

УДК 581.1

## ВЛИЯНИЕ КРАТКОВРЕМЕННЫХ ЕЖЕСУТОЧНЫХ ПОНИЖЕНИЙ ТЕМПЕРАТУРЫ НА АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ЛИСТЬЯХ ОГУРЦА РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Т. Г. Шибаетова, Е. Г. Шерудило, Е. Н. Икконен, А. Ф. Титов

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Изучали влияние кратковременного (2 ч в конце ночного периода) ежесуточного понижения температуры до 12 °С (ДРОП-воздействие) на активность антиоксидантных (АО) ферментов в листьях огурца (*Cucumis sativus* L.) разного возраста. Действию ДРОП в течение 6 суток подвергали растения, находящиеся в фазе активно растущего второго листа (ДРОП 1) и заканчивающего рост зрелого второго листа (ДРОП 2). Растения варианта ДРОП 3 подвергались ДРОП-воздействию в течение 12 суток, в период от фазы активного роста до фазы зрелого состояния второго листа.

Воздействие ДРОП на зрелые листья (ДРОП 2) не вызывало изменений в активности АО-ферментов и интенсивности перекисного окисления липидов, оцениваемого по содержанию малонового диальдегида (МДА). Под влиянием ДРОП на растущие листья (ДРОП 1 и ДРОП 3) отмечено снижение активности супероксиддисмутазы и аскорбатпероксидазы и кратковременное повышение с последующим снижением активности каталазы и гваякол-зависимой пероксидазы. Увеличение холодоустойчивости листьев относительно контроля наблюдали во всех трех вариантах опыта. Таким образом, установлено, что ежесуточные кратковременные понижения температуры (ДРОП) до закалывающих значений вызывают изменение активности АО ферментов в активно растущих листьях, но не влияют на активность этих ферментов в зрелых листьях. Изменения активности изученных ферментов при этом не коррелируют с изменениями холодоустойчивости. По-видимому, механизм повышения устойчивости растений к низким закалывающим температурам, основанный на увеличении антиоксидантной активности, описанный для теплолюбивых видов, не участвует в реакциях растений огурца на ДРОП-воздействия, а наблюдаемое в этом случае повышение холодоустойчивости обусловлено иными механизмами. Разный отклик зрелых и растущих листьев на ДРОП указывает на то, что индукция защитно-приспособительных реакций растений на кратковременные неблагоприятные температурные воздействия зависит от возраста листа.

Ключевые слова: *Cucumis sativus* L.; низкая температура; ДРОП-воздействия; антиоксидантная активность; холодоустойчивость.

**T. G. Shibaeva, E. G. Sherudilo, E. N. Ikkonen, A. F. Titov. THE EFFECT OF A DAILY SHORT-TERM TEMPERATURE DROP ON THE ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES IN CUCUMBER LEAVES OF VARIOUS AGES**

We studied the effect of short-term (2 hours at the end of the night) daily temperature reductions to 12 °С (DROP treatment) on the activity of antioxidant (AO) enzymes in cucumber (*Cucumis sativus* L.) leaves of various ages. Plants were DROP-treated for 6 days

during the exponential growth of the second true leaf (DROP 1) or when the second leaf was mature (DROP 2). DROP 3 plants were DROP-treated for 12 days during the DROP 1+DROP 2 period.

In mature leaves (DROP 2) DROP treatment did not cause any changes in the activity of AO enzymes or lipid peroxidation rates, as estimated by the content of malondialdehyde (MDA). In young leaves (DROP 1 and DROP 3) DROP treatment reduced the activity of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase and induced a short-term increase followed by a decrease in the activity of catalase and guaiacol-dependent peroxidase. Chilling tolerance was higher in all DROP-treated plants compared to untreated plants. Thus, we found that a daily short-term temperature drop (DROP) modified the activity of AO enzymes in young leaves, but did not affect the activity of the studied enzymes in mature leaves. Changes in the activity of AO enzymes did not correlate with changes in chilling tolerance. Apparently, the increased antioxidant activity in low temperature-treated plants described in the literature for chilling-sensitive species is not involved in cucumber response to temperature DROP, and some other mechanism is responsible for the higher chilling tolerance in DROP-treated plants. The differential response of young and mature leaves points to some developmental controls in the induction of plant adaptations to short-term chilling.

**Key words:** *Cucumis sativus* L.; low temperature; DROP treatment; antioxidant activity; chilling tolerance.

## Введение

Одно из основных различий между чувствительными и устойчивыми к холоду растениями заключается в способности последних уменьшать повреждающее действие холода и индуцированное охлаждением образование активных форм кислорода благодаря повышению активности ферментов антиоксидантной системы [Zhang et al., 1995]. Показано, что изменения активности антиоксидантных (АО) ферментов при охлаждении теплолюбивых растений имеют сходный характер и выражаются в резком спаде активности в начальный момент холодового воздействия и ее постепенном возрастании при удлинении периода охлаждения [Лукаткин, 2002]. Предположительно, эти изменения носят защитный характер и направлены на снятие окислительного стресса и тем самым предотвращение холодового повреждения.

Ранее было показано, что применение ДРОП-обработок (ежесуточного понижения температуры на 2 ч в конце ночного периода до 12 °С; от англ. *drop* – падение) приводит к повышению холодоустойчивости растений огурца [Марковская и др., 2008]. Также на растениях огурца была показана связь между холодоустойчивостью и активностью АО ферментов [Omran, 1980; Shen et al., 1999]. Однако анализ литературы показывает, что большинство данных для растений этого вида были получены с использованием повреждающих температур (2–5 °С) [Shen et al., 1999; Лукаткин, 2002; Kuk, Shin, 2007]. Поэтому остается не вполне ясным, как изменяется активность АО ферментов при

кратковременном действии на растения низких закаливающих температур.

Известно, что степень развития листа значительно влияет на его способность адаптироваться к условиям окружающей среды, в том числе к температуре. В последние годы широко обсуждается вопрос о разных откликах зрелых и незрелых тканей листьев теплолюбивых растений на изменения температуры [Armstrong et al., 2006; Atkin et al., 2006; Campbell, 2007; Zhang et al., 2014], однако литературные данные относительно того, молодые или зрелые листья обладают большей способностью к температурной адаптации, носят противоречивый характер.

