

Національна академія аграрних наук України
Інститут рослинництва імені В.Я. Юр'єва

**Оцінка стрес-протекторного впливу фізіологічно активних
речовин на зернові злаки
Науково-методичні рекомендації**

Харків — 2023

Друкується за рішенням ученої ради
Інституту рослинництва імені
В.Я. Юр'єва НААН України
(протокол № 9 від 24.10.2023 р.)

Оцінка стрес-протекторного впливу фізіологічно активних речовин на зернові злаки: Науково-методичні рекомендації / Укладачі: д-р біол. наук, проф. Колупаєв Ю.Є., д-р с.-г. наук Рябчун Н.І., канд. біол. наук Ястреб Т.О., д-р філософії (біол.) Кокорев О.І., м.н.с. Шахов І.В. - Харків, 2023. - 52 с.

Описано методику дослідження феноменології і механізмів дії сполук зі стрес-протекторними фізіологічними ефектами на модельних об'єктах — проростках зернових злаків за умов теплового та осмотичного стресів. Пропоновані протоколи містять опис не лише оцінки інтегральних фізіологічних показників стану рослинних об'єктів (ріст, виживаність), а й показників, що характеризують спричинювані стресорами пошкодження на клітинному рівні (стабільність мембран, показники окиснювального стресу), а також стан ключових стрес-протекторних систем — антиоксидантної та осмопротекторної. Ці протоколи можуть бути використані для первинного скринінгу фізіологічно активних речовин зі стрес-протекторною дією, оцінки генотипової чутливості рослин до дії сполук, які вже рекомендовані для використання як стрес-протектори, а також при проведенні фундаментальних досліджень механізмів дії нових класів (груп) сполук зі стрес-протекторною активністю.

Призначено для наукових працівників у галузі експериментальної біології рослин, викладачів і здобувачів біологічних спеціальностей закладів вищої освіти.

Рецензенти: д-р біол. наук, проф. Косаківська І.В. (*Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України*); д-р с.-г. наук Васько Н.І. (*Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України*)

© Інститут рослинництва імені В.Я. Юр'єва
НААН Україна, 2023

ВСТУП

Глобальні зміни в кліматичній системі нашої планети з кожним роком стають все більш очевидними. Так, зниження кількості доступної води на 40% від оптимального призводить до зменшення урожайності зернових культур на 20-40% (Daryanto et al., 2016). При цьому прогнозують, що до 2050 року потреби сільського господарства в прісній воді збільшаться, тоді як кількість доступної води може знизитися на 50% через кліматичні зміни (Gupta et al., 2020).

Нині на 40% територій помірного клімату Землі рослини зазнають впливу підвищених стресових температур. Зростання температури на кожен градус призводить до зниження загальносвітових урожаїв основних сільськогосподарських культур на 3-8%. При поєднанні ж дії високих температур із посухою може бути втрачено понад половину врожаю основних сільськогосподарських культур.

Водночас, незважаючи на підвищення середньорічної температури, для більшості країн Європи актуальність проблеми холодо- і морозостійкості рослин також посилюється. Зимові відлиги, що чергуються з раптовими морозами, призводять до серйозних ушкоджень і зниження урожайності озимих злаків. Більш раннє настання метеорологічної весни підвищує ймовірність ушкодження рослин внаслідок весняних заморозків.

Крім дії екстремальних температур і несприятливих умов зволоження посилюються і наслідки впливу на рослини засолення ґрунтів. За різними оцінками від 15 до 23% загальної площі земельної суші, включаючи території, що активно використовуються сільським господарством, покрито засоленими ґрунтами. В Україні площа засолених ґрунтів становить 1,92 млн га, з них 1,71 млн га перебуває в сільськогосподарському використанні. Ще 2,8 млн га є солонцевими (Балюк та ін., 2012). У світі майже 69% площ, на яких вирощується пшениця, перебувають під негативним впливом засолення ґрунту (Ісаєнков, 2012). Збільшення площі засолених територій, яке пов'язано з глобальними змінами клімату, зрошенням і збільшенням народонаселення, створює загрозу для здоров'я людей, національної економіки та екосистем (Munns, Tester, 2008; Flowers et al., 2010).

Як окрему проблему виділяють посилення впливу на рослини ксенобіотиків, зокрема, важких металів (Singh et al., 2016). Отже, стійкість до абіотичних стресових чинників стає базовою їх властивістю, необхідною для стабільної продуктивності та належної якості продукції.

