

**А.Ж. Бектурова*, У.И. Аманбаева, А.Б. Курманбаева, К.Е. Жанасова,
Р.Ж. Ермухамбетова, Ж.Б. Тлеукулова, Б.Ж. Гадильгереева,
Р.Т. Омаров, Ж.К. Масалимов**

Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, Нур-Султан, Казахстан

**Автор для корреспонденции: assemgulbekurova@gmail.com*

Влияние окислительного стресса на антиоксидантную защиту растений

Аннотация. В работе было исследовано влияние длительного комбинированного воздействия температурного стресса и вирусной инфекции на систему антиоксидантной защиты растений *Nicotiana benthamiana*. Было показано, что окислительный стресс, вызванный сочетанным действием биотических и абиотических факторов, оказывает неоднозначное влияние на развитие патогена в листьях растений *Nicotiana benthamiana*. В статье показана неоднородность воздействия теплового и холодного стрессов и вирусной инфекции на содержание активных форм кислорода в листьях растений *Nicotiana benthamiana*. Так, показано, что низкотемпературный стресс приводил к увеличению уровня накопления супероксидного радикала в листьях растений, при этом действие комбинированного стресса к большему повышению накопления супероксидного радикала не привело. Сочетанное действие холодного стресса и вирусной инфекции привели к повышению содержания перекиси водорода, при этом активность каталазы была снижена. Также наблюдалось резкое увеличение активности альдегидоксидазы при температурном стрессе. Наибольшая активность фермента наблюдалась при комбинированном воздействии пониженной температуры и вирусной инфекции. Таким образом, можно предположить, что окислительный стресс в тканях растений приводит к увеличению уровня аккумуляции активных форм кислорода, при этом оказывая влияние на ферменты, ответственные за баланс накопления активных форм кислорода в растительной ткани в ответ на атаку патогена.

Ключевые слова: температурный стресс, *Nicotiana benthamiana*, вирус TBSV, активные формы кислорода, ферменты.

DOI: 10.32523/2616-7034-2022-140-3-25-38

Введение

Растения подвергаются постоянным неблагоприятным воздействиям, наиболее частыми из которых являются высокие и низкие температуры, а также химические вещества. В процессе эволюции растения сформировали разнообразные механизмы адаптации к неблагоприятным факторам окружающей среды. Одним из первых механизмов, участвующих в защитных реакциях растений в ответ на стресс, является изменение активности ферментов окислительного метаболизма [1]. Повреждающему эффекту свободных радикалов и активных форм кислорода противостоит система антиоксидантной защиты, функционирование которой является проявлением неспецифической устойчивости растений, поэтому особую актуальность имеют вопросы, связанные с изучением антиоксидантного статуса растений и возможности его использования для комплексной диагностики устойчивости растений к различным видам антропогенного воздействия.

Одним из наиболее значимых негативных факторов окружающей среды, действующих на биологические макромолекулы, является повышенная генерация активных форм кислорода (АФК), приводящая к возникновению и развитию такого процесса, как окислительный стресс. Окислительный стресс, определяемый как смещение баланса между прооксидантными и антиоксидантными реакциями, протекающими в организме в пользу первого, является общим

знаменателем действия различных агентов на живые организмы. Это вызвано сверхпродукцией активных форм кислорода и накоплением поврежденных молекул. Наряду с этим необходимо отметить то, что АФК играют положительную роль для организма, т.к. они являются необходимыми для многих жизненно-важных сигнальных реакций, участвующих в различных процессах, таких как апоптоз, клеточная пролиферация и дифференциация, что обуславливает их дуальную роль (рис 1). Усиленное образование активных форм кислорода происходит под действием ионизирующего и УФ-излучения, ксенобиотиков и патогенной инфекции. Активные формы кислорода являются также продуктом аэробного клеточного метаболизма. АФК включают в себя синглетный кислород, супероксид анион радикалы, пероксид водорода и гидроксильные радикалы. Каждый из указанных АФК обладает определенными химическими свойствами, придающими реакционную способность различным биологическим мишеням.

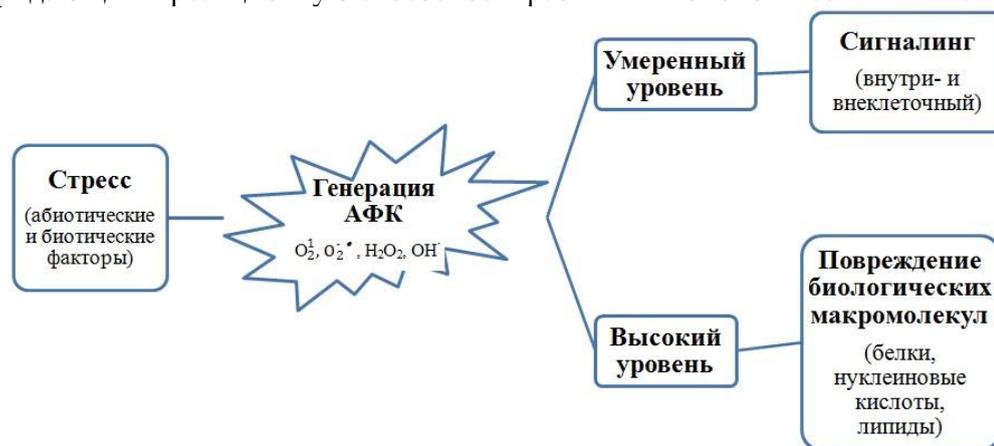


Рисунок 1. Генерация активных форм кислорода [2]

Антиоксидантная система защиты включает в себя антиоксидантные ферменты (супероксиддисмутаза, пероксидаза, каталаза и др.) и низкомолекулярные органические соединения (пролин, полиамины, вещества фенольной природы – антоцианы, каротиноиды, флавоноиды и др.). Одним из основных ферментов нейтрализации перекиси водорода, участвующих в стрессовых реакциях растений, является каталаза. Каталаза – первичный антиоксидантный фермент, изменение которого может служить показателем устойчивости растений к стрессам. Каталаза (КАТ) – антиоксидантный фермент, который способствует быстрой утилизации перекиси водорода, катализирует дисмутацию перекиси до воды и кислорода. Этот фермент локализован в основном в пероксисомах и глиоксисомах. В окисленном состоянии каталаза может работать как пероксидаза, катализируя окисление до альдегидов.

