения 2.8 у зрелых листьев в июле (табл. 2). Затем отмечали постепенное снижение этого показателя. Осенью (сентябрь) и в период перезимовки (декабрь) величина соотношения $V_{\text{cyt}}/V_{\text{alt}}$ была близка к 1 вследствие снижения активности V_{cyt} . При этом способность V_{alt} была высокой в молодых листьях на фоне максимальных значений V_{cyt} . В зрелых листьях (июль) активность V_{alt} снижалась почти вдвое и вновь усиливалась перед перезимовкой (сентябрь), когда скорость V_{cyt} уже была в 2.5 раза ниже по сравнению со значениями, отмеченными в летний период. Затем V_{alt} вновь снижалась и статистически значимо не изменялась вплоть до завершения жизненного цикла листьев. Активность ЦП возрастала почти в 2 раза после перезимовки, что приводило к повышению соотношения $V_{\text{cyt}}/V_{\text{alt}}$. В период старения листьев отмечали сильное, более чем в 3 раза, падение скорости V_{cyt} на фоне сохранения уровня активности V_{alt} . В результате величина соотношения $V_{\text{cyt}}/V_{\text{alt}}$ на завершающих этапах онтогенеза перезимовавших листьев снижалась до 0.6.

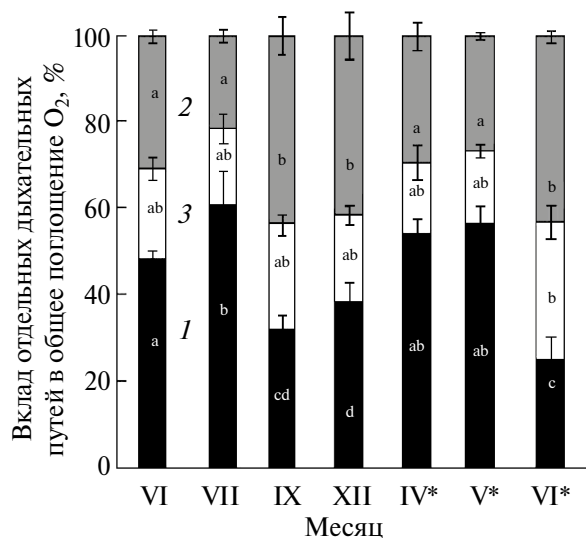


Рис. 2. Вклад дыхательных путей в общее поглощение O_2 листьями *Ajuga reptans* в разные периоды их жизненного цикла: 1 – цитохромное дыхание (■); 2 – альтернативное дыхание (■); 3 – остаточное дыхание (□). Символом “*” отмечены данные для перезимовавших листьев. Представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки. Разными латинскими буквами обозначены статистически значимые различия исследуемого показателя в течение жизненного цикла (ANOVA, критерий Дункана, $n = 5-10$, $P \leq 0.05$).

Вклад ЦП в общее поглощение O_2 был наибольшим (60%) у зрелых листьев и наименьшим (25%) у стареющих листьев (рис. 2). При этом доля ЦП в общем дыхании листьев в период перезимовки была достоверно ниже, чем после перезимовки. Вклад АП в дыхание зрелых листьев составлял 30%, после перезимовки был менее 20%. В период перезимовки и на конечных этапах жизненного цикла листьев доля АП в дыхании увеличивалась до 41–44%. Остаточное

Таблица 2. Изменения интенсивности общего дыхания и дыхательных путей (нмоль O_2 /г сухой массы мин) в листьях *Ajuga reptans*

Месяц	V_t	V_{cyt}	V_{alt}	V_{res}	$V_{\text{cyt}}/V_{\text{alt}}$
VI	2669 ± 98 ^f	1295 ± 46 ^d	820 ± 41 ^b	554 ± 69 ^e	1.6 ± 0.04 ^a
VII	1984 ± 239 ^e	1207 ± 160 ^d	425 ± 34 ^a	352 ± 69 ^{bcd}	2.8 ± 0.3 ^c
IX	1607 ± 103 ^{ad}	515 ± 55 ^c	702 ± 73 ^b	390 ± 36 ^{cd}	0.8 ± 0.1 ^b
XII	1013 ± 67 ^{bc}	391 ± 45 ^{bc}	420 ± 58 ^a	202 ± 24 ^a	1.0 ± 0.2 ^b
IV*	1403 ± 110 ^a	759 ± 52 ^a	410 ± 45 ^a	233 ± 58 ^{ab}	1.9 ± 0.1 ^a
V*	1290 ± 73 ^{ac}	729 ± 54 ^a	342 ± 12 ^a	219 ± 19 ^{ab}	2.1 ± 0.2 ^a
VI*	813 ± 60 ^b	206 ± 44 ^b	350 ± 11 ^a	257 ± 29 ^{abc}	0.6 ± 0.1 ^b