Проблема стійкості рослин тією чи іншою мірою розв'язується шляхом використання селекційно-генетичних (традиційних методів селекції і

нових засобів генетичної інженерії) та фізіологічних підходів. Останні включають в себе широкий арсенал фітогормонів, їх синтетичних аналогів, а також сигнальних посередників і стресових метаболітів, які нерідко об'єднують терміном “біорегулятори”. Так чи інакше, розширення знань про сполуки, задіяні в регуляції адаптивних реакцій рослин, відкриває нові можливості як для використання ефективних екзогенних обробок рослин новими фізіологічно активними речовинами, так і для керування їх синтезом у рослин шляхом редагування геномів (Kosakivska et al., 2022; Raza et al., 2022).

За останні два десятиліття накопичено знання, які засвідчують, що активація адаптивних реакцій рослин відбувається не лише з участю “класичних” стресових фітогормонів (абсцизова кислота, етилен, брасиностероїди, саліцилова і жасмонова кислоти) (Kosakivska et al., 2022; Kavulych et al., 2023; Kolupaev et al., 2023a), й а розгалуженої сигнально-регуляторної мережі, до складу якої входять сигнальні посередники (кальцій, активні форми кисню, цАМФ, газотрансмітери (оксид азоту, сірководень, монооксид вуглецю та ін.)) (Kolupaev et al., 2022a), а також рослинні нейротрансмітери (мелатонін, серотонін, дофамін, ацетилхолін та γ -аміномасляна кислота) (Akula, Mukherjee, 2020; Raza et al., 2022) і деякі стресові метаболіти, зокрема, пролін і поліаміни (Dubrovna et al., 2022; Kolupaev et al., 2022b). При цьому донори газотрансмітерів, нові класи фітогормонів, рослинні нейротрансмітери, чимало стресових метаболітів вже заходять практичне використання як індуктори стійкості рослин і перелік цих сполук стрімко розширюється. Зважаючи на це, посилюється актуальність розробки експрес-методів оцінки фізіологічних (стрес-протекторних) ефектів таких речовин та вивчення механізмів їх дії. Такі дослідження потребують ширшого впровадження чутливих моделей. Використання адекватних модельних об'єктів значно прискорює дослідження, зменшує витрати матеріальних і людських ресурсів, а в окремих випадках дозволяє вирішувати наукові завдання, які неможливо виконати, застосовуючи інтактні активно вегетуючі рослини.

Протягом кількох останніх десятиліть основним модельним об'єктом в експериментальній біології рослин є *Arabidopsis thaliana* L., геном якого був повністю секвенований у 2000 році. Для забезпечення відповідних умов росту і розвитку рослин арабідопсису розробляються і публікуються детальні протоколи стосовно їх вирощування для різних експериментальних завдань (Scholl et al., 1998; Rivero et al., 2014). Зокрема, Центр біологічних ресурсів арабідопсису (ABRC) збирає і розробляє серії передових протоколів з вирощування рослин цього виду (Rivero et al., 2014).

Проте нові сполуки зі стрес-протекторною активністю ще на ранніх етапах досліджень розглядаються в контексті вирішення прикладних завдань, іншими словами, як потенційний інструмент для підвищення стійкості культурних рослин, серед яких найбільш значимими є зернові злаки. Зважаючи на це, екстраполяція даних, які можна одержати на популярному для фундаментальних фітофізіологічних досліджень об'єкті — рослинах арабідопсису, навряд чи може бути коректною. Таким чином, для дослідження стрес-протекторної дії нових фізіологічно активних сполук в прикладних аспектах необхідне відпрацювання відповідних методичних протоколів безпосередньо на культурних рослинах, насамперед, зернових злаках.

Зазвичай використання модельних об'єктів значно скорочує часові та економічні витрати на проведення досліджень як з оцінки стійкості сортів і ліній, перспективних для використання в селекції, так і зі скринінгу впливу на рослини екзогенних чинників, що модифікують стійкість. Найбільш популярними модельними об'єктами є інтактні рослини на ранніх фазах розвитку (Жук, Григорюк, 2002), ізольовані органи рослин та культури клітин (Rao et al., 1997; Hu et al., 2007). Кожен з таких об'єктів має свої переваги і недоліки. Зокрема, ізольовані органи відрізняються від інтактних рослин високою чутливістю до дії ФАР і швидкою фізіологічною відповіддю, а також дають змогу оцінювати окремі біохімічні показники методами неруйнівного контролю. Проте підготовка ізольованих органів до експерименту спричиняє ефект раневого стресу, який може змінювати як стійкість об'єкта, так і його реакцію на дію ФАР (Kolupaev et al., 2013).

