

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 581.144.2:581.825.2

Участие активных форм кислорода и антиоксидантных ферментов в формировании аэренхимы корня ячменя в условиях гипоксии**М.В. Малыгин*** , **Л.А. Васенькова**, **М.П. Показаньева**, **И.С. Киселева** *Кафедра экспериментальной биологии и биотехнологий, Уральский федеральный университет, Россия, 620062, г. Екатеринбург, ул. Мира, д. 19***e-mail: astett8@gmail.com*

Доступность кислорода является важным фактором в жизни растений. Его недостаток приводит к гипоксии, которая может возникнуть при избыточном увлажнении подземных частей растений. Для преодоления гипоксии у многих растений образуется лизигенная аэренхима, выполняющая функции снабжения кислородом. Механизмы образования аэренхимы не до конца ясны. В данной работе изучены анатомо-морфологические и физиолого-биохимические изменения в тканях коры корня ячменя (*Hordeum vulgare* L.) при формировании аэренхимы в условиях гипоксии, создаваемой в гидропонной среде. Дефицит кислорода тормозил рост корней, снижал интенсивность дыхания, но не оказывал влияние на развитие надземной части. На 8-е сут роста в условиях гипоксии в корнях концентрация H_2O_2 повышалась в 2,6 раза по сравнению с контролем (условия аэрации среды) и формировалась аэренхима. Накопление H_2O_2 происходило на фоне низкой активности антиоксидантных ферментов. К 28-м сут в условиях гипоксии активность разных форм пероксидаз увеличивалась, что приводило к снижению концентрации H_2O_2 в корнях до уровня контрольных значений. Сделано предположение о том, что на ранних этапах гипоксии увеличение содержания H_2O_2 служит для запуска образования аэренхимы, на более поздних этапах — усиление антиоксидантной активности приводило к нейтрализации активных форм кислорода, обеспечивая выживание корней и целого растения.

Ключевые слова: *Hordeum vulgare*, корни, гипоксия, аэренхима, активные формы кислорода, пероксидазы

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-2-6

Введение

Кислород является важным фактором в жизни всех аэробных организмов. Растения как фотосинтезирующие организмы наполняют атмосферу кислородом, обеспечивая жизнь на Земле. Однако в современных природных условиях растения могут сталкиваться с кислородной недостаточностью, или гипоксией [1]. В последние десятилетия все чаще фиксируются отклонения от средних многолетних значений температуры, осадков, атмосферного давления [2]. Это приводит к масштабным изменениям погоды в разных регионах, в том числе к обильным осадкам и масштабным наводнениям [2]. Все чаще происходят события, приводящие к подтоплению и переувлажнению сельскохозяйственных земель [2–4]. Известно, что в этом случае корни сельскохозяйственных растений, например, кукурузы, пшеницы, ячменя и др. испытывают гипоксию [5, 6]. Поэтому изучение влияния переувлажнения и вызванной им гипоксии на растения представляется актуальным.

При гипоксии снижается интенсивность дыхания (ИД) [7, 8], что оказывает негативное влияние на поглощение минеральных элементов корнем, поскольку значительная часть ионов поглощается растением из почвы путем активного транспорта и требует энергии. Так, при гипоксии поглощение таких элементов как калий, кальций, фосфор, азот и магний у злаков может снижаться в 2–10 раз [9]. При сильной продолжительной гипоксии снижается интенсивность фотосинтеза, что показано на кукурузе, рисе и пшенице [10, 11]. Как следствие, у злаков наблюдается уменьшение биомассы корней [11–15] и надземной части растений [10, 11, 14, 15]. У культурных растений это приводит к серьезным потерям в урожайности (более 30%) [16, 17]. Понимание процессов приспособления растений к гипоксии позволит разработать новые агротехники и агроприемы для преодоления этого стресса.

Адаптация растений к гипоксии связана с физиолого-биохимическими и морфо-анатомическими

изменениями [5, 18]. Одной из реакций на гипоксию является формирование специализированной ткани аэренхимы. Она участвует в проведении и запасании кислорода в корнях и стеблях растений при его дефиците. Формирование аэренхимы хорошо изучено с точки зрения анатомии растений. Лизигенная аэренхима образуется путем частичного лизиса клеток коры корня в результате программируемой клеточной смерти (ПКС) [6]. Этот процесс контролируется этиленом и сопряжен с синтезом активных форм кислорода (АФК) [6, 19–24] и активных форм азота (АФА) [19, 25, 26], образующихся при гипоксии на этапе образования аэренхимных лакун. Регуляторами содержания АФК и АФА являются ферменты каталазы, супероксиддисмутаза и пероксидазы [14, 19], а также такие антиоксиданты, как металлотионеины [6]. Биохимические и молекулярные механизмы участия ПКС в формировании лизигенной аэренхимы не полностью исследованы.

Для изучения развития аэренхимы в условиях длительного недостатка кислорода нами был выбран ячмень. Он широко выращивается по всему миру, в том числе в России [27]. Ячмень является чувствительным к гипоксии злаком наряду с пшеницей и овсом [28], и в условиях гипоксии у него образуется аэренхима. Особенно сильно ячмень и другие злаки страдают от дефицита кислорода на стадии проростков, что вызывает серьезный риск снижения урожайности [28].