Примечание: V_t – общее дыхание, V_{cyt} – цитохромное дыхание, V_{alt} – альтернативное дыхание, V_{res} – немитохондриальное остаточное дыхание. Символом “*” отмечены данные для перезимовавших листьев. Представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки. Разными латинскими буквами обозначены статистически значимые различия исследуемого показателя в течение года (ANOVA, критерий Дункана, $n = 5-10$, $P \leq 0.05$).

дыхание, не подавляемое ингибиторами терминальных оксидаз митохондрий, составляло в среднем 20% и повышалось до 30% в период старения листьев.

Полученные результаты свидетельствуют о снижении скорости общего дыхания и дыхательных путей в онтогенезе листа. При этом соотношение дыхательных путей изменялось существенно. Перезимовка усиливала вовлечение АП, а возобновление жизнедеятельности растений после перезимовки было сопряжено с повышением активности ЦП листьев.

ОБСУЖДЕНИЕ

Нами выявлены закономерности изменения про-/антиоксидантного метаболизма и дыхания в онтогенезе зимующих розеточных листьев летне-зимне-зеленого травянистого многолетника *Ajuga reptans*. Судя по увеличению содержания в листьях TBARS и H_2O_2 , перезимовка индуцировала развитие окислительного стресса. Усиление ПОЛ мембран является универсальной реакцией растений на действие низких температур [25]. Накопление пероксида водорода потенциально опасно для клеток, так как в присутствии ионов металлов с переходной валентностью молекулы H_2O_2 служат источником гидроксильного радикала ($HO\cdot$) (реакция Хабера-Вайса). Вследствие высокой реакционной способности $HO\cdot$ способен инициировать различные цепные реакции, повреждая липиды, белки, нуклеиновые кислоты [5]. После перезимовки содержание TBARS и H_2O_2 постепенно стабилизировалось, возвращаясь к уровню, отмеченному у зрелых листьев до перезимовки. По-видимому, наблюдаемые изменения свидетельствуют не только о развитии окислительного стресса, но могут также отражать сигнальную функцию продуктов ПОЛ и H_2O_2 при адаптации к стрессу, вызванному перезимовкой [3]. Интересно отметить очень низкое содержание H_2O_2 (при сохранении сравнительно высокого уровня липопероксидации) в листьях на завершающих этапах жизненного цикла. Это может быть связано с их старением и присущими этому явлению изменениями метаболизма, о чем свидетельствует депрессия дыхания и изменение соотношения дыхательных путей во время старения (табл. 2, рис. 2).

Накопление АФК контролируется антиоксидантной системой клетки. Нами установлено, что молодые листья *A. reptans* характеризовались сравнительно высоким уровнем активности антиоксидантных ферментов, особенно SOD и CAT (табл. 1). Это важно для защиты фотосинтезирующих клеток от АФК в период формирования ФСА. Существенное повышение активности SOD, CAT и APX связано с перезимовкой.