Вказаних недоліків позбавлені моделі, що передбачають використання інтактних рослин на ранніх фазах розвитку, зокрема, етіюльованих проростків пшениці. Встановлено, що виживаність проростків пшениці різних сортів після прогріву у водяному термостаті за температури 45°C корелювала з польовою стійкістю відповідних генотипів, що визначалася за їх здатністю зберігати урожайність у несприятливі роки (Обозный и др., 2013). Етіюльовані проростки пропонується використовувати для порівняння теплостійкості сортів пшениці за їх ростовою реакцією на 4-годинний прогрів у повітряному термостаті за температури 45°C (Жук, Григорюк, 2002). Однак цей підхід стосується тільки оцінки генотипових відмінностей стійкості проростків пшениці. При цьому алгоритми досліджень функціонування стрес-протекторних систем (зокрема, антиоксидантної та осмопротекторної) залишаються невідпрацьованими.

Нашими дослідженнями, проведеними раніше, показана висока чутливість коренів інтактних проростків пшениці на дію різноманітних ФАР,

зокрема, стресових фітогормонів – саліцилової і жасмонової кислот (Карпец и др., 2016) та донорів газотрансмітерів – оксиду азоту (Karpets et al., 2021) і сірководню (Karpets et al., 2020).

У даних рекомендаціях описано методику дослідження феноменології і механізмів дії нових сполук зі стрес-протекторною дією на модельних об'єктах — проростках зернових злаків за дії високих температур та осмотичного стресу. Ці моделі останнім часом апробовано авторами при дослідженні ефектів таких нових ФАР, як мелатонін і гамма-аміномасляна кислота. Пропоновані протоколи містять опис не лише оцінки інтегральних фізіологічних показників (ріст, виживаність), а й показників, що характеризують спричинювані стресорами пошкодження на клітинному рівні (стабільність мембран, показники окиснювального стресу), а також стан ключових стрес-протекторних систем — антиоксидантної та осмопротекторної. Ці протоколи можуть бути використані для первинного скринінгу ФАР зі стрес-протекторною дією, оцінки генотипової чутливості рослин до дії ФАР, які вже рекомендовані для використання як стрес-протектори, а також при проведенні фундаментальних досліджень механізмів дії нових класів (груп) ФАР зі стрес-протекторною активністю. Водночас при опису протоколів досліджень автори вказують на можливі обмеження застосування моделей та екстраполяції результатів, отриманих на модельних об'єктах на дорослі рослини в полевих умовах.

I. МЕТОДИКА ПІДГОТОВКИ РОСЛИННОГО МАТЕРІАЛУ

Основна частина експериментів виконується з використанням 3-4-добових проростків озимих злаків. Ми наводимо методику, що використовувалася нами для досліджень реакції на стресові чинники і дію ФАР рослин м'якої (*Triticum aestivum*) і твердої (*T. durum*) пшениці, жита (*Secale cereale*), а також тритикале (\times *Triticosecale*).

Залежно від завдань досліджень можуть бути застосовані декілька модифікацій дизайну експериментів.

1.1. Дослідження впливу ФАР на стійкість проростків злаків до потенційно летального теплового стресу

Суть експерименту полягає в обробці коренів етіюльованих проростків досліджуваними ФАР (зазвичай протягом доби), наступному впливі потенційно летального теплового стресу і оцінці виживаності після стресу. Обробка коренів ФАР спричиняє швидку їх реакцію-відповідь, яку можна зафіксувати за рядом показників: зміни генерації активних форм кисню (АФК), оксиду азоту, активності про-/антиоксидантних ферментів тощо. Деякі

показники можуть бути визначені методами неруйнівного контролю в інтактних коренях. Використання інтактних коренів як об'єкта дослідження дає змогу застосовувати при вивченні механізмів дії ФАР інгібіторний метод — обробку коренів поглиначами певних сигнальних молекул, інгібіторами ферментів сигнальних систем, блокаторами кальцієвих каналів тощо. Вказаний дизайн експериментів доцільно використовувати переважно в фундаментальних дослідженнях, спрямованих на з'ясування саме механізмів дії нових ФАР. Водночас досліджуваними ФАР можуть оброблятися і зернівки перед їх пророщуванням (праймінг). Така методика може застосовуватися для вирішення прикладних завдань — швидкого тестування прояву стрес-протекторної активності досліджуваних речовин за передпосівної обробки. Проте обробка речовинами зернівок малопридатна для застосування інгібіторних методів досліджень механізмів дії ФАР.