Альдегидоксидаза (АО) – молибдо-железо-флавофермент, который катализирует окисление множества ароматических и неароматических альдегидов в соответствующие карбоксильные кислоты. Фермент играет ключевую роль в метаболизме ксенобиотиков, а также вовлечен в процесс адаптации растений к абиотическим факторам, в том числе в условиях солевого стресса [3].

В природе растения часто подвергаются одновременному воздействию ряда биотических и абиотических факторов [4-7]. Влияние сочетанного действия биотических и абиотических стрессов на развитие патогена в растениях может быть различным [8]. Ряд источников показывает, что сочетанное воздействие патогена и высокотемпературного стресса повышает восприимчивость растений к болезням.

В связи с этим начинают появляться все больше исследований, направленных на изучение совместного воздействия различных абиотических и биотических факторов, таких как засуха, засоление, экстремальные температуры, ионизирующее излучение и т.д. [4,5,9]. Так нами ранее было показано, что сочетание засухи и высокой температуры наносило растениям ячменя более

серьезный ущерб, чем засуха и стресс при низких температурах. Комбинированный стресс от жары и засухи привел к повышению активности каталазы (КАТ) и супероксиддисмутазы (СОД) в корнях, но не в побегах [10].

Поэтому изучение влияния различных сочетаний абиотических и биотических факторов на развитие растений продолжает оставаться актуальным.

В работе было исследовано совместное действие абиотических и биотических факторов на окислительный взрыв в растениях.

Материал и методы исследования

Объектом исследования являлись растения *Nicotiana Benthamiana*.

Условия выращивания растений: растения выращивали в автоклавированном грунте (TerraVita, РФ) с вермикулитом в соотношении 4:1 с 16-часовым периодом освещения при 25°C в течение 30 суток. Затем растения делились на группы и выращивались при различных температурах, 10°C, 25°C и 40°C соответственно, в течение 5 суток. После чего часть растений в каждой группе инфицировались вирусом *TBSV*.

Инокуляция растений вирусом TBSV: для заражения растений использовали вирусные транскрипты. Для этого вирусные транскрипты в 10 мМ натрий - фосфатном буфере pH 6,9 с карборандумом ($d=0,037\text{мм}$) наносили на поверхность листьев среднего яруса в объеме 20 мкл и осторожно втирали. Через 8 дней после инокуляции вируса *TBSV* определяли уровень накопления перекиси водорода и супероксид-анион радикала в листьях верхнего яруса растений *N. Benthamiana*.

Определение перекиси водорода: Содержание перекиси водорода проводили как описано в работе Кэриол и соавт. [11]. Для этого листья подвергали вакуумной инфильтрации 0,1% -ным раствором DAB (3,3'-Diaminobenzidine) в 10 мМ MES-буфере pH 6,5 в течение 15 минут и выдерживали на водяной бане при 100°C в течение 5 минут в смеси этанол: лактофенол (2: 1). Затем растения дважды промывали в 50% этаноле.

Определение супероксид-анион радикала:

Уровень аккумуляции супероксид-анион радикала определяли по методу, описанному в работе Фрайер и соавт. [12]. Для определения супероксида в образцах листа выдерживали в течение 12 часов в 6 мМ NBT (p-Nitroblue tetrazolium chloride) в 50 мМ Na-фосфатном буфере pH 7,5 в темноте при комнатной температуре и подвергали вакуумной инфильтрации. До визуализации хлорофилл удаляли с листьев путем инфильтрации их раствором лакто-глицерол-этанола в соотношении 1:1:4 по объему и выдерживали в водяной бане (100°C) в воде 5 мин. После этого листья были промыты в 50 %-м этаноле.

Определение активности ферментов. После разделения белков в нативном геле электрофорезе активность ферментов будет проявлена в специализированных субстратных буферах, различных по составу в зависимости от вида фермента. В состав субстрата входят 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,1 mM метосульфат фенозина, 1 mM МТТ (3[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium-bromide) и индолил-3-карбоксихальдегид для альдегидоксидазы, и гипоксантин для ксантиндегидрогеназы. Затем гели будут инкубироваться при 37°C в течение 40 минут на термошейкере [13]. Для определения участия АО в продуцировании супероксид-анионов PMS будет исключен с реакционной смеси [14,15]. Также будет определено участие АО в продуцировании супероксид-анионов путем замещения индолил-3-карбоксихальдегида 0,25 mM NADH [16]. Для проявления активности каталазы гели будут инкубировать в 0,003% растворе пероксида водорода в течение 15 минут, затем проявят в субстрате, в состав которого входят 2% феррицианид калия и 2% хлорид железа [17,18].

Результаты исследования

В работе три группы 30-дневных растений *N. Benthamiana* в течение 5 суток выращивались при температурах +10°C, +25°C, +40°C соответственно. Затем после 4-часового адаптационного периода часть растений в каждой группе была заражена вирусом TBSV при комнатной температуре. Через 7 суток, после инокуляции растений вирусом, мы наблюдали четко выраженные симптомы вирусного заражения. Уровень накопления перекиси водорода и супероксид-анион радикала в листьях определяли гистохимически по развитию хромофорного ответа с использованием DAB и NBT соответственно.

Было показано, что воздействие как теплового, так и холодового температурного стресса приводило к увеличению уровня накопления супероксидного радикала в листьях растений *N. Benthamiana*.

Визуальный анализ листьев растений показал увеличение на площади поверхности листьев окраски, что свидетельствует о повышении уровня супероксидного радикала. Наиболее сильный эффект наблюдался при действии длительного холодового стресса. Менее интенсивное воздействие на образование супероксидного радикала оказал тепловой стресс (рис.2).

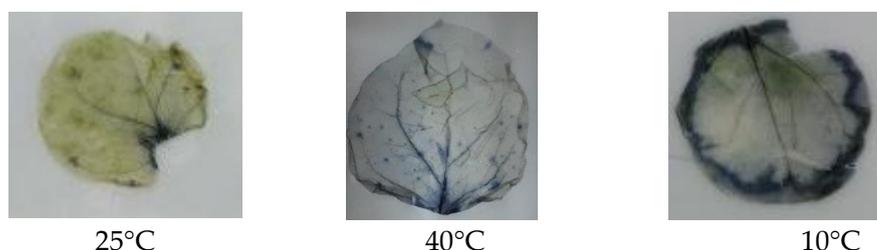


Рисунок 2. Гистохимический анализ накопления супероксидного радикала в растениях *Nicotiana benthamiana* при действии различных температур

Неоднородный эффект воздействия температурного стресса на образование супероксидного радикала в листьях растений был показан ранее различными авторами. Температурный стресс может быть причиной как активации сигнальных систем, приводящих к изменениям в экспрессии генов, в том числе снижению активности АФК-элиминирующих ферментов, так и активации АФК-генерирующих ферментов [1].