Шоковое воздействие комплекса неблагоприятных факторов среды и, в первую очередь, низкие температуры приводят к развитию окислительного стресса, о чем свидетельствует повышение уровня ПОЛ и накопление H_2O_2 , особенно ранней весной сразу после схода снежного покрова. Активность SOD сохранялась на высоком уровне длительный период, начиная с осени (сентябрь) и до весны (апрель). Показано, что повышенная активность SOD обеспечивает растениям высокую устойчивость к низкотемпературному стрессу [25, 26]. SOD контролирует уровень супероксид-радикала путем его дисмутации до молекулярного кислорода и H_2O_2 [27]. В листьях *A. reptans* обнаружено пять изоформ SOD (Mn-SOD, Fe-SOD и три Cu/Zn-SOD). По данным литературы [4, 27] Mn-SOD локализуется в матриксе митохондрий и пероксисомах, Fe-SOD – в строме и мембранах тилакоидов хлоропластов, а Cu/Zn-SOD присутствует в хлоропластах, митохондриях, пероксисомах и апопласте. Увеличение общей активности SOD в листьях *A. reptans* было связано с повышением активности всех обнаруженных нами типов SOD, но основной вклад вносили Cu/Zn-содержащие изоформы. Появление дополнительной изоформы Cu/Zn-SOD в зимне-весенний период, по-видимому, направлено на торможение развития окислительного стресса. Существует мнение, что изменение активности и изоферментного состава Cu/Zn-SOD связаны с устойчивостью к множественным стрессам [28]. APX и CAT являются ферментами, нейтрализующими H_2O_2 в клетках растений [29]. Увеличение активности APX отмечали в весенний период, когда содержание H_2O_2 было максимальным. Как известно, изоформы APX присутствуют в строме и тилакоидной мембране хлоропластов, а также в пероксисомах и цитоплазме [29]. Нами идентифицированы две изоформы APX, основной вклад в общую активность вносила более подвижная, вероятно, цитозольная изоформа. Активность CAT была высокой в молодых и зрелых листьях непосредственно до и в период перезимовки. Значительное повышение активности CAT отмечали у стареющих листьев, что сопровождалось уменьшением содержания H_2O_2 . По данным литературы, этот фермент локализован преимущественно в пероксисомах, но обнаружен также в цитозоле и клеточной стенке [5, 29]. В листьях *A. reptans* CAT была представлена только одной изоформой, вероятно, пероксисомальной. Видимо, выявленные различия в динамике активности APX и CAT связаны с разным сродством ферментов к H_2O_2 . В совокупности полученные данные об уровне активности и изоферментном составе антиоксидантных ферментов свидетельствуют об адаптивном характере их изменений, направленных на торможение развития окисли-

тельного стресса и поддержание редокс-баланса клеток зимующих зелеными листьями.

Среди процессов, реализующих способность растений программировать метаболизм и энергетику клеток в соответствии с этапом онтогенетического развития и изменениями условий среды, ключевая роль принадлежит дыханию [30]. Подавляющая часть дыхания (60–70%) молодых интенсивно растущих растений (органов) связана с ростом, а у зрелых превалирует дыхание на поддержание структурной целостности и функциональной активности клеток и тканей. Выявлено, что динамика дыхания листьев *A. reptans* была обусловлена, главным образом, изменением активности энергетически эффективного ЦП (табл. 2, рис. 2). Это соответствует представлениям о том, что ЦП связан с функциональной составляющей дыхания роста, тогда как энергетически малоэффективный АП является компонентом дыхания поддержания [31]. Следует отметить, что молодые, быстро растущие листья *A. reptans* характеризовались сравнительно высокой способностью к АП. Сходные результаты были получены ранее для листьев зимне-зеленых растений бадана [32] и живучки [33]. Вероятно, это связано с участием АП в поддержании баланса между скоростью электронного транспорта и соотношением АТФ/АДФ, контролирующим активность основного цитохромного пути [34]. Кроме того, при высокой, свойственной молодым листьям скорости дыхания, вовлечение АП предотвращает перевосстановление пула убихинола — источника АФК в митохондриальной ЭТЦ [8].

Существенное повышение способности АП, о чем свидетельствует увеличение показателя V_{alt} , характеризующего скорость связанного с АП поглощения O_2 , отмечали у зрелых листьев *A. reptans* перед началом и в процессе перезимовки растений (табл. 2, рис. 2). Подавление основного цитохромоксидазного пути транспорта электронов на фоне повышения активности и вовлечения АП при действии пониженных температур отмечали и другие авторы [35]. Мы полагаем, что вовлечение АП осенью, когда низкие температуры тормозят процессы ассимиляции CO_2 , и во время перезимовки, связано с участием АП в совместном с антиоксидантной (табл. 1, рис. 1) и другими системами поддержании редокс-баланса клетки и сохранении ФСА при воздействии неблагоприятных условий среды. Ранее было отмечено повышение уровня дезоксидации пигментов виолаксантинового цикла и увеличение тепловой диссипации энергии, накопление антоцианов [2].