Протокол процедури пророщування насіння і визначення теплостійкості проростків. Насіння пшениці або іншої злакової культури зі схожістю не менше 70-80% в хімічному стакані промити дистильованою водою, далі залити 70% етанолом і витримати не більше 2 хвилин, спирт злити і залити насіння 2% розчином гіпохлориту натрію (NaClO). За відсутності реактиву можна використовувати побутовий засіб “Білизна”, розбавлений дистильованою водою у 10 разів. Насіння витримати у розчині хлорвмісного знезаражувача протягом 15 хвилин, після чого 8-10 разів промити дистильованою водою, залити ще однією порцією дистильованої води і витримати у ній протягом 30-40 хвилин. Знезаражене насіння розкласти в стерильні чашки Петрі з розрахунку 200 зернівок на чашку, додавши 5 мл дистильованої води. Насіння пророщувати в темному термостаті за температури 24°C протягом 3 діб. Отримані проростки приблизно однакового розміру розкласти відповідно до варіантів експерименту в чашки Петрі з 18-20 мл дистильованої води з розрахунку 30 проростків на кожен чашку. Проростки витримати у воді протягом 1 год, після чого додати досліджувані ФАР або інгібітори для отримання їх робочої концентрації. При дослідженні ефектів нових сполук обов'язковим етапом має бути встановлення концентраційної залежності впливу цих ФАР. Якщо метою експерименту передбачено застосування інгібіторного аналізу, відповідні інгібітори (наприклад, поглиначі сигнальних молекул, блокатори кальцієвих каналів або інгібітори ферментів певних сигнальних систем) у заздалегідь вибраних концентраціях вносять у чашки Петрі за 2 год до внесення основної досліджуваної ФАР. Інкубацію проростків на досліджуваних розчинах зазвичай проводять протягом 24 год за температури 24°C у термостаті. Контрольні проростки інкують на дистильованій воді.

Після закінчення часу інкубації зразки проростків прогривають у марлевих мішечках в стакані з дистильованою водою, вміщеному у ванну ультратермостату за температури 44-46°C протягом 10 хв (температура прогріву має підтримуватися з точністю $\pm 0,2^\circ\text{C}$). Вибір температури прогріву залежить від видових і сортових особливостей проростків злаків, для більшості сортів пшениці оптимальною є температура 45°C, яка спричиняє загибель 30-70% зразків. Після прогріву проростки охолоджують у дистильованій воді до кімнатної температури і переносять для відростання у чашки Петрі з дистильованою водою. Через 2-3 доби відрощування за температури 20-25°C і освітлення 8-12 клк візуально оцінюють виживаність проростків. До категорії мертвих відносять проростки, які мають некрози більше 50% площі поверхні і припиняють ріст.

1.2. Дослідження впливу ФАР на стійкість проростків злаків до помірного (сублетального) теплового стресу

Сублетальні теплові стреси поширені в природі, відповідні умови можуть виникати не лише у літній, а й у весняний і осінній періоди. Зважаючи на це, дослідження впливу ФАР на стійкість проростків помірних теплових стресів має безпосереднє практичне значення, оскільки такий вплив може захищати проростки в період їх перебування в гарячому ґрунті та на його поверхні. У таких експериментах як прийом обробки ФАР може використовуватися прамінг насіння. Насіння обробляється протягом кількох годин досліджуваними розчинами ФАР. Надалі у класичній процедурі праймінгу передбачається висушування обробленого насіння. Після цього оброблене насіння замочується у воді для пророщування за звичною процедурою. Далі оцінюється теплостійкість проростків за ростою реакцією на високу температуру з використанням методу, запропонованого О.І. Жук та І.П. Григорюком (Pat. 45879 UA, 2002). Через певний час після стресового впливу оцінюється приріст коренів і пагонів проростків у дослідних (із стресовим впливом) і контрольному (без стресу) варіантах і розраховується показник інгібування росту.

Протокол процедури пророщування насіння і визначення ростових показників проростків. Насіння зі схожістю не менше 70-80% в хімічному стакані промити дистильованою водою, далі залити 70% етанолом і витримати не більше 2 хвилин, спирт злити і залити насіння 2% розчином гіпохлориту натрію. Насіння витримати у розчині протягом 15 хвилин, після чого 8-10 разів промити дистильованою водою, залити ще однією порцією дистильованої води і витримати у ній протягом 30-40 хвилин. Далі незаражене насіння обробляють досліджуваними ФАР, занурюючи його у

відповідні розчини на 2-24 год. Час інкубації, який забезпечує найбільш помітний стрес-протекторний ефект, визначають у попередніх експериментах. За таких самих умов насіння контрольних варіантів занурюють на відповідний час у дистильовану воду і надалі пророщують за умов, ідентичних для всіх варіантів.