Генерация АФК может регистрироваться как при длительном, так и кратковременном воздействии сублетальных температур [20]. Как правило, генерация супероксидного радикала является неспецифической реакцией растений на действие многих стрессоров, неодинаковая реакция растений может также быть связана с небольшим временем полужизни супероксидного радикала, и он не успевает перемещаться в другие части клетки от места своего образования [21,22].

Интересно, что комбинированный температурный стресс и вирусная инфекция оказывали небольшое воздействие на уровень накопления супероксидного радикала (рис.3). Степень окраски площади поверхности листьев при одновременном воздействии температуры и вирусной инфекции не отличалась значительной интенсивностью при сравнении с действием одиночного температурного стресса (рис.3).

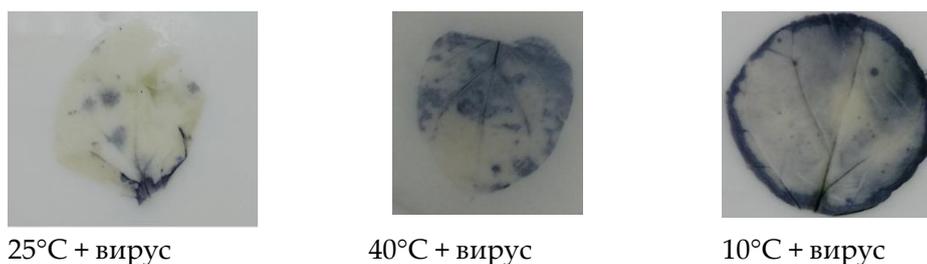


Рисунок 3. Гистохимический анализ накопления супероксидного радикала в растениях *Nicotiana benthamiana* при действии температурного стресса и вирусной инфекции

Длительный 120-часовой температурный стресс также приводил к небольшому увеличению уровня содержания перекиси водорода в листьях растений *N. benthamiana*. Было показано повышение перекиси водорода в листьях по сравнению с контролем (комнатная температура 25°C) (рис.2).



Рисунок 4. Гистохимический анализ накопления перекиси водорода в растениях *Nicotiana benthamiana* при действии температурного стресса

При комбинированном воздействии температуры и вирусной инфекции более значительный эффект наблюдался при сочетании пониженной температуры и вируса. Уровень накопления АФК после воздействия холодового стресса и вирусной инфекции вырос по сравнению с контролем (рис.5).

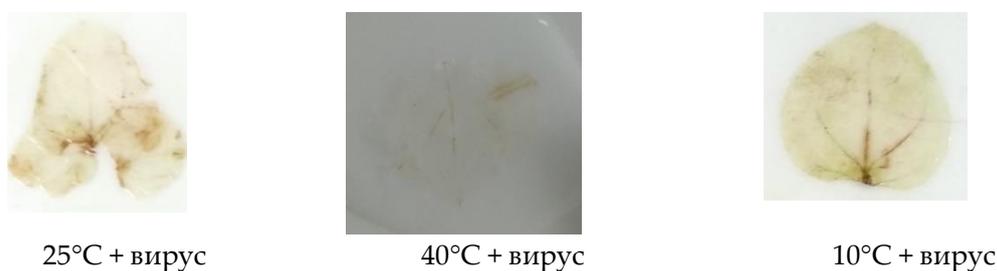


Рисунок 5. Гистохимический анализ накопления перекиси водорода в растениях *Nicotiana benthamiana* при действии температурного стресса и вирусной инфекции

АФК нейтрализуются ферментами антиоксидантной защиты. Одними из ключевых ферментов обезвреживания АФК являются каталаза (КАТ) и альдегидоксидаза (АО).

Согласно представленным данным, холодовой стресс (10°C) привел к значительному уменьшению активности каталазы в листьях растений (рис. 6). Однако при воздействии высокой температуры (40°C) активность каталазы увеличивалась (рис. 6).

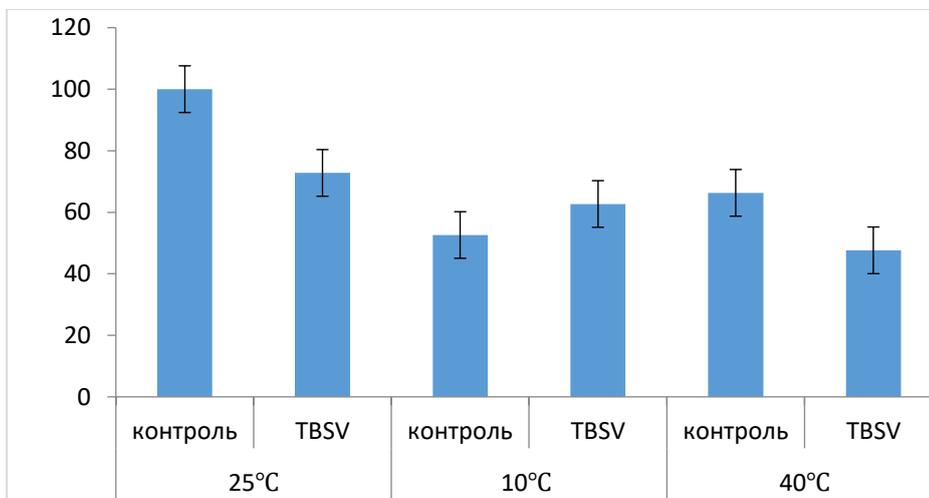


Рисунок 6. Активность каталазы в листьях растений *Nicotiana benthamiana* при длительном стрессе

Также снижение активности каталазы наблюдалось при воздействии вирусной инфекции. Низкая каталазная активность по сравнению с контролем была показана и при сочетании вирусной инфекции и температурного стресса.