Растения *A. reptans* не имеют специализированных органов запасаания ассимилятов. Продукты фотосинтеза (преимущественно сахара) накапливаются в листьях розетки осенью, а после перезимовки используются на формиро-

вание цветоносов, соцветий и новой генерации листьев. Накопление углеводов способствует повышению морозостойкости [36]. Превращение гексоз в пируват и/или оксалоацетат и их метаболизация в ЦТК может влиять на активность дыхательных ферментов, в том числе АОХ, модулируя взаимопревращения связей тиол-дисульфид и взаимодействия серосодержащих аминокислот [37].

Хотя после схода снега перезимовывавшие листья *A. reptans* испытывали действие суточных перепадов температуры и высокой инсоляции вследствие еще несформированного лесного полога, активность АП снижалась на фоне повышения активности ЦП. Это можно объяснить потребностью клеток в АТФ для восстановления структурно-функциональной организации ФСА. О возможности доставки АТФ специфическими транспортерами из митохондрий в хлоропласты для репарации ФСА и восстановления крупных пигмент-белковых комплексов фотосистем свидетельствуют данные, приводимые в работе [38]. Восстановление функций ФСА и возобновление ассимиляции CO_2 перезимовывавших листьев, в свою очередь, увеличивает потребление энергии для экспорта ассимилятов в листья новой генерации. Как известно, до 50% дыхания зрелых листьев связано с обеспечением их донорной функции. В условиях высокого запроса на АТФ для транспорта ассимилятов из листа, высокая активность ЦП может поддерживать работу ФСА без вовлечения АОХ [11].

В стареющих листьях (июнь) отмечали значительное падение активности ЦП, тогда как способность V_{alt} практически не изменялась. В результате величина соотношения V_{cyt}/V_{alt} уменьшилась почти в 3 раза. Кроме того, увеличивался вклад в дыхание остаточного поглощения O_2 (V_{res}). Остаточное дыхание связывают с окислением органических соединений различными оксидазами и оксидоредуктазами в пероксисомах и на эндоплазматическом ретикулуме [39]. Ранее такое явление наблюдалось нами у стареющих листьев *Rubus chamaemorus*, увеличение V_{res} коррелировало с повышением активности полифенолоксидаз и пероксидаз [40]. Высокая активность АП и интенсивное остаточное дыхание в стареющих листьях способствуют снижению концентрации O_2 и уменьшению образования АФК, что, по нашему мнению, позволяет поддерживать метаболизм и обеспечить более полную реутилизацию органических веществ и минеральных элементов из завершающих свой жизненный цикл листьев.

Роль АП, как компонента антиоксидантной системы, давно обсуждается в научной литературе. Показано, что изменение уровня экспрессии генов АОХ влияет на содержание АФК в клетках, активность и содержание транс-

криптов генов компонентов антиоксидантной системы, особенно, при действии стресса [7, 9]. Мы не обнаружили статистически значимых корреляций между содержанием H_2O_2 и TBARS, активностью антиоксидантных ферментов и дыхательных путей в онтогенезе листьев *A. reptans*. Анализ главных компонент показал, что исследуемые показатели можно сгруппировать относительно двух осей (компонент), которые описывают 73% дисперсии данных (рис. 3). В первую компоненту (PC1) основную нагрузку вносили содержание H_2O_2 и активности антиоксидантных ферментов. Видно, что динамика содержания H_2O_2 имеет сильную положительную взаимосвязь с активностью APX и данные показатели обратно взаимосвязаны с активностью CAT. Полученные результаты отражают разные механизмы участия данных ферментов (APX восстанавливает H_2O_2 , используя в качестве донора e^- аскорбат, а CAT разлагает H_2O_2 на воду и молекулярный кислород) в контроле содержания пероксида водорода в тканях листьев. Вокруг второй компоненты (PC2) были сгруппированы изменения активностей ЦП и АП (V_{cyt} , V_{alt}) и содержания продуктов липопероксидации (TBARS). Изменение активности АП было положительно взаимосвязано с ЦП. Между активностью АП и содержанием TBARS существовала обратная взаимосвязь: с увеличением активности АП содержание продуктов ПОЛ уменьшалось. Это может свидетельствовать об участии АП в контроле содержания АФК и уровня окислительного стресса. Результаты факторного анализа указывают на более сложное, чем линейное, но тесное взаимодействие ферментов антиоксидантной системы и АП в поддержании про-/антиоксидантного баланса в клетках листьев на разных этапах развития растений, особенно в условиях стресса. Вполне вероятно, что тесная взаимосвязь основного энергетически эффективного ЦП с энергодиссипирующим АП необходима для обеспечения соответствия энергетической эффективности использования дыхательного субстрата (ЭЭД) потребностям растения в энергии. Другими словами, ЭЭД, которую можно оценить по величине коэффициента $Y_{\text{АТФ/глюкоза}}$, падает при снижении потребления энергии. Согласно расчетам Amthor [12], выход АТФ при полном окислении 1 моля глюкозы ($Y_{\text{АТФ/глюкоза}}$) в дыхании по основному (цитохромному) пути составляет 29 молей (ранее считалось 36 молей), а при АП – 11 молей. Мы использовали эту информацию для оценки ЭЭД листьев. Расчеты показали, что величина $Y_{\text{АТФ/глюкоза}}$ с учетом вовлечения АП в дыхание листьев до перезимовки *A. reptans* составляла около 24, в период перезимовки снижалась на 15–20% и вновь возрастала после возобнове-