Після обробки (праймінгу) насіння пророщують впродовж трьох діб в термостаті за температури $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Після цього оцінюють теплостійкість проростків за ростовою реакцією на високу температуру з використанням методу, запропонованого О.І. Жук та І.П. Григорюком (<https://uapatents.com/2-45879-sposib-ocinki-zharostijjnosti-sortiv-ozimo-pshenici.html>) з нашими модифікаціями. Дослідні проростки протягом 5 год піддають прогріву у відкритих чашках Петрі у повітряному термостаті за температури $45 \pm 1^\circ\text{C}$ і відносної вологості повітря 42–45%, проростки контрольного варіанта у цей час залишають в термостаті з температурою 24°C і вологістю повітря 60–70%. Для недопущення підсихання коренів фільтрувальний папір у чашках через кожну годину зволожують однаковою кількістю дистильованої води відповідної температури. Після закінчення прогріву проростки дослідних варіантів знову переносять в термостат з температурою 24°C . Для кожного варіанта визначають приріст протягом доби біомаси пагонів і коренів за формулою:

$$I = \frac{(C_2 - C_1) - (E_2 - E_1)}{C_2 - C_1} \cdot 100\%$$

де I – інгібування росту (%); C_1 і C_2 , E_1 і E_2 – відповідно, початкові і кінцеві величини біомаси коренів або пагонів у контрольних і дослідних (тепловий стрес) варіантах.

1.3. Дослідження впливу ФАР на стійкість проростків до модельної посухи (осмотичного стресу, створюваного ПЕГ 6000)

Для вирівнювання рослинного матеріалу зернівки злаків пророщують протягом двох діб за оптимальних умов, після чого відбирають проростки однакового розміру і переносять на розчини непроникного осмотика ПЕГ 6000, на яких вирощують ще протягом двох діб (контроль — продовження вирощування проростків на воді). У варіантах з випробуванням дії ФАР їх розчини додають безпосередньо у середовище для вирощування проростків. Після дводобового росту проростків на середовищі з ПЕГ 6000 визначають показник інгібування росту, вимірюючи маси коренів і пагонів у контрольному (без стресу) і дослідних (з дією ПЕГ) варіантах.

Протокол процедури пророщування зернівок злаків для визначення впливу ФАР на стійкість проростків до осмотичного стресу. Насіння пшениці або іншої злакової культури зі схожістю не менше 70-80% в хімічному стакані промити дистильованою водою, далі залити 70% етанолом і витримати не більше 2 хвилин, спирт злити і залити насіння на 15 хв 2% розчином гіпохлориту натрію. Після цього 8-10 разів промити дистильованою водою, залити ще однією порцією дистильованої води і витримати у ній протягом 30-40 хвилин. Знезаражене насіння розкласти в стерильні чашки Петрі з орієнтовного розрахунку 200 зернівок на чашку, додавши 5 мл дистильованої води. Насіння пророщувати в темному термостаті за температури 24°C протягом 2 діб. Отримані проростки приблизно однакового розміру розкласти відповідно до варіантів експерименту в чашки Петрі з двома шарами фільтрувального паперу і 10 мл дистильованої води або 15% розчину ПЕГ з розрахунку 50 проростків на кожен чашку. Досліджувані ФАР вносять в необхідних концентраціях в інкубаційний розчин відповідних варіантів. Протягом однієї доби (третьої з моменту пророщування) проростки інкубують у закритих чашках в термостаті за температури 24°C. Після цього чашки відкривають, проростки контрольних варіантів зволожують 5-7 мл дистильованої води, у чашки дослідних варіантів (з ПЕГ) у разі необхідності для запобігання пересихання коренів додають по 1 мл дистильованої води. Через добу (на четверту добу від початку експерименту) визначають біомасу пагонів і коренів проростків (кожне повторення має складатися не менш, ніж з 30 проростків). Інгібування росту, спричинюване дією ПЕГ визначають за формулою:

$$I = 100 - (E/C \cdot 100\%),$$

де I інгібування росту (%); C та E сира маса органів проростків в контрольному та експериментальному варіантах, відповідно.