Целью данного исследования было изучение параметров про-/антиоксидантного статуса и дыхательной способности корней ячменя при гипоксии, в процессе образования аэренхимы. Для этого искусственно создавали гипоксические условия при выращивании растений в гидропонной культуре и фиксировали образование аэренхимных лакун с помощью электронной микроскопии.

Материалы и методы

Условия выращивания. Семена ячменя *Hordeum vulgare* L. сорта Памяти Чепелева для проращивания замачивали на сетках, погруженных на 0,5 см в гидропонные сосуды объемом 1 л с водопроводной водой. На 2-е сут роста проростки переносили в 3-литровые сосуды с аэрацией (контроль) и без аэрации (опыт). Фотопериод составил 16 ч/8 ч (свет/темнота), освещенность — $300 \text{ мкмоль} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$, температуру поддерживали на уровне 22–25°C. Первые 7 сут проростки росли в водопроводной воде, на 8-е сут воду заменяли 50%-ным раствором Хогланда [29]. Уровень растворов поддерживали выше основания корней на 0,5 см. Раствор Хогланда в сосудах меняли каждые 5 сут. Отбор материала производили в момент образования аэренхимы (8 сут) и резкого увеличения объема лакун — на 28-е сут [30, 31].

Концентрацию кислорода в сосудах измеряли с помощью кислородомера АНИОН А7000 (НПП

«Инфраспек-Аналит», Россия). В сосудах без аэрации уровень кислорода понижался уже через 10 ч после смены раствора до $2 \text{ мг} \times \text{л}^{-1}$, а на следующие сутки — до $0,5\text{--}1,5 \text{ мг} \times \text{л}^{-1}$, что соответствует условиям гипоксии. В аэрируемых сосудах уровень кислорода был от $8,5 \text{ мг} \times \text{л}^{-1}$ до $10,3 \text{ мг} \times \text{л}^{-1}$.

Морфология проростков. Для измерения морфологических показателей отбирали по 10 контрольных и опытных растений. У каждого растения была измерена максимальная длина семенных корней и побега; определена сырая и сухая масса корней и побегов. Для определения сухой массы растения фиксировали в сухожаровом шкафу 10 мин при 105°C, а затем высушивали до постоянного веса при 70°C.

Парциальный объем аэренхимных лакун. Аэренхима интенсивнее образуется у основания корней [22, 30, 32], поэтому для микроскопических исследований у 5–6 растений отбирали фрагменты базальной части семенных корней (отступ от основания 1 см, длина фрагмента 2,5–3,0 см), фиксировали их в 2,5%-ном глутаровом альдегиде на фосфатном буфере (pH 7,0). Фиксированные участки далее замораживали в жидком азоте и высушивали в лиофилизаторе Labconco FreeZone 2.5 L (Labconco, США). Лиофильно высушенные образцы использовали для сканирующей электронной микроскопии с использованием прибора EVO LS 10 (Carl Zeiss, Германия). На фотографиях отмечали анатомические структуры корня (ризодерму, кору, стелу, аэренхиму при наличии); изображения обрабатывали в программе Photoshop 2019 (Adobe, США). Для измерения проективной поверхности анатомических структур на поперечных срезах использовали программу ImageJ (NIH, США). Парциальный объем лакун вычисляли по отношению площади лакун к площади коры и выражали в процентах: $S_{\text{лакун}} \times S_{\text{коры}}^{-1} \times 100 (\%)$.

Дыхание корней. Интенсивность дыхания корней оценивали по выделению CO_2 с использованием системы для изучения газообмена растений LI-COR LI-6400XT (LiCor, США) при температуре 25°C. Измерения проводили у отобранных случайным образом 5 интактных растений каждого варианта. У каждого растения корневую систему целиком помещали в камеру прибора. После 5-минутной адаптации в темноте каждые 10 с в течение 5 мин измеряли количество выделенного CO_2 и выражали в $\text{мкмоль CO}_2 \times \text{г}^{-1} \text{сухой массы} \times \text{сек}^{-1}$.

Биохимические показатели. Пробы для определения активности ферментов отбирали из базальной части семенных корней в 5 биологических повторностях, каждая из которых была получена путем объединения 5–6 растений. Активность антиоксидантных ферментов: гваяколовой пероксидазы (ГПО) [33], бензидиновой пероксидазы (БПО) [34], аскорбатпероксидазы (АПО) [35] и каталазы (КАТ) [36] определяли по стандартным методикам. Количество супероксидного анион-

радикала измеряли в соответствии с описанной ранее методикой [37], H_2O_2 — согласно Беллинкампи и соавт. [38] и уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) — согласно Хелз и Пакер [39].