В связи с этим целью данной работы было изучить влияние ежесуточных кратковременных снижений температуры (ДРОП) до закаливающих значений на активность АО ферментов и оценить, влияет ли возраст листьев на их чувствительность к данному типу воздействий.

## Материалы и методы

Растения огурца (*Cucumis sativus* L., гибрид Зозуля) выращивали в камере искусственного климата (Vötsch, Германия) на песчаном субстрате при поливе полным питательным раствором (рН 6,2–6,4), температуре воздуха 23 °С, фотосинтетически активной радиации 150 мкмоль/(м<sup>2</sup>·с), фотопериоде 12 ч, влажности воздуха 60–70 %.

Часть растений подвергали 2-часовому действию температуры 12 °С в конце ночи (ДРОП-воздействие) в течение 6 суток в период с 12-х по 17-е сутки после замачивания

семян – развернувшийся второй настоящий лист в это время находился в фазе активного роста и достигал 60–70 % от окончательной площади (вариант ДРОП 1). Другая часть растений подвергалась ДРОП-воздействиям в период с 18-х по 23-е сутки, когда второй лист находился уже в зрелом состоянии, заканчивая рост (вариант ДРОП 2). Третья часть растений подвергалась ДРОП-воздействиям в течение 12 суток в период с 12-х по 23-е сутки; за это время развернувшийся второй лист достигал своих окончательных размеров (вариант ДРОП 3). Контролем служили растения, не подвергавшиеся низкотемпературным воздействиям.

Биомассу растений и площадь листьев измеряли на 24-е сутки после замачивания семян, а определение параметров флуоресценции хлорофилла, активности АО ферментов, содержания МДА и холодоустойчивости листьев проводили на 18-е и 24-е сутки.

Площадь листовых пластин определяли с помощью программы AreaS 2.1 (автор Пермяков А. Н.) [Пермяков и др.].

Для измерений параметров флуоресценции хлорофилла использовали анализатор фотосинтеза с импульсно-модулированным освещением (MINI-PAM, Walz, Германия). Потенциальный квантовый выход фотохимической активности ФС II ( $F_v / F_m$ ) определяли после 20-минутной темновой адаптации листьев.

Холодоустойчивость клеток листа оценивали по температуре ( $LT_{50}$ ), вызывающей гибель 50 % палисадных клеток листовых высевок после их 5-минутного промораживания в термоэлектрическом термостате ТЖР («Интерм», Россия) при последовательном изменении температур с шагом 0,4 °С [Дроздов и др., 1976]. Жизнеспособность клеток определяли с помощью светового микроскопа Микмед-2 (ЛОМО, Россия) по коагуляции цитоплазмы и деструкции хлоропластов.

Анализировали активность супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.1.5.1.1), каталазы (КАТ, КФ 1.11.1.6), аскорбатпероксидазы (АПО, КФ 1.11.1.11) и гваякол-зависимой пероксидазы (ПО, КФ 1.11.1.7). Листья гомогенизировали в 50 мМ фосфатном буфере (рН 7,8). Гомогенат центрифугировали при 15 000 г в течение 10 мин при 4 °С; в супернатанте определяли активность ферментов. Активность АПО определяли спектрофотометрически в присутствии 0,5 мМ аскорбиновой кислоты и 0,5 мМ  $H_2O_2$  по снижению оптической плотности при 290 нм [Nakano, Asada, 1981]. Активность КАТ определяли по ферментативному разложению  $H_2O_2$  при 240 нм [Beers, Sizer, 1952]; активность

СОД – по способности ингибировать фотохимическую реакцию тетразолия нитросинего [Giannopolitis, Ries, 1977]. Анализ гваякол-зависимой ПО основывался на окислении гваякола в присутствии  $H_2O_2$  [Srivastava, van Huystee, 1977]. Реакционная среда содержала 2,5 мл 50 мМ калий-фосфатного буфера (рН 6,1), 1 мл 1%  $H_2O_2$ , 1 мл 1% гваякола и 10 мкл ферментативного препарата. Измеряли оптическую плотность при 420 нм. Активность ферментов рассчитывали на 1 г сухой массы листьев, а удельную активность – на 1 мг белка. Общее содержание белка определяли методом Бредфорда [Bradford, 1976].

Содержание малонового диальдегида (МДА) определяли по Heath, Parker [1968]. Листья растирали в 2 мл 20% трихлоруксусной кислоте (ТХУ). Гомогенат центрифугировали при 15 000 г в течение 10 мин; 1 мл надосадочной жидкости смешивали с 1 мл 20% ТХУ, содержавшей 0,5 % тиобарбитуровой кислоты (ТБК). Смесь нагревали в течение 30 мин при 95 °С и затем центрифугировали 5 мин при 10 000 г. Концентрацию МДА определяли спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность при 532 нм и неспецифичное поглощение при 600 нм. Для расчета содержания МДА использовали коэффициент экстинкции, равный 155/(мм см). Концентрацию МДА выражали в мкмоль/г сухой массы листьев.

Опыт повторяли дважды. На рисунках и в таблице представлены средние значения и их стандартные ошибки ( $n \geq 6$ ). В таблице представлены относительные (к контролю) данные, рассчитанные по средним арифметическим значениям, полученным при измерении активности ферментов в не менее трех биологических и аналитических повторностях. Достоверность различий между средними определена на основе LSD теста при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## Результаты

Действие ДРОП в течение 6 суток на растения в первом (ДРОП 1) и во втором (ДРОП 2) вариантах опыта не оказало значительного влияния на накопление их биомассы и площадь листьев, тогда как растения, листья которых подвергались действию ДРОП в течение всего периода роста листа (ДРОП 3), имели меньшие сухой вес и площадь листьев по сравнению с растениями других вариантов опыта (рис. 1, А, Б).