Активность альдегидоксидазы (АО) растений менялась в условиях температурного стресса. Продолжительный холодовой стресс (10°C) не привел к уменьшению активности АО в листьях растений (рис.7). Однако при воздействии высокой температуры (40°C) было показано значительное увеличение альдегидоксидазной активности.

В то же время комбинированное влияние низкой температуры и вирусной инфекции приводило к увеличению активности АО. Однако активность АО при действии высокой температуры и вирусная инфекция значительно уменьшилась по сравнению с контрольной группой.

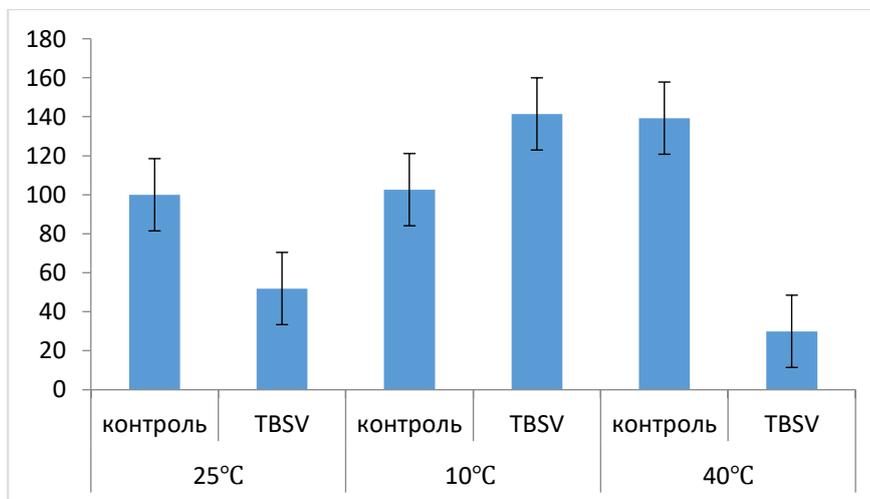


Рисунок 7. Активность альдегидоксидазы в растениях *Nicotiana benthamiana* при долговременном стрессе

Обсуждение исследования

Известно, что холодовое повреждение часто сопровождается окислительным стрессом, который в свою очередь инициируется активными формами кислорода. При этом активность каталазы при действии холодового стресса может повышаться [23] либо понижаться по сравнению с растениями, не подвергавшимися стрессовому воздействию [24]. Такая же противоречивая информация наблюдается и при воздействии теплового стресса на активность антиоксидантных ферментов. При температурном стрессе активность ферментов могла повышаться либо понижаться, а также и могла оставаться на уровне контрольных растений [23]. Такие изменения в активности фермента могут быть связаны с различной видоспецифической реакцией разных групп растений.

Незначительные изменения в активности каталазы могут быть связаны с адаптацией к длительному воздействию температурного стресса. Вирусная инфекция привела к понижению активности каталазы при росте 25°C. Совместное воздействие теплового стресса и вирусной инфекции не приводило к значительным изменениям.

Реакция растений на комбинированное воздействие двух или более стрессовых факторов уникальна и не может быть однозначно определена из ответных реакций растений на влияние индивидуальных стрессовых факторов. Кроме того, при одновременном воздействии нескольких стрессовых факторов возникает неоднозначная ответная реакция растений, поскольку реакции на комбинированные воздействия в значительной степени контролируются различными, а иногда и противоположными сигнальными путями, которые могут как взаимодействовать, так и ингибировать друг друга [25].

Полученные результаты показывают, что под воздействием температуры наблюдается повышение уровня супероксидного радикала и перекиси водорода, однако сочетанное воздействие не приводило к значительному увеличению генерации АФК.

В целом комбинированное воздействие повышенной температуры и вирусной инфекции не привело к значительным изменениям в накоплении АФК в листьях растений, но при этом при пониженной температуре уровень АФК был выше, чем в контроле. Возможно, незначительные изменения в продукции АФК связаны с длительной адаптацией растений к температурному стрессу (120 часов), а также со скоростью распространения вирусной инфекции. Уменьшение накопления H_2O_2 в инфицированных растениях может способствовать распространению инфекции [26].

Умеренная генерация супероксидного радикала и перекиси водорода при воздействии температурного стресса и вирусной инфекции приводила к каскадной активации механизмов антиоксидантной защиты клеток растений, как было показано в других работах [20].

Супероксидный радикал и перекись водорода могут играть немаловажную роль в запуске адаптивных реакций при температурном стрессе [20].

Длительное влияние низкой температуры приводило к значительному снижению активности КАТ, что коррелируется с повышенным содержанием АФК. Снижение каталазной активности при действии вирусной инфекции может приводить к повышению уровня H_2O_2 в листьях. При этом снижение активности каталазы при инокуляции вируса можно рассматривать как маркер для изучения взаимодействия растений и вирусов [27].

Интересно, что сочетание холодового стресса и вирусной инфекции привело к активации ферментов, в особенности АО. Известно, что АО участвует в инактивации перекиси водорода. Согласно литературным данным, увеличение активности АО при низких температурах указывает на запуск и активацию процессов оксидативного стресса [26]. Поскольку АО участвует в производстве АФК [28,29], то усиленная генерация уровня накопления H_2O_2 является следствием повышения активности АО. В то же время известно, что инфекция может вызывать повышенное накопление перекиси водорода по сравнению с псевдо-зараженными растениями [26].

Длительное влияние низкой температуры и вирусной инфекции приводило к повышению активности каталазы и АО, что, очевидно, может свидетельствовать об активации защитных механизмов растений по отношению к патогену. Так как известно, что каталаза может играть защитную роль для вирионов, оберегая геном вирусов от негативного воздействия АФК, при этом повышение активности КАТ и АО может быть результатом стратегии защиты растений от токсического влияния повышенной генерации АФК при TBSV инфекции. В то же время активация КАТ может быть полезна для вируса, снижая эффективность системы защиты растений [26]. Согласно [30], холодовой стресс способен подавлять РНК-интерференцию (оказывать влияние на сайленсинг генов).

Повышение температуры способствует распространению патогена в организме растений [31,32]. Более того, известно, что многие абиотические стрессовые условия, в том числе и температурный стресс, ослабляют защитные механизмы растений и повышают их восприимчивость к патогенной инфекции [33,34].