Статистический анализ. Статистическую обработку данных проводили с помощью ANOVA с использованием критерия Тьюки для неравных объемов выборки. Статистический анализ был выполнен в программе Statistica 13 (TIBCO Software Inc., США). На рисунках представлены средние значения показателей и их стандартные ошибки. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Аэренхима развивалась у растений только в условиях гипоксии (рис. 1А–Г). На 8-е сут роста ячменя проективная поверхность аэренхимных лакун в корне занимала $14,7 \pm 2,9\%$, а на 28-е сут — $23,7 \pm 1,3\%$ от проективной поверхности первичной коры ($F = 14,83$, $p < 0,001$). Гипоксия не влияла на развитие надземной части расте-

ний ячменя — длина и сухая биомасса побега не различались в контроле и опыте 8-е и 28-е сут роста растений (рис. 1). Рост корневой системы при гипоксии угнетался. В первые 8 сут длина корней была в 1,5 раза меньше, чем в контроле, а на 28-е сут — в 2,4 раза. Абсолютная скорость роста корней при аэрации среды составила $12,5 \text{ мм} \times \text{сут}^{-1}$, а без аэрации — $3,5 \text{ мм} \times \text{сут}^{-1}$. Биомасса корней при гипоксии также была ниже, чем у растений в условиях аэрации (рис. 1Д–З).

Биохимические показатели у опытных и контрольных растений разного возраста отличались друг от друга. У 8-суточных растений накопление супероксидного анион-радикала в базальной части семенных корней было выше в условиях гипоксии. У 28-суточных — как в условиях гипоксии, так и в условиях нормоксии — содержание супероксидного радикала было выше, чем в 8-суточном возрасте, при этом между вариантами различий не было (рис. 2А). Содержание H_2O_2 у контрольных растений в базальной части корня было одинаковым на 8-е сут роста ячменя ($3,7 \text{ мкмоль} \times \text{г сырой}$

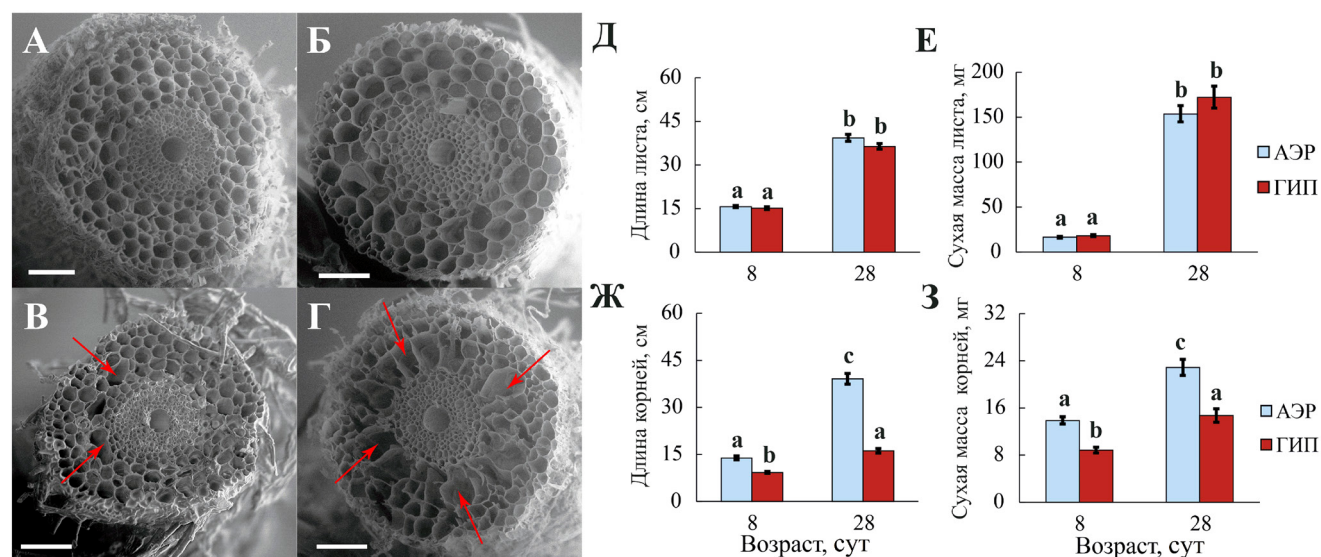


Рис. 1. Анатомо-морфологические характеристики растений ячменя в условиях гипоксии и нормоксии. Поперечные срезы базальной части корней аэрируемых (А, Б) и неаэрируемых (В, Г) растений 8- (А, В) и 28-суточного (Б, Г) возраста. Размеры и биомасса корней и побега: Д — максимальная длина листа, Е — сухая биомасса побега, Ж — максимальная длина семенных корней, З — сухая биомасса семенных корней. Разные буквы обозначают значимые различия по критерию Тьюки ($p < 0,05$). ГИП — гипоксия, условия без аэрации, АЭР — условия с аэрацией. Размер линейки — 100 мкм