Значения максимального квантового выхода фотохимической активности ФС II ( $F_v / F_m$ ) в вариантах ДРОП 1 и ДРОП 3 были ниже, чем

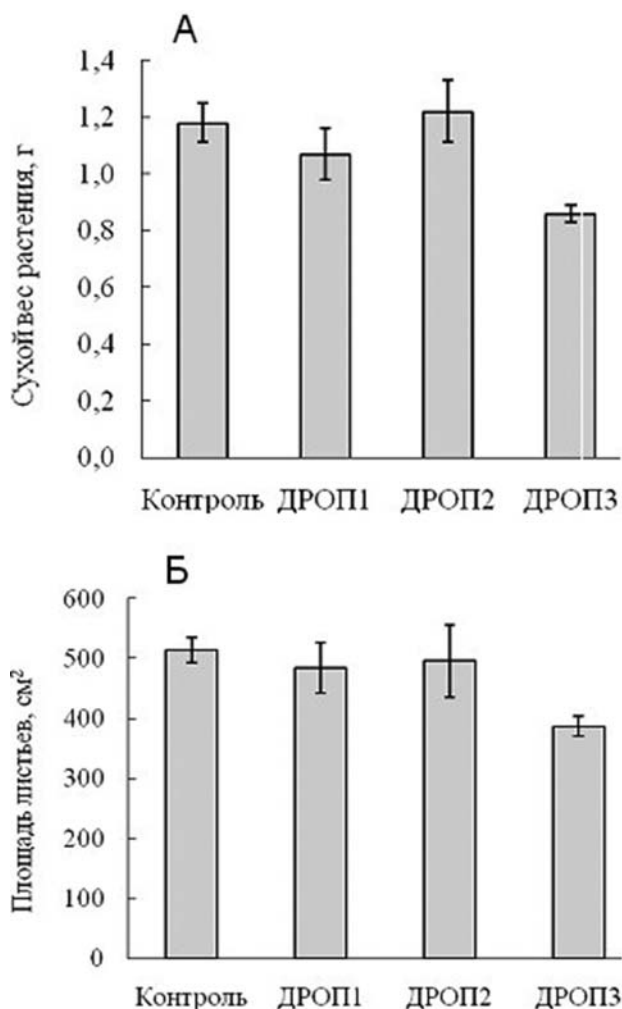


Рис. 1. Влияние ДРОП на сухой вес (А) и площадь листьев (Б) растений огурца (*Cucumis sativus* L.)

у контрольных растений, но во всех вариантах опыта они превышали  $0,8 \pm 0,05$  (рис. 2). Последнее указывает на высокую эффективность использования энергии в фотохимических процессах [Bolhär-Nordenkampf et al., 1989] и отсутствие стрессового воздействия на фотосинтетический аппарат растений.

У клеток листьев растений в варианте ДРОП 2 по окончании ДРОП-воздействия (24 сут) наблюдалось значительное (на  $1,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) повышение устойчивости к 5-минутному промораживанию (рис. 3), что согласуется с полученными ранее результатами [Sysoeva et al., 2005; Марковская и др., 2008]. Холодоустойчивость активно растущих листьев (ДРОП 1), измеренная по окончании ДРОП-воздействий (18 сут), также увеличилась, хотя и в значительно меньшей степени (на  $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Однако по мере дальнейшего роста листьев уже в оптимальных условиях их холодоустойчивость продолжала возрастать и по достижении листом зрелого состояния (24 сут) достигла уровня

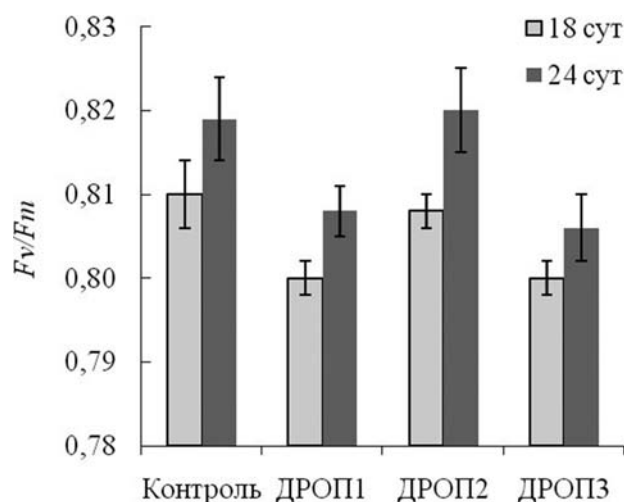


Рис. 2. Влияние ДРОП на максимальный квантовый выход фотохимической активности ФС II ( $F_v/F_m$ ) в листьях огурца (*Cucumis sativus* L.).

Здесь и далее: на 18-е сут измерения проводили на молодых листьях, испытывавших ДРОП-воздействия в предыдущие 6 сут в вариантах ДРОП 1 и ДРОП 3 и не подвергавшихся ДРОП-воздействиям в вариантах Контроль и ДРОП 2. На 24-е сут измерения проводили на зрелых листьях в последствии ДРОП (через 6 сут) в варианте ДРОП 1 и по окончании ДРОП-воздействия в вариантах ДРОП 2 и ДРОП 3.

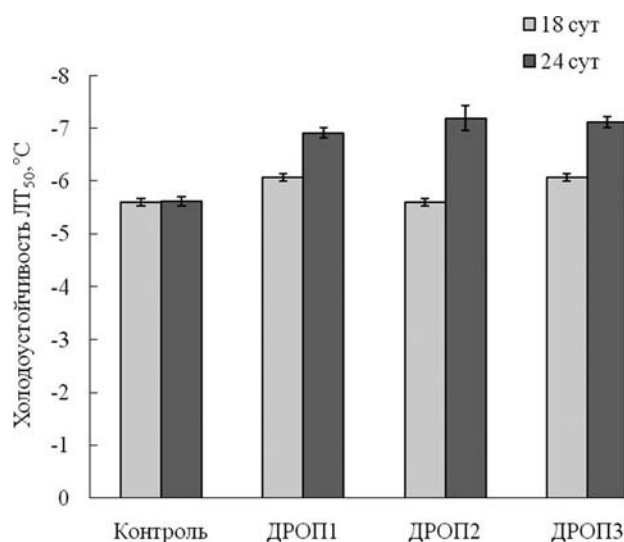


Рис. 3. Влияние ДРОП на холодоустойчивость листьев огурца (*Cucumis sativus* L.) на 18-е и 24-е сут

устойчивости растений в варианте ДРОП 2. ДРОП-воздействие в течение всего периода роста листьев (вариант ДРОП 3) индуцировало постепенное повышение холодоустойчивости до уровня, зафиксированного в варианте ДРОП 2 (см. рис. 3).