ния вегетации растений (рис. 4). Безусловно, важно учитывать, что общее поглощение O_2 измеряли при стандартной температуре 20°C, а применение ингибиторов позволяет оценить потенциальную способность дыхательных путей, которая может отличаться от реальной. Тем не менее, полученные величины отражают общие закономерности изменения ЭЭД в онтогенезе листьев, подвергнувшихся стрессовому воздействию условий среды во время перезимовки. Наблюдаемое снижение величины $Y_{\text{АТФ/глюкоза}}$ в период, связанный с перезимовкой (конец сентября–декабрь) и на завершающих этапах онтогенеза стареющих листьев, оказалось не столь значительным, как ожидалось, и, скорее всего, было обусловлено перестройкой метаболизма. Это согласуется с идеей о стремлении живой клетки к максимально возможной ЭЭД [6].

Таким образом, нами впервые на примере *A. reptans* выявлены закономерности онтогенетических и адаптивных изменений про-/антиоксидантного статуса и дыхания зимующих листьев травянистых растений. Получены данные

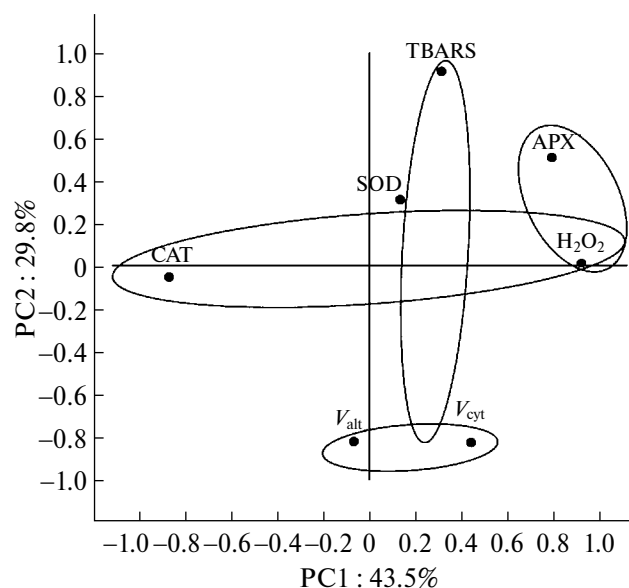


Рис. 3. Взаимосвязь показателей про-/антиоксидантного метаболизма и дыхания в листьях *Ajuga reptans* в течение их жизненного цикла: TBARS – содержание продуктов перекисного окисления липидов; SOD, APX, CAT – активность супероксиддисмутазы, аскорбатпероксидазы и каталазы соответственно; V_{cyt} и V_{alt} – способность цитохромного и альтернативного дыхательных путей. Сплошной линией объединены взаимосвязанные показатели, вносящие основную нагрузку в компоненту 1 (PC1) и/или компоненту 2 (PC2). Результаты получены с применением анализа главных компонент. Распределение показателей между двумя компонентами (осями) обосновано высокой долей суммарной дисперсии переменных (73.3%), которую они описывают.