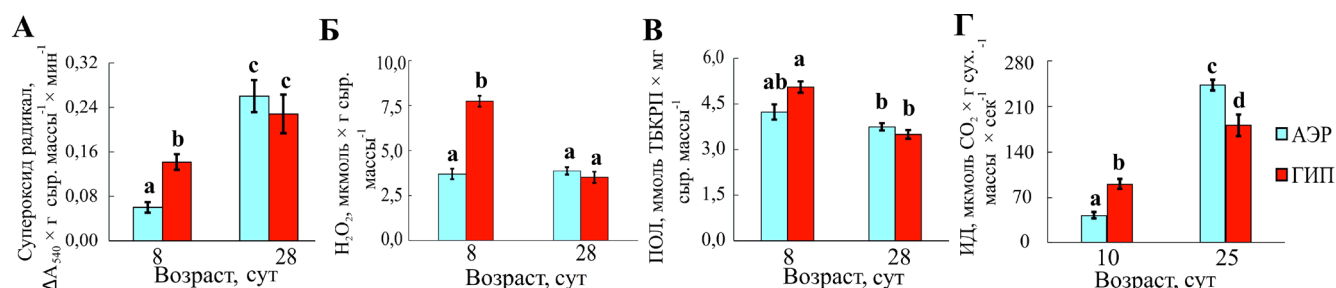


Рис. 2. Содержание супероксидного анион-радикала (А), H_2O_2 (Б), интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) (В) и интенсивность дыхания (ИД) (Г) в базальной части семенных корней ячменя. Разными буквами обозначены значимые различия по критерию Тьюки для неравных объемов выборок (Б, В, Г) ($p < 0,05$). ГИП — гипоксия, условия без аэрации, АЭР — условия с аэрацией. ТБКРП — ТБК-реагирующие продукты

массы⁻¹) и на 28-е сут роста (3,9 мкмоль × г сырой массы⁻¹). При гипоксии на 8-е сут роста растения накапливали H₂O₂ в 2,5 раза больше, чем контрольные растения (7,7 мкмоль × г сырой массы⁻¹), а на 28-е сут его содержание было на уровне контроля (3,5 мкмоль × г сырой массы⁻¹) (рис. 2Б). В корнях 8-суточных растений интенсивность ПОЛ была незначительно выше в условиях гипоксии и уменьшалась к 28-м сут роста до уровня контрольных растений (рис. 2В).

ИД корней значительно возрастала в процессе их роста. При этом в молодых корнях (10 сут) ИД в контрольном варианте была в 2 раза меньше, чем при гипоксии. В 25-суточном возрасте в условиях аэрации ИД была, напротив, выше, чем в гипоксических условиях (рис. 2Г).

На начальном этапе роста ячменя (8 сут) активность ферментов ГПО, БПО и АПО в условиях гипоксии была немного выше, чем в контроле, хотя значимыми были отличия только для АПО. К 28-м сут активность ферментов в условиях гипоксии значительно возрастала, тогда как у аэрируемых растений в корнях осталась неизменной (рис. 3А–В). Активность каталазы в корнях ячменя ни в контрольном, ни опытном варианте не детектировалась (рис. 3Г).

Обсуждение

В настоящем эксперименте гипоксия, смоделированная в условиях гидропоники без аэрации, замедляла, но не прекращала рост корней ячменя. Такой же эффект описан для пшеницы в условиях гидропоники при разных температурных режимах

[13]. Рост побегов в условиях гипоксии не подавлялся (рис. 1). Растения стремятся сохранить максимально возможную в условиях гипоксии ростовую активность корней для поддержания их поглощающей способности [9]. Формирование аэренхимы в корне необходимо для поддержания дыхания и физиологической активности клеток и тканей этого органа, что было показано, в том числе, для ячменя [6, 40, 41]. В условиях аэрации питательного раствора аэренхима не образовывалась (рис. 1). Ранее мы установили, что у проростков ячменя при росте в гидропонной среде без аэрации аэренхима образуется в 2 этапа: первые лакуны начинают формироваться на 8-е сут, а на 28-е сут происходит значительное увеличение их объемов [30]. В первые сутки формирования аэренхимы в условиях гипоксии выделение CO₂ корнями ячменя было больше, чем в аэрируемых условиях (рис. 2Г), что согласуется с данными, полученными другими авторами на пшенице [13]. Авторы полагают, что повышение интенсивности дыхания может быть связано с аккумуляцией сахаров, вызванной ослаблением поглощающей способности и ограничением роста корней, вызванных дефицитом кислорода в среде. Усиление дыхания корней в 28-суточном возрасте (рис. 2Г) совпадало по времени с началом кущения растений ячменя (рис. 1). В условиях аэрации дыхание возрастало сильнее, чем в условиях гипоксии. Такие же закономерности описаны в соответствующих обзорах для большого спектра видов растений [7, 8].

Объемы выделяемого углекислого газа определяются особенностями метаболических путей.