Интересно, что в листьях варианта ДРОП 2 не отмечено достоверных изменений активности антиоксидантных ферментов и интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ), определяемого по накоплению реагирующих с ТБК соединений (МДА) (табл.).

Влияние ДРОП на активность каталазы (КАТ), супероксиддисмутазы (СОД), аскорбатпероксидазы (АПО), гваякол-пероксидазы (ПО), содержание малонового диальдегида (МДА) в листьях растений огурца (*Cucumis sativus* L.) (% от контроля)

Вариант	Активность фермента								Содержание МДА	
	КАТ		СОД		АПО		ПО		18 сут	24 сут
	18 сут	24 сут	18 сут	24 сут	18 сут	24 сут	18 сут	24 сут		
ДРОП 1	121	90	46*	40*	89	79*	151*	47*	131*	137*
ДРОП 2	105	100	100	98	110	96	97	103	93	98
ДРОП 3	121	76*	46*	43*	89	73*	151*	54*	131*	126*

*Примечание.* \*Значимые различия с контролем. Активность ферментов и содержание МДА в тканях контрольных растений приняты за 100 %. Абсолютные значения контрольных образцов: КАТ<sub>18 сут</sub> = 30,5 ± 0,8 мкмоль Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>/(мг белка·мин), КАТ<sub>24 сут</sub> = 36,0 ± 1,5 мкмоль Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>/(мг белка·мин); СОД<sub>18 сут</sub> = 2,2 ± 0,4 ед. акт./мг белка, СОД<sub>24 сут</sub> = 5 ± 0,6 ед. акт./мг белка; АПО<sub>18 сут</sub> = 90 ± 4 мкмоль/(мг белка·мин), АПО<sub>24 сут</sub> = 86 ± 5 мкмоль/(мг белка·мин); ПО<sub>18 сут</sub> = 63 ± 2 мкмоль/(мг белка·мин), ПО<sub>24 сут</sub> = 120 ± 11 мкмоль/(мг белка·мин); МДА<sub>18 сут</sub> = 75 ± 3 мкмоль/г сух. массы, МДА<sub>24 сут</sub> = 71 ± 4 мкмоль/г сух. массы.

В вариантах ДРОП 1 и ДРОП 3 наблюдалась тенденция повышения активности КАТ после воздействия ДРОП на молодые растущие листья, но измерения, проведенные на 24-е сут уже на зрелых листьях, указывали на тенденцию к снижению активности этого фермента в варианте ДРОП 1 и более значимое снижение в варианте ДРОП 3. Активность СОД в вариантах ДРОП 1 и ДРОП 3 уменьшалась на 50–60 % по сравнению с контролем уже после первых 6 сут действия ДРОП и, оставаясь низкой, не различалась между вариантами ДРОП 1 и ДРОП 3 на 24-е сут. Активность АПО начала понижаться после воздействия ДРОП на молодые листья (ДРОП 1 и ДРОП 3) и к 24-м сут снизилась на 20–25 % по отношению к контролю. Уровень МДА в вариантах ДРОП 1 и ДРОП 3 был выше по сравнению с контролем на 30 % на 18-е и 24-е сут (табл.).

## Обсуждение

Индукцированное ДРОП-воздействиями снижение активности АО ферментов либо первоначальное увеличение активности с последующим ее снижением и усиление образования МДА в листьях огурца было наиболее выражено в наших опытах в тех случаях, когда действию низкой температуры подвергались молодые, активно растущие листья. Обычно интенсивность процессов ПОЛ в клетках при охлаждении прямо пропорциональна холодовым нарушениям и обратно пропорциональна холодоустойчивости растений [Лукаткин, 2002]. Известно, что у листьев огурца устойчивость к охлаждению минимальна в ранние фазы развития и максимальна в поздние [Генкель, Кушниренко, 1966; Белик, 1970]. В наших опытах холодоустойчивость, измеренная сразу после серии ежесуточных 2-часовых снижений температуры, у зрелых листьев была выше, чем при действии ДРОП на молодые листья. Однако

в последствии ДРОП холодоустойчивость листьев, заканчивающих рост уже в нормальных температурных условиях, была на уровне той, которую развивали зрелые листья под влиянием ДРОП. Отметим, что увеличение числа ДРОП-воздействий с 6 до 12 не привело к дополнительному приросту холодоустойчивости.

Отсутствие стрессовой реакции, оцениваемой по содержанию МДА и величине  $F_v/F_m$  у листьев, подвергавшихся действию ДРОП в зрелом состоянии, возможно, объясняется более быстрыми по сравнению с молодыми листьями процессами восстановления вызванных холодом нарушений и/или повреждений, так как известно, что активация ПОЛ обратима и нормализация состояния липидов протекает наиболее медленно в ранние фазы развития и быстрее на более поздних фазах развития [Лукаткин, 2002]. Инактивация реакционного центра (РЦ) ФС II, приводящая к снижению значений  $F_v/F_m$ , может быть также обратимой [Gomez et al., 1998]. В наших опытах ДРОП-воздействие включало 2-часовое охлаждение с последующим 22-часовым периодом оптимальной температуры, в течение которого происходит восстановление повреждений в РЦ. Поэтому можно предположить, что причиной меньшего содержания МДА и высоких значений  $F_v/F_m$  у зрелых листьев является не их высокая устойчивость к охлаждению, а способность быстрее, по сравнению с молодыми листьями, обеспечивать нормализацию состояния липидов и РЦ ФС II в суточном цикле.