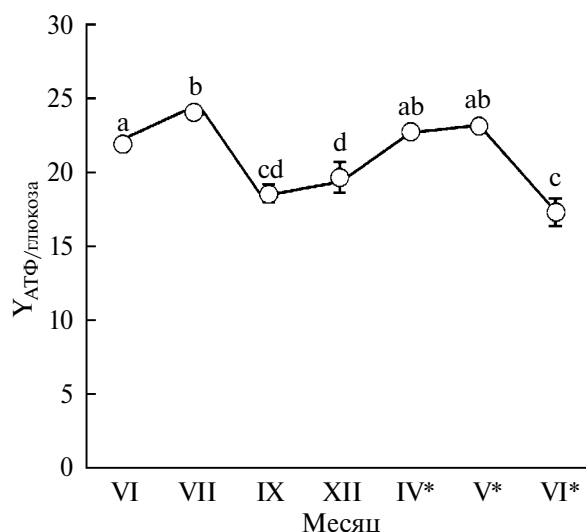


Рис. 4. Изменение энергетической эффективности дыхания (моль АТФ/моль глюкозы) листьев *Ajuga reptans* в течение их жизненного цикла. Символом “*” отмечены данные для перезимовавших листьев. Представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки. Разными латинскими буквами обозначены статистически значимые различия исследуемого показателя в течение года (ANOVA, критерий Дункана, $n = 5-10$, $P \leq 0.05$).

об участии антиоксидантных ферментов и их изоформ в поддержании приемлемого уровня липопероксидации и H_2O_2 в норме и при стрессе, связанном с перезимовкой. Результаты анализа главных компонент указывают на наличие тесных и нелинейных взаимосвязей между показателями про-/антиоксидантного метаболизма и дыхания в онтогенезе зимующих листьев. Изменение соотношения дыхательных путей является неотъемлемым условием успешной перезимовки растений, вовлечение АП способствует торможению развития окислительного стресса, поддержанию редокс-баланса и соответствия уровня ЭЭД потребностям растения. Можно полагать, что связанное с перезимовкой незначительное снижение ЭЭД необходимо для поддержания гомеостаза при перестройке метаболизма. Повышение скорости энергетически эффективного ЦП после перезимовки имеет адаптивное значение для восстановления структурной целостности ФСА и возобновления функциональной активности листьев. В совокупности полученные данные о функционировании антиоксидантной системы и дыхания существенно дополняют и углубляют представления о защитных и адаптивных механизмах травянистых растений, зимующих с зелеными листьями.

Работа выполнена в рамках темы госбюджетных НИОКТР “Фотосинтез, дыхание и биоэнергетика растений и фототрофных организмов

(физиолого-биохимические, молекулярно-генетические и экологические аспекты)”, рег. № 122040600021-4.

Авторы благодарят д.б.н. О.В. Дымову за помощь в отборе образцов и полезные замечания.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dymova O., Khristin M., Miszalski Z., Kornas A., Strzalka K., Golovko T. Seasonal variations of leaf chlorophyll–protein complexes in the wintergreen herbaceous plant *Ajuga reptans* L. // *Funct. Plant Biol.* 2018. V. 45. P. 519. <https://doi.org/10.1071/FP17199>
2. Dymova O.V., Zakhozhiy I.G., Golovko T.K. Age and adaptive changes in the photosynthetic apparatus of leaves in winter green herbaceous plant *Ajuga reptans* L. in the natural conditions of the taiga zone // *Russ. J. Plant Physiol.* 2023. V. 70:114. <https://doi.org/10.1134/S1021443723601325>
3. Mittler R., Zandalinas S.I., Fichman Y., Van Breusegem F. Reactive oxygen species signalling in plant stress responses // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2022. V. 23. P. 663. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00499-2>
4. Sachdev S., Ansari S.A., Ansari M.I., Fujita M., Hasanuzzaman M. Abiotic stress and reactive oxygen species: generation, signaling, and defense mechanisms // *Antioxidants.* 2021. V. 10. P. 277. <https://doi.org/10.3390/antiox10020277>
5. Hasanuzzaman M., Bhuyan M.H.M.B., Zulfiqar F., Raza A., Mohsin S.M., Mahmud J.A., Fujita M., Fotopoulos V. Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: revisiting the crucial role of a universal defense regulator // *Antioxidants.* 2020. V. 9. P. 681. <https://doi.org/10.3390/antiox9080681>
6. Golovko T.K., Garmash E.V. Plant respiration: classical and current notions // *Russ. J. Plant Physiol.* 2022. V. 69. P. 108. <https://doi.org/10.1134/S1021443722060073>
7. Vishwakarma A., Tetali S., Selinski J., Scheibe R., Padmasree K. Importance of the alternative oxidase (AOX) pathway in regulating cellular redox and ROS homeostasis to optimize photosynthesis during restriction of the cytochrome oxidase pathway in *Arabidopsis thaliana* // *Ann. Bot.* 2015. V. 116. P. 555. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv122>
8. Van Aken O. Mitochondrial redox systems as central hubs in plant metabolism and signalling // *Plant Physiol.* 2021. V. 186. P. 36. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab101>