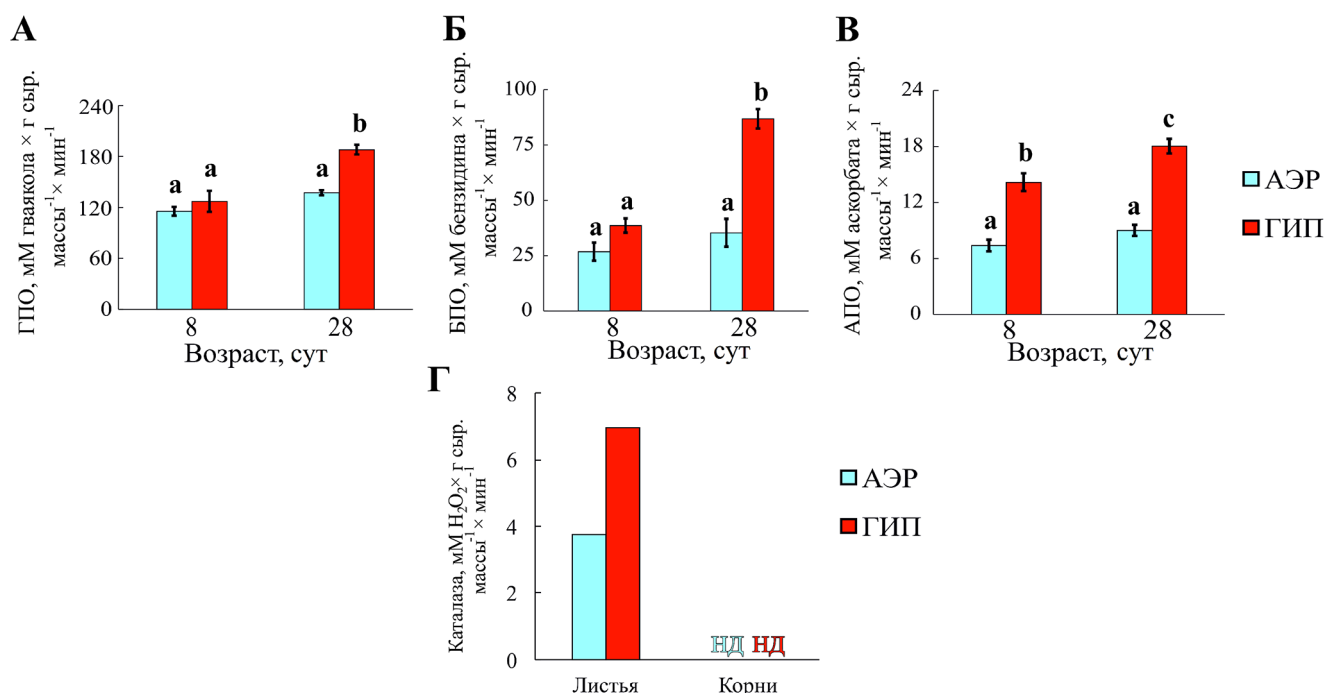


Рис. 3. Активность ферментов гваяколовой пероксидазы (А), бензидиновой пероксидазы (Б) и аскорбатпероксидазы (В) в базальной части семенных корней ячменя; активность каталазы (Г) в корнях и листьях ячменя. Разные буквы обозначают значимые различия по критерию Тьюки для неравных объемов выборок ($p < 0,05$). ГИП – гипоксия, условия без аэрации, АЭР – условия с аэрацией

Источником CO_2 являются кислородное дыхание и процессы брожения [41, 42]. При дефиците кислорода подавляется аэробный путь дыхания, при котором соотношение между дыхательным субстратом, например, глюкозой, и выделением CO_2 теоретически составляет 1:6. При этом растет интенсивность анаэробных процессов, главным образом, спиртового брожения [43], при котором на 1 моль субстрата выделяется 2 моля CO_2 . Переход с аэробного метаболизма на анаэробный в условиях гипоксии хорошо известен. Однако пока не все детали этого перехода до конца понятны [44]. Образование аэренхимных лакун при гипоксии сопряжено с уменьшением количества живых клеток коры [45], следовательно, количество CO_2 как продукта аэробного и анаэробных окислительных путей метаболизма падает.

Как известно, лизигенная аэренхима образуется под влиянием АФК, которые повреждают клеточные структуры, что приводит к лизису клеток и образованию аэренхимы [6, 18]. На 8-е сут роста ячменя, когда образуется аэренхима (рис. 1) [30, 31], у гипоксичных растений содержание $\text{O}_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 было значительно больше, чем у аэрируемых (рис. 2А, Б). Как известно, в условиях гипоксии после получения клеткой этиленового сигнала активируется НАДФ-Н-оксидаза (reactive burst oxidase homolog, RВОН), которая участвует в продукции супероксидного радикала [46]. Далее супероксиддисмутаза превращает $\text{O}_2^{\cdot-}$ в H_2O_2 , который накапливается в тканях [14, 47]. Высокое содержание H_2O_2 в условиях гипоксии может являться причиной увеличения интенсивности ПОЛ у 8-дневных растений (рис. 2В). На данном этапе АФК могут являться не столько повреждающими клетки агентами, сколько сигнальными молекулами в индукции ПКС [6, 47] при формировании лизигенной аэренхимы.