Снижение активности АО ферментов в листьях огурца, испытывавших ДРОП-воздействия в молодом возрасте, согласуется с литературными данными о том, что чувствительные к охлаждению виды часто имеют пониженную антиоксидантную способность (особенно по активности АО ферментов) по сравнению с устойчивыми видами [Hodges et al., 1997a]. Хотя даже в отношении теплолюбивых видов

в литературе имеются довольно противоречивые данные об изменении у них активности АО ферментов при охлаждении. Отмечают как резкое снижение активности этих ферментов (обычно в начальные периоды охлаждения), так и ее возрастание (чаще после длительного охлаждения) или отсутствие видимых изменений. Наши результаты совпадают с данными о снижении активности СОД [Wang et al., 1986; Jahnke et al., 1991; Gianinetti et al., 1993; Wang et al., 1995; Pinhero et al., 1997] и АПО [Hodges et al., 1997a, b; Hull et al., 1997] при охлаждении теплолюбивых видов. В ряде работ показано, что АПО принимает активное участие в защите растительной клетки от холодового повреждения при длительном (4 ч и более) выдерживании растений в условиях пониженных температур, что связано со временем, которое требуется для накопления  $H_2O_2$  до уровня, необходимого для индукции синтеза цитозольной АПО [Prasad et al., 1994; Morita et al., 1999; Лукаткин, 2002]. Что касается КАТ, то ее активность у растений огурца обычно снижается при охлаждении [Hodges et al., 1997a, b; Shen et al., 1999; Лукаткин, 2002], хотя имеются также данные о практически полном восстановлении исходной активности КАТ у теплолюбивых видов растений в последствии охлаждения [Лукаткин, 2002]. У теплолюбивых видов, в отличие от холодоустойчивых, отмечается и снижение активности ПО при действии низких температур [Rivero et al., 2001; Lu et al., 2008]. Не исключено, что подобные противоречия могут быть объяснены не только различной интенсивностью охлаждения и характером (постоянное или периодически повторяющееся) холодового воздействия, но и, возможно, использованием в работах в качестве объекта листьев, находящихся в разных возрастных состояниях и характеризующихся неодинаковой реакцией антиоксидантной системы на холод. При этом интересно отметить, что накопление АФК в клетках теплолюбивого растения огурца было одинаковым после 9 ч низкотемпературного воздействия (6 °С) в темноте у молодых и зрелых листьев [Zhang et al., 2014].

В целом можно резюмировать, что ежесуточные кратковременные понижения температуры до закаливающих значений (ДРОП) вызывают в активно растущих листьях снижение активности СОД и АПО и кратковременное повышение с последующим снижением активности КАТ и ПО, но не оказывают влияния на активность этих ферментов в зрелых листьях. Особо подчеркнем, что изменения активности АО ферментов при этом не коррелируют с динамикой холодоустойчивости. По-видимому,

механизм повышения устойчивости растений к низким температурам, основанный на увеличении антиоксидантной активности, описанный для теплолюбивых видов [Kuk, Shin, 2007], не принимает непосредственного участия в реакциях растений огурца на ДРОП-воздействия. Наблюдаемое же в этом случае повышение холодоустойчивости обусловлено иными механизмами из широкого спектра защитно-приспособительных реакций, которыми располагают растения.

*Исследования выполнены с использованием оборудования ЦКП НО Института биологии КарНЦ РАН при финансовой поддержке из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания (№ темы 0221-2014-0002) и РФФИ в рамках научного проекта № 14-04-00840 а.*

## Литература

- Белик В. Ф. Устойчивость растений к неблагоприятным температурным условиям // Физиология с.-х. растений. М.: Моск. ун-т, 1970. Т. 8. С. 292–330.
- Генкель П. А., Кушниренко С. В. Холодостойкость растений и термические способы ее повышения. М.: Наука, 1966. 223 с.
- Дроздов С. Н., Будыкина Н. П., Курец В. К., Балагурова Н. И. Определение устойчивости растений к заморозкам // Методы оценки устойчивости растений к неблагоприятным условиям среды. Л.: Колос, 1976. С. 222–228.
- Лукаткин А. С. Холодовое повреждение теплолюбивых растений и окислительный стресс. Саранск: Мордов. ун-т, 2002. 208 с.
- Марковская Е. Ф., Сыроева М. И., Шерудило Е. Г. Феномен ежесуточного кратковременного влияния низких закаливающих температур на жизнедеятельность растения // Онтогенез. 2008. Т. 39, № 5. С. 323–332.
- Пермяков А. Н., Дулов М. И., Васин В. Е. и др. Методика определения площади листьев с помощью программы «AreaS» [Электронный ресурс] // ФЕБОУ ВПО Самарская ЕСХА: [сайт]. URL: www.ssaa.ru (дата обращения: 15.02.2014).
- Armstrong A. F., Logan D. C., Atkin O. W. On the developmental dependence of leaf respiration: responses to short- and long-term changes in growth temperature // Amer. J. Bot. 2006. Vol. 93, No 11. P. 1633–1639.
- Atkin O. K., Loveys B. R., Atkinson L. J., Pons T. L. Phenotypic plasticity and growth temperature: understanding interspecific variability // J. Exp. Bot. 2006. Vol. 57, No 2. С. 267–281.
- Beers R. F. Jr., Sizer I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase // J. Biol. Chem. 1952. Vol. 195. P. 133–140.
- Bolhàr-Nordenkampf H. R., Long S. P., Baker N. R. et al. Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review

of current instrumentation // *Funct. Ecol.* 1989. Vol. 3. P. 497–514.

Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72. P. 248–254.

Campbell C., Atkinson L., Zaragoza-Castells J. et al. Acclimation of photosynthesis and respiration is asynchronous in response to changes in temperature regardless of plant functional group // *New Phytol.* 2007. Vol. 176, No 2. P. 375–389.

Gianinetti A., Lorenzoni C., Marocco A. Changes in superoxide dismutase and catalase activities in response to low temperature in tomato mutants // *J. Genet. Breed.* 1993. Vol. 47, No 4. P. 353–356.

Giannopolitis C. N., Ries S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants // *Plant Physiol.* 1977. Vol. 59, No 2. P. 309–314. doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.59.2.309>.