Дифференцированное влияние низкой и высоких температур на ферментативную активность косвенно свидетельствует о повышенном уровне АФК в опытных образцах. Активация систем антиоксидантной защиты, низкий уровень аккумуляции АФК связаны прежде всего с адаптивными возможностями растений к комбинированным воздействиям стрессовых факторов.

Выводы

Полученные данные свидетельствуют о том, что растения вырабатывают индивидуальные стратегии борьбы с одновременными стрессами, включая в себя гормональные сигналы, рецепторы и факторы транскрипции.

Таким образом, высокие и низкие температуры вызывают оксидативный стресс в тканях растений, повышая в них уровень аккумуляции АФК. Ранее нами было показано, что температурный стресс приводит к увеличению скорости распространения вирусной инфекции в листьях растений. Вирусная инфекция оказывает влияние на ферменты, ответственные за баланс накопления АФК в растительной ткани в ответ на атаку патогена.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке грантов №АР09563056 Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан.

Список литературы

1. Колупаев Ю.Е, Карпец Ю.В. Активные формы кислорода при адаптации растений к стрессовым температурам // Физиология и биохимия культурных растений. - 2009. - Т.41. - №2. - С. 95-108.
2. Baxter A., Mittler R., Suzuki N. ROS as key players in plant stress signalling // J. Exp. Bot. - 2014. - Vol. 65. - P. 1229-1240.
3. Babenko O.N, Brychkova G., Sagi M., Alikulov Z.A. Molybdenum application enhances adaptation of crested wheatgrass to salinity stress// Acta Physiol. Plant. - 2015. - Vol. 37. - P. 14.
4. Atkinson N.J., Urwin P.E. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field // J Exp Bot. - 2012. - Vol. 63. - P. 3523-3543.
5. Mittler R. Abiotic stress, the field environment and stress combination // Trends Plant Sci. - 2006. - Vol. 11. - P. 15-19.
6. Nostar O., Ozdemir F., Bor M., Turkan I., Tosun N. Combined effects of salt stress and cucurbit downy mildew (*Pseudoperospora cubensis* Berk. and Curt. Rostov.) infection on growth, physiological traits and antioxidant activity in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedling // Physiol Mol Plant Pathol. - 2013. - Vol. 83. - P. 84-92.

7. Ramegowda V., Senthil-Kumar M. The interactive effects of simultaneous biotic and abiotic stresses on plants: Mechanistic understanding from drought and pathogen combination // *Journal of Plant Physiology*. - 2015. - Vol. 176. - P. 47-54.
8. Tippmann H.F., Schlüter U., Collinge D.B. Common themes in biotic and abiotic stress signalling in plants: Global Science Books. - Middlesex, UK: Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology, 2006. - P. 52-67.
9. Rivero R.M., Mestre T.C., Mittler R.O.N., Rubio F., Garcia Sanchez F., Martinez V. The combined effect of salinity and heat reveals a specific physiological, biochemical and molecular response in tomato plants // *Plant Cell Environ.* -2013. - Vol. 37. - P. 1059-1073.
10. Zhanassova K., Kurmanbayeva A.B., Gadilgerreyeva B., Yermukhambetova R.Zh., Iksat N., Amanbayeva U.I., Bekturova A.Zh., Tleukulova Zh.B., Omarov R.T., Masalimov Zh.K. ROS status and antioxidant enzyme activities in response to combined temperature and drought stresses in barley // *Acta Physiologiae Plantarum*. - 2021. - Vol. 43(8). - P. 1-12.
11. Kariola T., Brader G., Jing L., Palva T. Chlorophyllase 1, a damage control enzyme, affects the balance between defense pathways in plants // *The Plant Cell*. - 2005. - Vol. 17 (1). - P. 282-294.
12. Fryer M.J., Oxborough K., Mullineaux P.M., Baker N.R. Imaging of photo-oxidative stress responses in leaves // *Journal of Experimental Botany*. - 2002. - Vol. 53(372). - P. 1249-1254.
13. Zarepour M., Simon K., Wilch M. Identification of superoxide production by *Arabidopsis thaliana* aldehyde oxidases AAO1 and AAO3 // *Plant Mol Biol*. - 2012. - Vol. 80(6). - P. 659-671.
14. Weydert C.J., Cullen J.J. Measurement of superoxidedismutase, catalase and glutathioneperoxidase in cultured cells and tissue // *Nat Protoc*. - 2009. - Vol. 5. - P. 51-66.
15. Kuo W.Y., Huang C.H., Chun Shih., Jinn T.L. Cellular Extract Preparation for Superoxide Dismutase (SOD) // *Activity Assay*. - 2013. - Vol. 3. - P. 3-5.
16. MacLeod R.M., Farkas W., Fridovich I., Handler P. Enzymatic Assay of SULFITEOXIDASE (EC 1.8.3.1) // *BiolChem*. - 1961. - Vol. 236 (1841). - P. 1-4.
17. Srivastava S., Brychkova G., Yarmolinsky D., Soltabayeva A., Samani T., Sagi M. Aldehyde Oxidase 4 Plays a Critical Role in Delaying Silique Senescence by Catalyzing Aldehyde Detoxification // *Plant Physiol*. - 2017. - Vol. 173(4). - P. 1977-1997.
18. Gumulec J., Raudenska M., Hlavna M., Stracina T., Sztalmachova M., Tanhauserova V., Pacal L., Ruttkay-Nedecky B., Sochor J., Zitka O., Babula P., Adam V., Kizek R., Novakova M., Masarik M. Determination of oxidative stress and activities of antioxidant enzyme in guinea pigs treated with haloperidol // *Exp Ther Med*. - 2013. - Vol. 5(2). - P. 479-484.
19. Kariola T., Brader G., Jing L., Palva T. Chlorophyllase 1, a damage control enzyme, affects the balance between defense pathways in plants // *The Plant Cell*. - 2005. - Vol. 17 (1). - P. 282-294.
20. Neill S.J., Desikan R., Clarke A., Hurst R.D., Hancock J.T. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants // *J Exp Bot*. - 2002. - Vol. 53(372). - P. 1237-47.
21. Takahashi M.A., Asada K. Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids // *Arch Biochem Biophys*. - 1983. - Vol. 5.226(2). - P. 558-566.
22. Dat J., Vandenabeele S., Vranova E., van Montagu M., Inze D., van Breusegem F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses // *Cell Mol Life Sci*. - 2000. - Vol. 57(5). - P. 779-795.
23. Zhang., Pilar Soengas, Victor M. Rodriguez, Pablo Velasco, Maria Elena Cartea. Effect of Temperature Stress on Antioxidant Defenses in Brassica Oleracea // *ACS Omega*. - 2018. - Vol. 3. - P. 5237-5243.
24. Колмыкова Т.С., Клокова Е.В., Шаркаева Э.Ш. Влияние 6-БАП на активность каталазы растений томата в условиях температурного стресса // *Самарский научный вестник*. - 2015. - № 2(11). - С. 96-99.
25. Suzuki N., Rivero R.M., Shulaev V., Blumwald E., Mittler R. Abiotic and biotic stress combinations // *New Phytol*. - 2014. - Vol. 203. - P. 32-43.