Высокий уровень H_2O_2 в тканях корня в условиях гипоксии на 8-е сут может быть объяснен низкой активностью пероксидаз (ГПО и БПО) (рис. 3А–В). При этом активность АПО была значимо выше у гипоксичных растений, чем у контрольных (рис. 3В). Вероятно, АПО раньше начала разлагать H_2O_2 при гипоксии. У высших растений различные изоформы АПО могут встречаться в разных клеточных компартментах, включая хлоропласты, митохондрии, пероксисомы

и цитозоль, что позволяет тонко и быстро регулировать уровень H_2O_2 [48]. Показано, что АПО может действовать как регулятор сигнализации H_2O_2 [49]. На 28-е сут на этапе увеличения объемов аэренхимы количество H_2O_2 снижалось до уровня контрольных растений, что связано с увеличением активности пероксидаз (рис. 2Б, 3А–В). Активность каталазы не была обнаружена в корнях (рис. 3Г). Этот фермент имеет более высокие значения константы Михаэлиса-Ментен, чем пероксидазы [50], и, соответственно, низкую удельную активность. В работе Емельянова и др. [51] было показано, что активность каталазы в корнях значительно ниже, чем в побегах. Высокая активность пероксидаз в условиях гипоксии на 28-е сут приводила к снижению содержания H_2O_2 . В этот период заканчивалось формирование аэренхимы [30, 31], что подтверждают и другие авторы [14, 22]. Можно полагать, что АФК служат для запуска процесса образования аэренхимы и стресс-ответа клетки. В условиях продолжительной гипоксии активация антиоксидантных ферментов приводила к снижению содержания АФК.

Заключение

Таким образом, в условиях продолжительной гипоксии рост и дыхание корней были подавлены, что приводило к снижению метаболических и энергогенерируемых процессов при дефиците кислорода. На 8-е сут эксперимента у опытных растений в корнях появлялась аэренхима, которая обеспечивала приток кислорода в орган. Образование аэренхимы в этот период было связано с накоплением $\text{O}_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 , которые затем утилизировались антиоксидантными ферментами. Вероятно, АФК играли сигнальную роль при формировании аэренхимы. На более поздних этапах развития ячменя (28-е сут) количество H_2O_2 снижалось до уровня контроля, хотя аэренхима продолжала увеличиваться в размерах. Таким образом, можно предположить, что H_2O_2 являлся индуктором образования аэренхимы, но не контролировал дальнейшее увеличение ее объемов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Работа выполнена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых.

СПИСОКЛИТЕРАТУРЫ

1. van Dongen J.T., Licausi F. Oxygen sensing and signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2015;66(1):345–367.
2. Zhang S., Zhou L., Zhang L., Yang Y., Wei Z., Zhou S., Yang D., Yang X., Wu X., Zhang Y., Li X., Dai Y. Reconciling disagreement on global river flood changes in a warming climate. *Nat. Clim. Change.* 2022;12(12):1160–1167.
3. Bailey-Serres J., Lee S.C., Brinton E. Waterproofing crops: effective flooding survival strategies. *Plant Physiol.* 2012;160(4):1698–1709.
4. Кошкин Е.И., Андреева И.В., Гусейнов Г.Г. Влияние глобальных изменений климата на продуктивность и устойчивость сельскохозяйственных культур к стрессорам. *Агрохимия.* 2019;(12):83–96.
5. Чиркова Т.В. *Физиологические основы устойчивости растений*. СПб: Изд-во С.-Петер. Ун-та; 2002. 244 с.
6. Takahashi H., Yamauchi T., Colmer T.D., Nakazono M. Aerenchyma formation in plants. *Low-oxygen stress in plants: Oxygen sensing and adaptive responses to hypoxia*. Eds.