Gómez I., Pérez-Rodríguez E., Viñeola B. et al. Effects of Solar Radiation on Photosynthesis, UV-Absorbing Compounds and Enzyme Activities of the Green Alga *Dasycladus vermicularis* from Southern Spain // *J. Photochem. Photobiol. B.: Biol.* 1998. Vol. 47. P. 46–57. doi: [10.1016/S1011-1344\(98\)00199-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1011-1344(98)00199-7).

Heath R. L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation // *Arch. Biochem. Biophys.* 1968. Vol. 125, No 1. P. 189–198. doi: [10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1).

Hodges D. M., Andrews C. J., Johnson D. A., Hamilton R. I. Sensitivity of maize hybrids to chilling and their combining abilities at two developmental stages // *Crop Sci.* 1997a. Vol. 37, No 3. P. 850–856. doi: [10.2135/cropsci1997.0011183X003700030026x](http://dx.doi.org/10.2135/cropsci1997.0011183X003700030026x).

Hodges D. M., Andrews C. J., Johnson D. A., Hamilton R. I. Antioxidant enzyme and compound responses to chilling stress and their combining abilities in differentially sensitive maize hybrids // *Crop Sci.* 1997b. Vol. 37, No 3. P. 857–863. doi: [10.2135/cropsci1997.0011183X003700030027x](http://dx.doi.org/10.2135/cropsci1997.0011183X003700030027x).

Hull M. R., Long S. P., Jahnke L. S. Instantaneous and developmental effects of low temperature on the catalytic properties of antioxidant enzymes in two *Zea* species // *Austral. J. Plant Physiol.* 1997. Vol. 24, No 3. P. 337–343. doi: [10.1071/PP96041](http://dx.doi.org/10.1071/PP96041).

Jahnke L. S., Hull M. R., Long S. P. Chilling stress and oxygen metabolizing enzymes in *Zea mays* and *Zea diploperennis* // *Plant Cell Envir.* 1991. Vol., 14, No 1. P. 97–104. doi: [10.1111/j.1365-3040.1991.tb01375.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3040.1991.tb01375.x).

Kuk Y. I., San Shin J. Mechanisms of low-temperature tolerance in cucumber leaves of various ages // *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 2007. Vol. 132. P. 294–301.

Lu P., Sang W. G., Ma K. P. Different responses of the activities of antioxidant enzymes to thermal stresses between two invasive *Eupatorium* species in China // *J. Integr. Plant Biol.* 2008. Vol. 50, No 4. P. 393–401. doi: [10.1111/j.1744-7909.2007.00583.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00583.x).

Morita S., Kaminaka H., Masumura T., Tanaka K. Induction of rice cytosolic ascorbate peroxidase mRNA by oxidative stress. The involvement of hydrogen peroxide in oxidative stress signaling // *Plant Cell Physiol.* 1999. Vol. 40, No 4. P. 417–422. doi: [10.1093/oxfordjournals.pcp.a029557](http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029557).

Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts // *Plant Cell Physiol.* 1981. Vol. 22, No 5. P. 867–880.

Omran R. G. Peroxide levels and the activities of catalase, peroxidase, and indoleacetic acid oxidase during and after chilling cucumber seedlings // *Plant Physiol.* 1980. Vol. 65, No 2. P. 407–408. doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.65.2.407>.

Pinhero R. G., Rao M. V., Paliyath G. et al. Changes in activities of antioxidant enzymes and their relationship to genetic and paclobutrazol-induced chilling tolerance of maize seedlings // *Plant Physiol.* 1997. Vol. 114, No 2. P. 695–704. doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.114.2.695>.

Prasad T. K., Anderson M. D., Martin B. A., Stewart C. R. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide // *Plant Cell.* 1994. Vol. 6, No 1. P. 65–74. doi: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.6.1.65>.

Rivero R. M., Ruiz J. M., García P. C. et al. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants // *Plant Sci.* 2001. Vol. 157. P. 315–321. doi: [10.1016/S0168-9452\(00\)00395-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00395-2).

Shen W. Y., Nada K., Tachibana S. Effects of cold treatment on enzymatic and nonenzymatic antioxidant activities in leaves of chilling-tolerant and chilling-sensitive cucumber (*Cucumis sativus* L.) cultivars // *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 1999. Vol. 68, No 5. P. 967–973. doi: [10.2503/jjshs.68.967](http://dx.doi.org/10.2503/jjshs.68.967).

Srivastava O. P., van Huystee R. B. An interrelationship among peroxidase, IAA oxidase and polyphenol oxidase from peanut cells // *Can. J. Bot.* 1977. Vol. 55. P. 2630–2635. doi: [10.1139/b77-301](http://dx.doi.org/10.1139/b77-301).

Sysoeva M. I., Sherudilo E. G., Markovskaya E. F. et al. Temperature drop as a tool for cold tolerance increment in plants // *Plant Growth Regul.* 2005. Vol. 46. P. 189–191. doi: [10.1007/s10725-005-7357-2](http://dx.doi.org/10.1007/s10725-005-7357-2).

Wang Y., Liu H.-W., Li P. et al. The effect of chilling stress on membrane-lipid peroxidation of photosynthetic apparatus in rice seedlings in the dark and light // *Acta Phytophysiol. Sin.* 1986. Vol. 12, No 3. P. 244–251. (In Chinese, with English abstract).

Wang Y.-R., Zeng S.-X., Liu H.-X. Effect of cold hardening on SOD and glutathione reductase activities and on contents of the reduced form of glutathione and ascorbic acid in rice and cucumber seedlings // *Acta Bot. Sin.* 1995. Vol. 37. P. 776–780. (In Chinese, with English abstract).

Zhang J. X., Cui S. P., Li J. M. et al. Protoplasmic factors, antioxidant responses, and chilling resistance in maize // *Plant Physiol. Biochem.* 1995. Vol. 33, No 5. P. 567–575.

Zhang Z.-S., Yang C., Gao H.-Y. et al. The higher sensitivity of PSI to ROS results in lower chilling-light tolerance of photosystems in young leaves of cucumber // *J. Photochem. Photobiol. B: Biology.* 2014. Vol. 137. P. 127–134.