26. Yergaliyev T., Nurbekova Z., Mukiyanova G., et al. The involvement of ROS producing aldehyde oxidase in plant response to *Tombusvirus* infection// *PlantPhysiolBiochem.* - 2016. - Vol. 109. - P. 36-44.
27. Madhusudhan K.N., Srikanta B.M., Shylaja M.D., Prakash H.S., Shetty H.S. Changes in antioxidant enzymes, hydrogen peroxide, salicylic acid and oxidative stress in compatible and incompatible host-tobamovirus interaction// *Journal of Plant Interactions.* - 2009. - Vol. (3). - P. 157-166.
28. Yesbergenova Z., Yang G., Oron E., Soffer D., Fluhr R., Sagi M. The plant Mo-hydroxylases aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase have distinct reactive oxygen species signatures and are induced by drought and abscisic acid // *The Plant Journal.* - 2015. - Vol. 42. - P. 862-876.
29. Zarepour M., Simon K., Wilch M., et al. Identification of superoxide production by *Arabidopsis thaliana* aldehyde oxidases AAO1 and AAO3// *Plant Mol Biol.* - 2012. - Vol. 80(6). - P.659-671.
30. Szittyá G., Silhavy D., Molnár A., Havelda Z., Lovas A., Lakatos L., Banfalvi Z., Burgyan J. Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation// *The EMBO Journal.* - 2003. - Vol. 22. - P. 633-640.
31. Luck J., Spackman M., Freeman A., Trebicki P., Griffiths W., Finlay K., Chakraborty S. Climate change and diseases of food crops// *Plant Pathology.* - 2011. - Vol. 60. - P. 113-121.
32. Madgwick, James West, Jon White, Rodger Semenov, Mikhail & Townsend, James Turner, Judith Fitt, Bruce. Impacts of climate change on wheat anthesis and Fusarium ear blight in the UK// *European Journal of Plant Pathology.* - 2011. - Vol. 130. - P. 117-131.
33. Amtmann A., Troufflard S., Armengaud P. The effect of potassium nutrition on pest and disease resistance in plants// *Physiol Plant.* - 2008. - Vol. 133(4). - P. 682-691.
34. Goel A.K., Lundberg D., Torres M.A., The *Pseudomonas syringae* type III effector HopAM1 enhances virulence on water-stressed plants// *Mol Plant Microbe Interact.* - 2008. - Vol. 21(3). - P. 361-370.

**А.Ж. Бектурова, У.И. Аманбаева, А.Б. Курманбаева, К.Е. Жанасова,
Р.Ж. Ермухамбетова, Ж.Б. Глеукулова, Б.Ж. Гадильгереева, Р.Т. Омаров, Ж.К. Масалимов**
Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Нұр-Сұлтан, Қазақстан

Тотығу стрессінің өсімдіктердің антиоксиданттық қорғанысына әсері

Аңдатпа. Мақалада *Nicotiana benthamiana* өсімдіктерінің антиоксиданттық қорғаныс жүйесіне температуралық стресстің және вирустық инфекцияның ұзақ мерзімді аралас әсері зерттелді. Биотикалық және абиотикалық факторлардың біріккен әсерінен туындаған тотығу стрессі *Nicotiana benthamiana* өсімдіктер жапырақтарында қоздырғыштың дамуына екі жақты әсер ететінін көрсетті. Мақалада *Nicotiana benthamiana* өсімдіктерінің жапырақтарындағы реактивті оттегі түрлерінің мазмұнына ыстық-суық күйзеліс және вирустық инфекция әсерінің біркелкі еместігі көрсетілген. Осылайша, төмен температуралық кернеу өсімдік жапырақтарында супероксид радикалының жинақталу деңгейінің жоғарылауына әкелетіні, ал біріктірілген кернеудің әсері супероксид радикалы жинақталуының жоғарылауына әкелмейтіні көрсетілген. Суық стресс пен вирустық инфекцияның бірлескен әсері сутегі асқын тотығының жоғарылауына әкелді, ал каталаза белсенділігі төмендеді. Бұл ретте температуралық стресс жағдайында альдегидоксидаза белсенділігінің күрт артуы байқалды. Ферменттің ең жоғары белсенділігі төмен температура мен вирустық инфекцияның бірлескен әсерінен байқалды. Осылайша, өсімдік тіндеріндегі тотығу стрессі патогендік шабуылға жауап ретінде өсімдік ұлпасындағы реактивті оттегі түрлерінің жинақталуының тепе-теңдігіне жауап беретін ферменттерге әсер ете отырып, реактивті оттегі түрлерінің жинақталу деңгейінің жоғарылауына әкеледі деп болжауға болады.

Кілт сөздер: температуралық стресс, *Nicotiana benthamiana*, tbsv вирусы, оттегінің белсенді түрлері, ферменттер.