- J.T. van Dongen and F. Licausi. Vienna: Springer Vienna; 2014:247–265.
7. Loreti E., Perata P. The many facets of hypoxia in plants. *Plants*. 2020;9(6):745.
 8. Jethva J., Schmidt R.R., Sauter M., Selinski J. Try or die: dynamics of plant respiration and how to survive low oxygen conditions. *Plants*. 2022;11(2):205.
 9. Colmer T.D., Greenway H. Ion transport in seminal and adventitious roots of cereals during O₂ deficiency. *J. Exp. Bot.* 2011;62(1):39–57.
 10. Bragina T.V., Drozdova I.S., Ponomareva Y.V., Alekhin V.I., Grineva G.M. Photosynthesis, respiration, and transpiration in maize seedlings under hypoxia induced by complete flooding. *Dokl. Bot. Sci.* 2002;384(1):274–277.
 11. Mustrup A., Albrecht G. Tolerance of crop plants to oxygen deficiency stress: fermentative activity and photosynthetic capacity of entire seedlings under hypoxia and anoxia. *Physiol. Plant.* 2003;117(4):508–520.
 12. Feng K., Wang X., Zhou Q., Dai T., Cao W., Jiang D., Cai J. Waterlogging priming enhances hypoxia stress tolerance of wheat offspring plants by regulating root phenotypic and physiological adaption. *Plants*. 2022;11(15):1969.
 13. Araki H., Hossain M.A., Takahashi T. Waterlogging and hypoxia have permanent effects on wheat root growth and respiration. *J. Agron. Crop Sci.* 2012;198(4):264–275.
 14. de Souza K.R.D., de Oliveira Santos M., Andrade C.A., da Silva D.M., Campos N.A., Alves J.D. Aerenchyma formation in the initial development of maize roots under waterlogging. *Theor. Exp. Plant Physiol.* 2017;29(4):165–175.
 15. Zeng F., Konnerup D., Shabala L., Zhou M., Colmer T.D., Zhang G., Shabala S. Linking oxygen availability with membrane potential maintenance and K⁺ retention of barley roots: implications for waterlogging stress tolerance. *Plant Cell Environ.* 2014;37(10):2325–2338.
 16. de San Celedonio R.P., Abeledo L.G., Miralles D.J. Identifying the critical period for waterlogging on yield and its components in wheat and barley. *Plant Soil.* 2014;378(1):265–277.
 17. Liu K., Harrison M.T., Ibrahim A., Manik S.M.N., Johnson P., Tian X., Meinke H., Zhou M. Genetic factors increasing barley grain yields under soil waterlogging. *Food Energy Secur.* 2020;9(4):e238.
 18. van Dongen J.T., Licausi F. *Low-oxygen stress in plants: oxygen sensing and adaptive responses to hypoxia*. Vienna: Springer Vienna; 2014. 426 pp.
 19. Wany A., Gupta K.J.. Reactive oxygen species, nitric oxide production and antioxidant gene expression during development of aerenchyma formation in wheat. *Plant Signaling Behav.* 2018;13(2):e1428515.
 20. Steffens B., Steffen-Heins A., Sauter M. Reactive oxygen species mediate growth and death in submerged plants. *Front. Plant Sci.* 2013;4:179.
 21. Tong C., Hill C.B., Zhou G., Zhang X.-Q., Jia Y., Li C. Opportunities for improving waterlogging tolerance in cereal crops-physiological traits and genetic mechanisms. *Plants (Basel)*. 2021;10(8):1560.
 22. Xu Q.T., Yang L., Zhou Z.Q., Mei F.Z., Qu L.H., Zhou G.S. Process of aerenchyma formation and reactive oxygen species induced by waterlogging in wheat seminal roots. *Planta*. 2013;238(5):969–982.
 23. Yamauchi T., Watanabe K., Fukazawa A., Mori H., Abe F., Kawaguchi K., Oyanagi A., Nakazono M. Ethylene and reactive oxygen species are involved in root aerenchyma formation and adaptation of wheat seedlings to oxygen-deficient conditions. *J. Exp. Bot.* 2014;65(1):261–273.
 24. Шиков А.Е., Чиркова Т.В., Емельянов В.В. Функции активных форм кислорода в растительных клетках в норме и при адаптации. *Экол. ген.* 2021;19(4):343–363.
 25. Basu S., Kumari S., Kumar A., Shahid R., Kumar S., Kumar G. Nitro-oxidative stress induces the formation of roots' cortical aerenchyma in rice under osmotic stress. *Physiol. Plant.* 2021;172(2):963–975.
 26. Wany A., Kumari A., Gupta K.J. Nitric oxide is essential for the development of aerenchyma in wheat roots under hypoxic stress. *Plant Cell Environ.* 2017;40(12):3002–3017.
 27. Food and agricultural organization. FAOSTAT [Электронный ресурс]. 2023. URL: <https://www.fao.org/faostat/ru/#data/QCL> (Дата обращения: 05.05.2023).
 28. Setter T.L., Waters I. Review of prospects for germplasm improvement for waterlogging tolerance in wheat, barley and oats. *Plant Soil.* 2003;253(1):1–34.
 29. Schneider H.M., Wojciechowski T., Postma J.A., Brown K.M., Lücke A., Zeisler V., Schreiber L., Lynch J.P. Root cortical senescence decreases root respiration, nutrient content and radial water and nutrient transport in barley. *Plant Cell Environ.* 2017;40(8):1392–1408.
 30. Malygin M., Kiseleva S. Aerenchyma formation in seminal roots of *Hordeum vulgare* in hydroponic conditions. *Biol. Comm.* 2024;69(3):136–148.
 31. Малыгин М.В., Киселева И.С. Развитие аэренхимальных лакун в корнях *Hordeum vulgare* в условиях гидропоники. *Биомика*. 2022;14(3):234–237.
 32. Yamauchi T., Tanaka A., Tsutsumi N., Inukai Y., Nakazono M. A Role for auxin in ethylene-dependent inducible aerenchyma formation in rice roots. *Plants*. 2020;9(5):610.
 33. Maehly A.C. The assay of catalases and peroxidases. *Methods of biochemical analysis*. Ed. R. Glick. N.-Y.: Interscience Publishing, Inc.; 1954:357–424.
 34. Goldfischer S., Essner E. Further observation on the peroxidatic activities of microbodies (peroxisomes). *J. Histochem. Cytochem.* 1969;17(10):681–685.
 35. Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 1981;22(5):867–880.
 36. Aebi H. Catalase. *Methods of Enzymatic Analysis*. Ed. H.U. Bergmeyer. N.-Y.: Academic Press; 1974:673–680.
 37. Chaitanya K.S.K., Naithani S.C. Role of superoxide, lipid peroxidation and superoxide dismutase in membrane perturbation during loss of viability in seeds of *Shorea robusta* Gaertn.f. *New Phytol.* 1994;126(4):623–627.
 38. Bellincampi D., Dipierro N., Salvi G., Cervone F., De Lorenzo G. Extracellular H₂O₂ induced by oligogalacturonides is not involved in the inhibition of the auxin-regulated *rolB* gene expression in tobacco leaf explants. *Plant Physiol.* 2000;122(4):1379–1386.
 39. Heath R. L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 1968;125(1):189–198.
 40. Семихатова О.А., Чиркова Т.В. Физиология дыхания растений. СПб: Изд-во С.-Петерб. Ун-та; 2001. 224 с.
 41. Armstrong W. Aeration in higher plants. *Adv. Bot. Res.* 1979(7):225–332.
 42. Armstrong W., Armstrong J. Plant internal oxygen transport (diffusion and convection) and measuring and modelling oxygen gradients. *Low-oxygen stress in plants: oxygen sensing and adaptive responses to hypoxia*. Eds. J.T. van Dongen and F. Licausi. Vienna: Springer Vienna; 2014:267–297.