Поступила в редакцию 13.09.2015

## References

- Belik V. F. Ustoichivost' rastenii k neblagopriyanyam temperaturnym usloviyam [Plant resistance to adverse temperature conditions]. *Fiziologiya s.-kh. Rastenii [Crop physiology]*. Moscow: Mosk. un-t, 1970. Vol. 8. P. 292–330.
- Drozhdov S. N., Budykina N. P., Kurets V. K., Balagurova N. I. Opređenje ustoichivosti rastenii k zamorozkam [Determination of plant resistance to light frost]. *Metody otsenki ustoichivosti rastenii k neblagopriyanyam usloviyam sredey [Methods for the assessment of plant tolerance to unfavorable environments]*. Leningrad: Kolos, 1976. P. 222–228.
- Genkel' P. A., Kushnirenko C. B. Kholodostoikost' rastenii i termicheskie sposoby ee povysheniya [Cold resistance in plants and thermal methods of its improvement]. Moscow: Nauka, 1966. 223 p.
- Lukatkin A. S. Kholodovoe povrezhdenie teplolyubivyykh rastenii i oksitel'nyi stress [Cold damage to heat-loving plants and oxidative stress]. Saransk: Mordov. un-t, 2002. 208 p.
- Markovskaya E. F., Sysoeva M. I., Sherudilo E. G. Fenomen ezhesutochnogo kratkovremennogo vliyaniya nizkikh zakalivayushchikh temperatur na zhiznedeyatel'nost' rasteniya [Phenomenon of daily short-time effect of low hardening temperatures on plant vital activity]. *Ontogenez [Ontogenesis]*. 2008. Vol. 39, No 5. P. 323–332.
- Permyakov A. N., Dulov M. I., Vasin V. E., Tolpekin A. A., Zuev E. V. Metodika opredeleniya ploshchadi list'ev s pomoshch'yu programmy "AreaS" [Method for leaf area estimation using the program "AreaS"]. *FEBOU VPO Samarskaya ESKhA*. URL: [www.ssaa.ru](http://www.ssaa.ru) (accessed: 15.02.2014).
- Armstrong A. F., Logan D. C., Atkin O. W. On the developmental dependence of leaf respiration: responses to short- and long-term changes in growth temperature. *Amer. J. Bot.* 2006. Vol. 93, No 11. P. 1633–1639.
- Atkin O. K., Loveys B. R., Atkinson L. J., Pons T. L. Phenotypic plasticity and growth temperature: understanding interspecific variability. *J. Exp. Bot.* 2006. Vol. 57, No 2. P. 267–281.
- Beers R. F. Jr., Sizer I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 1952. Vol. 195. P. 133–140.
- Bolhàr-Nordenkamp H. R., Long S. P., Baker N. R., Öquist G., Schreiber U., Lechner E. G. Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Funct. Ecol.* 1989. Vol. 3. P. 497–514.
- Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72. P. 248–254.
- Campbell C., Atkinson L., Zaragoza-Castells J., Lundmark M., Atkin O., Hurry V. Acclimation of photosynthesis and respiration is asynchronous in response to changes in temperature regardless of plant functional group. *New Phytol.* 2007. Vol. 176, No 2. P. 375–389.
- Gianinetti A., Lorenzoni C., Marocco A. Changes in superoxide dismutase and catalase activities in response to low temperature in tomato mutants. *J. Genet. Breed.* 1993. Vol. 47, No 4. P. 353–356.
- Giannopolitis C. N., Ries S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 1977. Vol. 59, No 2. P. 309–314. doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.59.2.309>.
- Gómez I., Pérez-Rodríguez E., Viñegla B., Figueroa F., Karsten U. Effects of Solar Radiation on Photosynthesis, UV-Absorbing Compounds and Enzyme Activities of the Green Alga *Dasycladus vermicularis* from Southern Spain. *J. Photochem. Photobiol. B.: Biol.* 1998. Vol. 47. P. 46–57. doi: [10.1016/S1011-1344\(98\)00199-7](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(98)00199-7).
- Heath R. L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 1968. Vol. 125, No 1. P. 189–198. doi: [10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1).
- Hodges D. M., Andrews C. J., Johnson D. A., Hamilton R. I. Sensitivity of maize hybrids to chilling and their combining abilities at two developmental stages. *Crop Sci.* 1997a. Vol. 37, No 3. P. 850–856. doi: [10.2135/cropsci1997.0011183X003700030026x](https://doi.org/10.2135/cropsci1997.0011183X003700030026x).
- Hodges D. M., Andrews C. J., Johnson D. A., Hamilton R. I. Antioxidant enzyme and compound responses to chilling stress and their combining abilities in differentially sensitive maize hybrids. *Crop Sci.* 1997b. Vol. 37, No 3. P. 857–863. doi: [10.2135/cropsci1997.0011183X003700030027x](https://doi.org/10.2135/cropsci1997.0011183X003700030027x).
- Hull M. R., Long S. P., Jahnke L. S. Instantaneous and developmental effects of low temperature on the catalytic properties of antioxidant enzymes in two *Zea* species. *Austral. J. Plant Physiol.* 1997. Vol. 24, No 3. P. 337–343. doi: [10.1071/PP96041](https://doi.org/10.1071/PP96041).
- Jahnke L. S., Hull M. R., Long S. P. Chilling stress and oxygen metabolizing enzymes in *Zea mays* and *Zea diploperennis*. *Plant Cell Envir.* 1991. Vol., 14, No 1. P. 97–104. doi: [10.1111/j.1365-3040.1991.tb01375.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1991.tb01375.x).
- Kuk Y. I., San Shin J. Mechanisms of low-temperature tolerance in cucumber leaves of various ages. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 2007. Vol. 132. P. 294–301.
- Lu P., Sang W. G., Ma K. P. Different responses of the activities of antioxidant enzymes to thermal stresses between two invasive Eupatorium species in China. *J. Integr. Plant Biol.* 2008. Vol. 50, No 4. P. 393–401. doi: [10.1111/j.1744-7909.2007.00583.x](https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00583.x).
- Morita S., Kaminaka H., Masumura T., Tanaka K. Induction of rice cytosolic ascorbate peroxidase mRNA by oxidative stress. The involvement of hydrogen peroxide in oxidative stress signaling. *Plant Cell Physiol.*, 1999. Vol. 40, No 4. P. 417–422. doi: [10.1093/oxfordjournals.pcp.a029557](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029557).
- Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 1981. Vol. 22, No 5. P. 867–880.
- Omran R. G. Peroxide levels and the activities of catalase, peroxidase, and indoleacetic acid oxidase during and after chilling cucumber seedlings. *Plant Physiol.* 1980. Vol. 65, No 2. P. 407–408. doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.65.2.407>.