2. МЕТОДИКА СУПУТНИХ БІОХІМІЧНИХ АНАЛІЗІВ

Паралельно з визначенням інтегральних фізіологічних показників, що відображають стрес-протекторні ефекти досліджуваних ФАР (виживаність проростків, накопичення біомаси та/або лінійний ріст за стресових умов), зазвичай проводять ряд біохімічних аналізів, які характеризують стрес-протекторні ефекти досліджуваних сполук. Спектр показників може відрізнитися залежно від природи досліджуваних сполук, особливостей видів рослин, на яких вони випробовуються, і, головне, наукових завдань експерименту. Ми розглядаємо найбільш типові показники, що характеризують стан захисних систем рослин.

2.1. Показники генерації активних форм кисню, розвитку окиснювального стресу і пошкоджень мембран

Під терміном АФК розуміють сукупність реакційноздатних форм кисню, що взаємно перетворюються, більшість з яких існує короткий час (від наносекунд до сотень секунд). Серед них виділяють вільнорадикальні частинки – супероксидний аніон-радикал ($O_2^{\cdot-}$), гідроксильний ($\cdot OH$) та гідропероксильний (HO_2^{\cdot}) та ін., а також нейтральні молекули, такі як пероксид водню (H_2O_2), синглетний кисень (1O_2) та ін. (Gill, Tuteja, 2010). Баланс між утворенням та утилізацією АФК жорстко регулюється великою мережею генів, що активуються за дії стресорів.

Генерація АФК у рослин відбувається у клітинних стінках, плазматичній мембрані, хлоропластах, мітохондріях, пероксисомах та, ймовірно, в інших компартментах. Процес фотосинтезу є одним із основних джерел утворення АФК у клітинах зелених рослин. Супероксидний аніон-радикал є головним первинним продуктом відновлення молекулярного кисню в хлоропластах. Фотоіндукована генерація АФК переважно залежить від умов довкілля та від фізіологічного стану фотосинтетичного апарату. При обмеженні фіксації CO_2 в умовах дії посухи, засолення, високих температур та інших стресорів пул НАДФН витрачається слабо, внаслідок цього відбувається «відплив» електрона від ферредоксину до молекулярного кисню з генерацією супероксидного аніон-радикала, який дає початок для утворення інших АФК, зокрема, відносно стабільних молекул пероксиду водню.

ФС II розглядається як основне джерело синглетного кисню. Він утворюється в результаті переходу хлорофілу P_{680} в триплетний стан в реакційних центрах ФС II та/або у світлозбиральному комплексі. Ймовірність утворення синглетного кисню збільшується при перевідновленості електрон-транспортного ланцюга внаслідок поглинання світла високої інтенсивності чи дії інших стрес-факторів. При зменшенні фіксації CO_2 та перевідновленості електрон-транспортного ланцюга активується фотодихання, під час якого відбувається регенерація НАДФ⁺. Частина реакцій фотодихання відбувається у пероксисомах, які є ще одним джерелом АФК. Окиснення гліколевої кислоти, що утворюється в хлоропластах, гліколатоксидазою в пероксисомах призводить до утворення H_2O_2 . Також пероксид водню у пероксисомах може утворюватися при β -окисненні жирних кислот.

Мітохондрії, як і хлоропласти, містять велику кількість переносників електронів. Окиснювально-відновний потенціал тих з них, які утворюють початкові та середні ділянки ланцюга, часто виявляється негативнішим, ніж –

0,3 В (потенціал пари $O_2/O_2^{\cdot-}$). Це означає, що випадкова взаємодія даних переносників з молекулярним киснем може призвести до одноелектронного відновлення O_2 до $O_2^{\cdot-}$. Швидкість генерації АФК у мітохондріях залежить насамперед від ступеня відновленості електронно-транспортного ланцюга та мембранного потенціалу. Дисипація мембранного потенціалу відбувається при окиснювальному фосфорилуванні АДФ. Тому, якщо в мітохондріях достатньо АДФ і він активно фосфорилується, дисипація протонного градієнта знижує мембранний потенціал та ймовірність генерації $O_2^{\cdot-}$.

АФК утворюються не лише у внутрішньоклітинних структурах, а й в апопласті. Особливе значення у генерації АФК в апопласті має НАДФН-оксидаза. Цей ферментний комплекс відновлює молекулярний кисень з утворенням супероксидного аніон-радикала.



У реакції використовується цитоплазматичний НАДФН, електрони від якого за участю ФАД та гемі переносяться через мембрану на зовнішню її сторону до молекулярного кисню з утворенням супероксидного аніон-радикала.