43. Voesenek L.A.C.J., Bailey-Serres J. Flood adaptive traits and processes: an overview. *New Phytol.* 2015;206(1):57–73.
44. van Veen H., Triozzi P.M., Loreti E. Metabolic strategies in hypoxic plants. *Plant Physiol.* 2025;197(1):kia564.
45. Saengwilai P., Nord E.A., Chimungu J.G., Brown K.M., Lynch J.P. Root cortical aerenchyma enhances nitrogen acquisition from low-nitrogen soils in maize. *Plant Physiol.* 2014;166(2):726–735.
46. Yamauchi T., Yoshioka M., Fukazawa A., Mori H., Nishizawa N.K., Tsutsumi N., Yoshioka H., Nakazono M. An NADPH oxidase RBOH functions in rice roots during lysigenous aerenchyma formation under oxygen-deficient conditions. *The Plant Cell.* 2017;29(4):775–790.
47. Kreslavski V.D., Los D.A., Allakhverdiev S.I., Kuznetsov V.V. Signaling role of reactive oxygen species in plants under stress. *Russ. J. Plant Physiol.* 2012;59(2):141–154.
48. Li S. Novel insight into functions of ascorbate peroxidase in higher plants: more than a simple antioxidant enzyme. *Redox Biol.* 2023;64:102789.
49. Maruta T., Sawa Y., Shigeoka S., Ishikawa T. Diversity and evolution of ascorbate peroxidase functions in chloroplasts: more than just a classical antioxidant enzyme? *Plant Cell Physiol.* 2016;57(7):1377–1386.
50. Chelikani P., Fita I., Loewen P.C. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell. Mol. Life Sci.* 2004;(61):192–208.
51. Емельянов В.В., Ласточин В.В., Приказюк Е.Г., Чиркова Т.В. Активность каталазы и пероксидазы в растениях пшеницы и риса в условиях аноксии и постаноксической аэрации. *Физиол. раст.* 2022;69(6):675–690.

Поступила в редакцию 30.10.2024

После доработки 04.06.2025

Принята в печать 18.06.2025

RESEARCH ARTICLE

Reactive oxygen species and antioxidant enzymes participate in the formation of aerenchyma in barley root under hypoxia

M.V. Malygin^{*} , L.A. Vasenkova, M.P. Pokazanieva, I.S. Kiseleva 

Chair of Experimental Biology and Biotechnology, Ural Federal University, 19 Mira str., Ekaterinburg, 620062, Russia

^{*}e-mail: astett8@gmail.com

Molecular oxygen is an important factor in plant life. Its deficiency leads to hypoxia, which can occur with excessive moisture of the underground parts of plants. In response to hypoxia, many plants form lysigenous aerenchyma, which performs the functions of oxygen supply. The mechanisms of aerenchyma formation are not entirely clear. Our work describes the anatomical, morphological, physiological and biochemical changes in roots of barley (*Hordeum vulgare* L.) during the formation of aerenchyma under hypoxia in hydroponic conditions. Oxygen deficiency inhibited root growth and reduced the intensity of respiration rate in them, but did not affect the development of the aboveground organs. Under hypoxic conditions aerenchyma in roots was formed on the 8th day, which was associated with the 2.6-fold increase in the amount of H₂O₂ compared to the control. The low activity of antioxidant enzymes led to the high H₂O₂ level. By the 28th day under hypoxic conditions, the activity of benzidine, guaiacol and ascorbate peroxidases increased, which led to a decrease in the H₂O₂ concentration. We suppose, that the increase of H₂O₂ concentration in roots triggered the formation of aerenchyma at the early stages of their growth (day 8). Later, antioxidant enzymes utilized reactive oxygen species, ensuring the survival of the roots under hypoxic conditions.

Keywords: *Hordeum vulgare*, roots, hypoxia, aerenchyma, reactive oxygen species, peroxidases

Сведения об авторах

Малыгин Михаил Вячеславович — аспирант кафедры экспериментальной биологии и биотехнологий Уральского федерального университета. Тел.: 8-343-389-97-28; e-mail: astett8@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4602-2224>

Васенькова Людмила Александровна — студентка Уральского федерального университета. Тел.: 8-343-389-97-28; e-mail: ludmilavasenkova02@mail.ru

Показаньева Мария Павловна — магистрант Уральского федерального университета, тел.: Тел.: 8-343-389-97-28; e-mail: m.pokazanieva@yandex.ru

Киселева Ирина Сергеевна — к.б.н., зав. кафедрой экспериментальной биологии и биотехнологий Уральского федерального университета, тел.: Тел.: 8-343-389-97-28; e-mail: irina.kiseleva@urfu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8709-5203>