Pinhero R. G., Rao M. V., Paliyath G., Murr D. P., Fletcher R. A. Changes in activities of antioxidant enzymes and their relationship to genetic and paclobutrazol-induced chilling tolerance of maize seedlings. *Plant Physiol.* 1997. Vol. 114, No 2. P. 695–704. doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.114.2.695>.

Prasad T. K., Anderson M. D., Martin B. A., Stewart C. R. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell.* 1994. Vol. 6, No 1. P. 65–74. doi: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.6.1.65>.

Rivero R. M., Ruiz J. M., García P. C., López-Lefebvre L., Sánchez E., Romero L. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Sci.* 2001. Vol. 157. P. 315–321. doi: [10.1016/S0168-9452\(00\)00395-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00395-2).

Shen W. Y., Nada K., Tachibana S. Effects of cold treatment on enzymatic and nonenzymatic antioxidant activities in leaves of chilling-tolerant and chilling-sensitive cucumber (*Cucumis sativus* L.) cultivars. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 1999. Vol. 68, No 5. P. 967–973. doi: [10.2503/jjshs.68.967](http://dx.doi.org/10.2503/jjshs.68.967).

Srivastava O. P., van Huystee R. B. An interrelationship among peroxidase, IAA oxidase and polyphenol oxidase from peanut cells. *Can. J. Bot.* 1977. Vol. 55. P. 2630–2635. doi: [10.1139/b77-301](http://dx.doi.org/10.1139/b77-301).

Sysoeva M. I., Sherudilo E. G., Markovskaya E. F., Obshatko L. A., Matveeva E. M. Temperature drop as a tool for cold tolerance increment in plants. *Plant Growth Regul.* 2005. Vol. 46. P. 189–191. doi: [10.1007/s10725-005-7357-2](http://dx.doi.org/10.1007/s10725-005-7357-2).

Wang Y., Liu H.-W., Li P., Zeng Sh., Zhen L., Guo J. The effect of chilling stress on membrane-lipid peroxidation of photosynthetic apparatus in rice seedlings in the dark and light. *Acta Phytophysiol. Sin.* 1986. Vol. 12, No 3. P. 244–251. (In Chinese, with English abstract).

Wang Y.-R., Zeng S.-X., Liu H.-X. Effect of cold hardening on SOD and glutathione reductase activities and on contents of the reduced form of glutathione and ascorbic acid in rice and cucumber seedlings. *Acta Bot Sin.* 1995. Vol. 37. P. 776–780. (In Chinese, with English abstract).

Zhang J. X., Cui S. P., Li J. M., Wei J. K., Kirkham M. B. Protoplasmic factors, antioxidant responses, and chilling resistance in maize. *Plant Physiol. Biochem.* 1995. Vol. 33, No 5. P. 567–575.

Zhang Z.-S., Yang C., Gao H.-Y., Zhang L.-T., Fan X.-L., Liu M.-J. The higher sensitivity of PSI to ROS results in lower chilling-light tolerance of photosystems in young leaves of cucumber. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology.* 2014. Vol. 137. P. 127–134.

Received September 13, 2015

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

### Шибяева Татьяна Геннадиевна

старший научный сотрудник, к. б. н.  
Институт биологии Карельского научного центра РАН  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,  
Россия, 185910  
эл. почта: [shibaeva@krc.karelia.ru](mailto:shibaeva@krc.karelia.ru)  
тел.: (8142) 762706, +79214611116

### Шеруди́ло Елена Георгиевна

старший научный сотрудник, к. б. н.  
Институт биологии Карельского научного центра РАН  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,  
Россия, 185910  
эл. почта: [sherudil@krc.karelia.ru](mailto:sherudil@krc.karelia.ru)

### Икконен Елена Николаевна

старший научный сотрудник, к. б. н.  
Институт биологии Карельского научного центра РАН  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,  
Россия, 185910  
эл. почта: [likkonen@gmail.com](mailto:likkonen@gmail.com)

### Титов Александр Федорович

председатель КарНЦ РАН, руководитель лаб.  
экологической физиологии растений, чл.-корр. РАН,  
д. б. н., проф.,  
Институт биологии Карельского научного центра РАН  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,  
Россия, 185910  
эл. почта: [titov@krc.karelia.ru](mailto:titov@krc.karelia.ru)

## CONTRIBUTORS:

### Shibaeva, Tatyana

Institute of Biology, Karelian Research Centre,  
Russian Academy of Sciences  
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,  
Karelia, Russia  
e-mail: [shibaeva@krc.karelia.ru](mailto:shibaeva@krc.karelia.ru)  
tel.: (8142) 762706, +79214611116

### Sherudilo, Elena

Institute of Biology, Karelian Research Centre,  
Russian Academy of Sciences  
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,  
Karelia, Russia  
e-mail: [sherudil@krc.karelia.ru](mailto:sherudil@krc.karelia.ru)

### Ikkonen, Elena

Institute of Biology, Karelian Research Centre,  
Russian Academy of Sciences  
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,  
Karelia, Russia  
e-mail: [likkonen@gmail.com](mailto:likkonen@gmail.com)

### Titov, Alexandr

Institute of Biology, Karelian Research Centre,  
Russian Academy of Sciences  
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,  
Karelia, Russia  
e-mail: [titov@krc.karelia.ru](mailto:titov@krc.karelia.ru)