Регуляторна та ушкоджувальна дія АФК реалізується шляхом їх взаємодії з ліпідами, білками та ДНК. АФК є ініціаторами пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ), окислення білків та ДНК. Під процесом ПОЛ традиційно розуміють вільнорадикальне окиснення поліненасичених жирних кислот.

У невеликих концентраціях АФК (насамперед пероксид водню) виконують функції сигнальних сполук. Помірне і (головне) короткочасне зростання їх вмісту за стресових умов часто слугує сигналом для запуску адаптивних реакцій рослин. При цьому з участю АФК відбувається модифікація тіолових груп регуляторних білків (протеїнкіназ, протеїнофосфатаз, деяких факторів регуляції транскрипції). Ця модифікація і є важливою складовою редокс-сигналіngu.

Проте при неконтрольованому накопиченні в клітинах АФК, порушенні систем їх знешкодження відбувається розвиток окиснювального стресу, що призводить до порушення редокс-регуляції, а в кінцевому підсумку може спричинити руйнування біомакромолекул і мембранних структур. Саме через це антиоксидантна система вважається однією з ключових стрес-протекторних систем живих організмів.

Як маркери розвитку окиснювального стресу у рослинних клітинах найчастіше використовують показники генерації супероксидного аніон-

радикала, вмісту пероксиду водню і одного з кінцевих продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) малонового діальдегіду (МДА). Останній показник є найбільш стабільним і найчастіше використовується саме для характеристики окиснювальних пошкоджень. Показники генерації АФК і розвитку окиснювального стресу можуть змінюватися за дії на рослини ФАР із стрес-протекторними властивостями. І зміни їх кількості можуть бути як ознакою активації сигнальних процесів, так і глибоких пошкоджень. Тому контроль цих показників при дослідженні сполук зі стрес-протекторною дією дає важливу інформацію про їх ефективність, а у деяких випадках і про сигнальні механізми дії ФАР.

Через високу реакційну здатність та короткий час існування аналіз вмісту АФК є складним завданням. Водночас нині існують досить надійні і відносно прості способи визначення показників розвитку окиснювального стресу у рослинних об'єктах.

2.1.1. Визначення генерації супероксидного аніон-радикала органами проростків злаків. Через дуже невеликий термін життя супероксидного аніон-радикала віддають перевагу визначенню не статичного його вмісту, а генерації тканинами *in vivo*, застосовуючи методи неруйнівного контролю. Суть одного з таких методів полягає у перетворенні нітросинього тетразолію на формазан зі специфічним бузковим забарвленням. При зануренні коренів, пагонів або цілих проростків у розчин з нітросинім тетразолієм відбувається вказане перетворення (Kolupaev et al., 2013). Для посилення ефекту в інкубаційний розчин додають детергент (зазвичай Тритон Х 100). Через певний час після занурення зразків візуально відзначають інтенсивність їх забарвлення та спектрофотометрично абсорбцію інкубаційного розчину.

Протокол аналізу. Для аналізу генерації супероксидного радикала клітинами пагонів злаків по 10 пагонів однакового розміру поміщають на 1 год бюкси з 5 мл 0,1 М К, Na-фосфатного буферу (рН 7,6) з додаванням 0,05% нітросинього тетразолію, 10 мкМ ЕДТА та 0,1% Тритону Х-100. Після закінчення експозиції пагони обережно вилучають з бюксів та вимірюють на спектрофотометрі абсорбцію інкубаційного розчину за довжини хвилі 530 нм.

При визначенні генерації супероксидного аніон-радикала клітинами коренів необхідно враховувати їх високу чутливість до механічного подразнення, яке призводить до активації АФК-сигналіngu і, відповідно, тимчасового посилення генерації АФК. В бюкси поміщають цілі інтактні проростки так, щоб зануреними у розчин були лише корені. Через 20 хв

проростки обережно дістають з інкубаційного розчину і вимірюють його абсорбцію при 530 нм. Результати виражають у відносних одиницях.

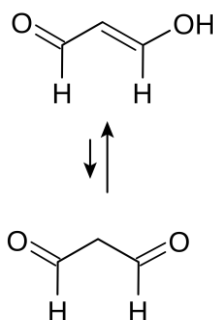
2.1.2. Визначення вмісту пероксиду водню у рослинному матеріалі.

Одним з простих методів визначення вмісту пероксиду водню у рослинних зразках є феритіоціанатний метод (Sagisaka, 1976). Його суть полягає в окисненні Fe^{2+} до Fe^{3+} пероксидом водню з наступним визначенням абсорбції розчину роданіду заліза $\text{Fe}(\text{SCN})_3$.