9. Garmash E.V. Suppression of mitochondrial alternative oxidase can result in upregulation of the ROS scavenging network: some possible mechanisms underlying the compensation effect // *Plant Biol.* 2022. V. 25. P. 43.
<https://doi.org/10.1111/plb.13477>
10. Garmash E.V. Mitochondrial respiration of the photosynthesizing cell // *Russ. J. Plant Physiol.* 2016. V. 63. P. 13.
<https://doi.org/10.1134/S1021443715060072>
11. Vanlerberghe G.C., Dahal K., Alber N.A., Chadee A. Photosynthesis, respiration and growth: a carbon and energy balancing act for alternative oxidase // *Mitochondrion.* 2020. V. 52. P. 197.
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.04.001>
12. Amthor J.S. The McCree–de Wit–Penning de Vries–Thornley respiration paradigms: 30 years later // *Ann. Bot.* 2000. V. 86. P. 1.
<https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1175>
13. McDonald A.E., Vanlerberghe G.C. Origins, evolutionary history, and taxonomic distribution of alternative oxidase and plastoquinol terminal oxidase // *Comp. Biochem. Physiol. Part D. Genomics Proteomics.* 2006. V. 1. P. 357.
<https://doi.org/10.1016/j.cbd.2006.08.001>
14. Дымова О.В., Головки Т.К. Морфофизиологические аспекты вегетативного размножения *Ajuga reptans* L. // Репродуктивная биология растений. Сыктывкар: Коми НЦ УрО РАН. 1998. С. 72.
15. 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.
[https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
16. Vetoshkina D.V., Pozdnyakova-Filatova I.Yu., Zhurikova E.M., Frolova A.A., Naydov I.A., Ivanov B.N., Borisova-Mubarakshina M.M. The increase in adaptive capacity to high illumination of barley plants colonized by rhizobacteria *P. putida* BS3701 // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2019. V. 55. P.173.
<https://doi.org/10.1134/S0003683819020133>
17. Malyshev R.V., Silina E.V. Luminometer: principle of operation, device, and recommendations for assembly // *Instrum. Exp. Tech.* 2023. V. 66. P. 476.
18. Beauchamp C., Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // *Anal. Biochem.* 1971. V. 44. P. 276.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)
19. Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts // *Plant Cell Physiol.* 1981. V. 22. P. 867.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>
20. Aebi H. Catalase *in vitro* // *Methods Enzymol.* 1984. V. 105. P. 121.
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
21. 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.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
22. Miszalski Z., Slesak I., Niewiadomska E., Baczek-Kwinta R., Luttge U., Ratajczak R. Subcellular localization and stress responses of superoxide dismutase isoforms from leaves in the C₃-CAM intermediate halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* L. // *Plant Cell Environ.* 1998. V. 21. P. 169.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00266.x>
23. Mittler R., Zilinskas B.A. Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium // *Anal. Biochem.* 1993. V. 212. P. 540.
<https://doi.org/10.1006/abio.1993.1366>
24. Pezzoni M., Pizarro R.A., Costa C.S. Detection of catalase activity by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in cell extracts from *Pseudomonas aeruginosa* // *Bio-protoc.* 2018. V. 8:e2869.
<https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2869>
25. Ding Y., Wang X.-T., Wang F., Shao Y.-L., Zhang A.-M., Chang W. The effects of chilling stress on antioxidant enzymes activities and proline, malondialdehyde, soluble sugar contents in three *Paphiopedilum* species // *Russ. J. Plant Physiol.* 2023. V. 70. P. 61.
<https://doi.org/10.1134/S1021443722603184>
26. Lee D.H., Lee C.B. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays // *Plant Sci.* 2000. V. 159. P. 75.
[https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00326-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00326-5)
27. Gill S.S., Anjum N.A., Gill R., Yadav S., Hasanuzzaman M., Fujita M., Mishra P., Sabat S.C., Tuteja N. Superoxide dismutase – mentor of abiotic stress tolerance in crop plants // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2015. V. 22. P. 10375.
<https://doi.org/10.1007/s11356-015-4532-5>
28. Santa-Cruz D.M., Pacienza N.A., Zilli C.G., Tomaro M.L., Balestrasse K.B., Yannarelli G.G. Nitric oxide induces specific isoforms of antioxidant enzymes in soybean leaves subjected to enhanced ultraviolet-B radiation // *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 2014. V. 141. P. 202.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.09.019>
29. Anjum N.A., Sharma P., Gill S.S., Hasanuzzaman M., Khan E.A., Kachhap K., Mohamed A.A., Thangavel P., Devi G.D., Vasudhevan P., Sofo A., Khan N.A., Misra A.N., Lukatkin A.S., Singh H.P. et al. Catalase and ascorbate peroxidase – representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2016. V. 23. P. 19002.
<https://doi.org/10.1007/s11356-016-7309-6>
30. Головки Т.К. Дыхание растений (физиологические аспекты). СПб: Наука, 1999. 204 с.
31. Florez-Sarasa I.D., Bouma T.J., Medrano H., Azcon-Bieto J., Ribas-Carbo M. Contribution of the cytochrome and alternative pathways to growth respiration and maintenance respiration in *Arabidopsis thaliana* // *Physiol. Plantarum.* 2007. V. 129. P. 143.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00796.x>
32. Ivanova T.I., Kirpichnikova O.V., Sherstneva O.A., Yudin O.S. Annual cycle of respiration in the leaves of