**A.Zh. Bekturova, U.I. Amanbayeva, A.B. Kurmanbayeva, K.Y. Zhanassova, R.Zh. Yermukhambetova,
Zh.B. Tleukulova, B.Zh. Gadilgerееva, R.T. Omarov, Zh.K. Masalimov**
L.N. Gumilyov Eurasian National University, Nur-Sultan, Kazakhstan

Influence of oxidative stress on antioxidant response protection of plants

Abstract. The effect of long-term combined exposure to temperature stress and viral infection on the antioxidant defense system of *Nicotiana benthamiana* plants was studied in this work. It was shown that oxidative stress caused by the combined action of biotic and abiotic factors has an ambiguous effect on the development of the pathogen in the leaves of *Nicotiana benthamiana* plants. The article shows the heterogeneity of the impact of heat and cold stress and viral infection on the content of reactive oxygen species in the leaves of *Nicotiana benthamiana* plants. Thus, it was shown that low-temperature stress led to an increase in the level of accumulation of superoxide radical in plant leaves, while the effect of combined stress did not lead to a greater increase in the accumulation of superoxide radical. The combined effect of cold stress and viral infection led to an increase in the content of hydrogen peroxide, while there was reduced catalase activity. At the same time, a sharp increase in aldehyde oxidase activity was observed under temperature stress. The highest activity of the enzyme was observed under the combined effect of low temperature and viral infection. Thus, it can be assumed that oxidative stress in plant tissues leads to an increase in the level of accumulation of reactive oxygen species while affecting the enzymes responsible for the balance of accumulation of reactive oxygen species in plant tissue in response to a pathogen attack.

Keywords: temperature stress, *Nicotiana benthamiana*, TBSV virus, reactive oxygen species, enzymes.

References

1. Kolupaev Y.E, Karpec Y.V. Aktivnye formy kisloroda pri adaptacii rastenij k stressovym temperaturam, *Fiziologiya i biohimiya kul'turnyh rastenij*, 41(2), 95-108 (2009). [in Russian].
2. Baxter A., Mittler R., Suzuki N. ROS as key players in plant stress signalling, *J. Exp. Bot.*, 65, 1229-1240 (2014).
3. Babenko O.N, Brychkova G, Sagi M, Alikulov Z.A. Molybdenum application enhances adaptation of crested wheatgrass to salinity stress, *Acta Physiol. Plant*, 37, 14 (2015).
4. Atkinson N.J., Urwin P.E. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field, *J Exp Bot.*, 63, 3523-3543 (2012).
5. Mittler R. Abiotic stress, the field environment and stress combination, *Trends Plant Sci.*, №11, 15-19, (2006).
6. Nostar O., Ozdemir F., Bor M., Turkan I., Tosun N. Combined effects of salt stress and cucurbit downy mildew (*Pseudoperospora cubensis* Berk. and Curt. Rostov.) infection on growth, physiological traits and antioxidant activity in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedling, *Physiol Mol Plant Pathol.*, 83, 84-92 (2013).
7. Ramegowda V., Senthil-Kumar M. The interactive effects of simultaneous biotic and abiotic stresses on plants: Mechanistic understanding from drought and pathogen combination, *Journal of Plant Physiology*, 176, 47-54 (2015).
8. Tippmann H.F., Schlüter U., Collinge D.B. Common themes in biotic and abiotic stress signalling in plants (Global Science Books, Middlesex, UK, Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology, 2006, 52-67).

9. Rivero R.M., Mestre T.C., Mittler R.O.N., Rubio F., Garcia Sanchez F., Martinez V. The combined effect of salinity and heat reveals a specific physiological, biochemical and molecular response in tomato plants, *Plant Cell Environ.*, 37, 1059-1073 (2013).
10. Zhanassova K., Kurmanbayeva A.B., Gadilgereyeva B., Yermukhambetova R.Zh., Iksat N., Amanbayeva U.I., Bekturova A.Zh., Tleukulova Zh.B., Omarov R.T., Masalimov Zh.K. ROS status and antioxidant enzyme activities in response to combined temperature and drought stresses in barley, *Acta Physiologiae Plantarum*, 43(8), 1-12 (2021).
11. Kariola T., Brader G., Jing L., Palva T. Chlorophyllase 1, a damage control enzyme, affects the balance between defense pathways in plants, *The Plant Cell.*, 17(1), 282-294 (2005).
12. Fryer M.J., Oxborough K., Mullineaux P.M., Baker N.R. Imaging of photo-oxidative stress responses in leaves. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1249-1254 (2002).
13. Zarepour M., Simon K., Wilch M. Identification of superoxide production by *Arabidopsis thaliana* aldehyde oxidases AAO1 and AAO3, *Plant Mol Biol.*, 80(6), 659-671 (2012).
14. Weydert C.J., Cullen J.J. Measurement of superoxidedismutase, catalase and glutathioneperoxidase in cultured cells and tissue, *Nat Protoc.*, 5, 51-66 (2009).
15. Kuo W.Y., Huang C., Chun Shih, Jinn T.L. Cellular Extract Preparation for Superoxide Dismutase (SOD), *Activity Assay*, 3, 3-5 (2013).
16. MacLeod R.M., Farkas W., Fridovich I., Handler P. Enzymatic Assay of SULFITEOXIDASE (EC 1.8.3.1), *BiolChem.*, 236(1841), 1-4, (1961).
17. Srivastava S., Brychkova G., Yarmolinsky D., Soltabayeva A., Samani T., Sagi M. Aldehyde Oxidase 4 Plays a Critical Role in Delaying Silique Senescence by Catalyzing Aldehyde Detoxification, *Plant Physiol.*, 173(4), 1977-1997 (2017).
18. Gumulec J., Raudenska M., Hlavna M., Stracina T., Sztalmachova M., Tanhauserova V., Pacal L., Ruttkay-Nedecky B., Sochor J., Zitka O., Babula P., Adam V., Kizek R., Novakova M., Masarik M. Determination of oxidative stress and activities of antioxidant enzyme in guinea pigs treated with haloperidol, *Exp Ther Med.*, 5(2), 479-484 (2013).
19. Kariola T., Brader G., Jing L., Palva T. Chlorophyllase 1, a damage control enzyme, affects the balance between defense pathways in plants, *The Plant Cell.*, 17(1), 282-294 (2005).
20. Neill S.J., Desikan R., Clarke A., Hurst R.D., Hancock J.T. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants, *J Exp Bot.*, 53(372), 1237-47 (2002).
21. Takahashi M.A., Asada K. Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids, *Arch Biochem Biophys*, 15, 226(2), 558- 566 (1983).
22. Dat J., Vandenabeele S., Vranova E., van Montagu M., Inze D., van Breusegem F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses, *Cell Mol Life Sci.*, 57(5), 779-795 (2000).
23. Zhang L., Pilar Soengas, Victor M. Rodriguez, Pablo Velasco, Maria Elena Cartea. Effect of Temperature Stress on Antioxidant Defenses in Brassica Oleracea, *ACS Omega*, 3, 5237-5243 (2018).
24. Kolmykova T.S., Klokova E.V., SHarkaeva E.SH. Vliyanie 6-bap na aktivnost' katalazy rastenij tomata v usloviyah temperaturnogo stressa, *Samarskij nauchnyj vestnik*, 2(11), 96-99 (2015). [in Russian].
25. Suzuki N., Rivero R.M., Shulaev V., Blumwald E., Mittler R. Abiotic and biotic stress combinations, *New Phytol*, 203, 32-43 (2014).
26. Yergaliyev T., Nurbekova Z., Mukiyanova G., et al. The involvement of ROS producing aldehyde oxidase in plant response to *Tombusvirus* infection, *PlantPhysiolBiochem.*, 109, 36-44 (2016).
27. Madhusudhan K.N., Srikanta B.M., Shylaja M.D., Prakash H.S., Shetty H.S. Changes in antioxidant enzymes, hydrogen peroxide, salicylic acid and oxidative stress in compatible and incompatible host-tobamovirus interaction, *Journal of Plant Interactions*, 4(3), 157-166 (2009).
28. Yesbergenova Z., Yang G., Oron E., Soffer D., Fluhr R., Sagi M. The plant Mo-hydroxylases aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase have distinct reactive oxygen species signatures and are induced by drought and abscisic acid, *The Plant Journal*, 42, 862-876 (2015).

29. Zarepour M., Simon K., Wilch M. Identification of superoxide production by *Arabidopsis thaliana* aldehyde oxidases AAO1 and AAO3, *Plant Mol Biol.*, 80(6), 659-671 (2012).
30. Szittyá G., Silhavy D., Molnár A., Havelda Z., Lovas A., Lakatos L., Banfalvi Z., Burgyan J. Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation, *The EMBO Journal*, 22, 633-640 (2003).
31. Luck J., Spackman M., Freeman A., Trebicki P., Griffiths W., Finlay K., Chakraborty S. Climate change and diseases of food crops, *Plant Pathology*, 60, 113-121 (2011).
32. Madgwick James., West, Jon White, Rodger Semenov, Mikhail Townsend, James Turner, Judith Fitt, Bruce. Impacts of climate change on wheat anthesis and Fusarium ear blight in the UK, *European Journal of Plant Pathology*, 130, 117-131 (2011).
33. Amtmann A., Troufflard S., Armengaud P. The effect of potassium nutrition on pest and disease resistance in plants, *Physiol Plant*, 133(4), 682-691 (2008).
34. Goel A.K., Lundberg D., Torres M.A., The *Pseudomonas syringae* type III effector HopAM1 enhances virulence on water-stressed plants, *Mol Plant Microbe Interact*, 21(3), 361-370 (2008).

Сведения об авторах:

Бектурова А.Ж. – кандидат биологических наук, и.о. доцента кафедры биотехнологии и микробиологии факультета естественных наук, Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, ул. Сатпаева, 2, Нур-Султан, Казахстан.

Аманбаева У.И. – докторант кафедры общей биологии и геномики факультета естественных наук, Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, ул. Сатпаева, 2, Нур-Султан, Казахстан.

Курманбаева А.Б. – PhD, кафедра биотехнологии и микробиологии факультета естественных наук, Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, ул. Сатпаева, 2, Нур-Султан, Казахстан.

Жанасова К.Е. – докторант кафедры общей биологии и геномики факультета естественных наук, Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, ул. Сатпаева, 2, Нур-Султан, Казахстан.

Ермухамбетова Р.Ж. – старший преподаватель кафедры биотехнологии и микробиологии факультета естественных наук, Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, ул. Сатпаева, 2, Нур-Султан, Казахстан.

Тлеукулова Ж.Б. – докторант кафедры общей биологии и геномики факультета естественных наук, Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, ул. Сатпаева, 2, Нур-Султан, Казахстан.

Гадильгереева Б.Ж. – магистрант кафедры биотехнологии и микробиологии факультета естественных наук, Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, ул. Сатпаева, 2, Нур-Султан, Казахстан.

Омаров Р.Т. – кандидат биологических наук, профессор кафедры биотехнологии и микробиологии факультета естественных наук, Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, ул. Сатпаева, 2, Нур-Султан, Казахстан.

Масалимов Ж.К. – кандидат биологических наук, доцент кафедры биотехнологии и микробиологии факультета естественных наук, Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, ул. Сатпаева, 2, Нур-Султан, Казахстан.

Bekturova A.Zh. – Associate Professor of the Department of Biotechnology and Microbiology, L.N. Gumilyov Eurasian National University, 2 Satpayev str., Nur-Sultan, Kazakhstan.

Amanbayeva U.I. – graduate student of the Department of General biology and Genomics, L.N. Gumilyov Eurasian National University, 2 Satpayev str., Nur-Sultan, Kazakhstan.

Kurmanbayeva A.B. – PhD, senior lecturer of the Department of Biotechnology and Microbiology, L.N. Gumilyov Eurasian National University, 2 Satpayev str., Nur-Sultan, Kazakhstan.

Zhanassova K.Y. – graduate student of the Department of General biology and Genomics, L.N. Gumilyov Eurasian National University, 2 Satpayev str., Nur-Sultan, Kazakhstan.

Yermukhambetova R.Zh. – Senior Lecturer of the Department of Biotechnology and Microbiology, L.N. Gumilyov Eurasian National University, 2 Satpayev str., Nur-Sultan, Kazakhstan.

Tleukulova Zh.B. – Graduate student of the Department of General Biology and Genomics, L.N. Gumilyov Eurasian National University, 2 Satpayev str., Nur-Sultan, Kazakhstan.

Gadilgereeva B.Zh. – Master student of the Department of Biotechnology and Microbiology, L.N. Gumilyov Eurasian National University, 2 Satpayev str., Nur-Sultan, Kazakhstan.

Omarov R.T. – Associate Professor of the Department of Biotechnology and Microbiology, L.N. Gumilyov Eurasian National University, 2 Satpayev str., Nur-Sultan, Kazakhstan.

Masalimov Zh.K. – Associate Professor of the Department of Biotechnology and Microbiology, L.N. Gumilyov Eurasian National University, 2 Satpayev str., Nur-Sultan, Kazakhstan.