- evergreen plants // Russ. J. Plant Physiol. 1998. V. 45. P. 906.
33. Golovko T.K., Pystina N.V. The alternative respiration pathway in leaves of *Rhodiola rosea* and *Ajuga reptans*: presumable physiological role // Russ. J. Plant Physiol. 2001. V. 48. P. 733.
<https://doi.org/10.1023/A:1012596122292>
34. Millenaar F.F., Lambers H. The alternative oxidase: *in vivo* regulation and function // Plant Biol. 2003. V. 5. P. 2.
<https://doi.org/10.1055/s-2003-37974>
35. Grabelnykh O.I., Borovik O.A., Tauson E.L., Pobezhimova T.P., Katyshev A.I., Pavlovskaya N.S., Koroleva N.A., Lyubushkina I.V., Borovskii G.B., Voinikov V.K., Bashmakov V.Yu., Popov V.N. Mitochondrial energy-dissipating systems (alternative oxidase, uncoupling proteins, and external NADH dehydrogenase) are involved in development of frost-resistance of winter wheat seedlings // Biochemistry (Moscow). 2014. V. 79. P. 506.
<https://doi.org/10.1134/S0006297914060030>
36. Seydel C., Kitashova A., Fürtauer L., Nägele T. Temperature-induced dynamics of plant carbohydrate metabolism // Physiol. Plant. 2022. V. 174. P. 13602.
<https://doi.org/10.1111/ppl.13602>
37. Plaxton W.C., Podestá F.E. The functional organization and control of plant respiration // Crit. Rev. Plant Sci. 2006. V. 25. P. 159.
<https://doi.org/10.1080/07352680600563876>
38. Li L., Nelson C.J., Trösch J., Castleden I., Huang S., Millar A.H. Protein degradation rate in *Arabidopsis thaliana* leaf growth and development // Plant Cell. 2017. V. 29. P. 207.
<https://doi.org/10.1105/tpc.16.00768>
39. Shugaeva N.A., Vyskrebentseva E.I., Orekhova S.O., Shugaev A.G. Effect of water deficit on respiration of conducting bundles in leaf petioles of sugar beet // Russ. J. Plant Physiol. 2007. V. 54. P. 329.
<https://doi.org/10.1134/S1021443707030065>
40. Shelyakin M.A., Zakhochiy I.G., Golovko T.K. Ontogenetic aspects of plant respiration (by the example of *Rubus chamaemorus* L.) // Russ. J. Plant Physiol. 2016. V. 63. P. 92.
<https://doi.org/10.1134/S1021443716010167>