Протокол аналізу. Для визначення вмісту пероксиду водню пагони або корені проростків на холоді гомогенізують в 5% розчині трихлороцтової кислоти (ТХО), зазвичай співвідношення становить 0,3 г рослинного матеріалу на 10 мл екстрагенту. Проби центрифугують при 8000 g протягом 10 хв за температури 2–4° С і в супернатанті визначають концентрацію H_2O_2 . Для цього в реакційні пробірки вносять по 0,5 мл 2,5 М роданіду амонію, додають 0,5 мл 50% ТХО, 1,5 мл супернатанту рослинного матеріалу та 0,5 мл розчину солі Мора (сульфат заліза (II) — амонію в концентрації 4 мг/мл). У контрольну пробу вносять ті ж самі реактиви за винятком солі Мора. Замість неї в контрольні зразки вносять 0,5 мл дистильованої води. Вимірювання проводять за довжини хвилі 480 нм. Як стандарт використовують H_2O_2 . Результати виражають у нмоль/г сирової речовини.

2.1.3. Визначення вмісту 2-тіобарбітурат-активних продуктів пероксидного окиснення ліпідів у рослинному матеріалі.

Основною сполукою, що реагує з 2-тіобарбітуровою кислотою (2-ТБК) кислотою, є малоновий діальдегід, що вважається одним з основних кінцевих продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ):



МДА здатний ушкоджувати мембрани і ДНК. Підвищений вміст МДА є маркером розвитку окиснювального стресу. При використанні прийомів, що дозволяють підвищувати стійкість рослин до дії стресорів, вміст МДА

може служити тестом на ефективність обраного способу. У біохімічних дослідженнях найчастіше використовують метод, в основі якого здатність МДА реагувати з 2-ТБК, утворюючи забарвлений продукт, кількість якого можна виміряти за абсорбцією при 532 нм. При цьому зазвичай від основного результату вимірювань віднімають величину, виміряну при 600 нм (неспецифічне поглинання, пов'язане з наявністю розчинних вуглеводів).

Протокол аналізу. Наважку рослинного матеріалу масою 300 мг гомогенізувати в 10 мл реакційного середовища, що містить 0,25% 2-тіобарбітурову кислоту в 10% ТХО, гомогенат в пробірках, закритих ковпачками з фольги, помістити в киплячу баню на 30 хв. Потім проби охолодити і центрифугувати 15 хв при 10000 g. Абсорбцію надосадової рідини визначити на спектрофотометрі при 532 нм (максимум світлопоглинання малонового діальдегіду) та 600 нм (для поправки на неспецифічне світлопоглинання). Розрахунок проводять за формулою:

$$X = (A_{532} - A_{600}) \cdot V_{\text{екстр.}} / k \cdot m,$$

де X – вміст МДА (мкмоль/г), A_{532} та A_{600} , абсорбція досліджуваного розчину за відповідних довжин хвиль, $V_{\text{екстр.}}$ - об'єм екстрагенту (мл); k – коефіцієнт молярної екстинкції МДА 156 мМ/см, m – маса зразка для екстракції, г.

2.1.4. Оцінка стану біологічних мембран за виходом речовин, що поглинають в області УФ-В. Вихід речовин, що поглинають в області УФ-В (переважно вільних олігонуклеотидів), є маркером окиснювальних пошкоджень мембран. За нормальних умов цей показник є низьким і, як правило, підвищується за стресових умов через вихід відповідних речовин крізь пошкоджені мембрани (Shkliarevskiy et al., 2020).

Протокол аналізу. Коріні інтактних проростків занурюють в стаканчики з дистильованою водою на 1 год, після чого відсікають корені від проростків і зважують. Абсорбцію інкубаційного розчину визначають при A_{252} та A_{264} на спектрофотометрі СФ 46 або іншому, характеристики якого передбачають можливість вимірювань у “далекому” ультрафіолеті. Вихід речовин розраховують в умовних одиницях як відношення усередненої величини, виміряної при зазначених довжинах хвилі, до маси коренів і виражають у відсотках до величин, обчислених для коренів проростків, що не піддавалися дії стресорів (контрольний варіант).

2.2. Основні показники стану антиоксидантної системи

Незважаючи на широке використання, термін “антиоксидант” не має загальноприйнятого визначення, що створює деякі складнощі в класифікації

речовин з антиоксидантними властивостями. Одним з простих і прийнятних в даний час вважається визначення, дане Halliwell, Gutteridge (2015), згідно з яким антиоксидант (АО) – будь-яка речовина, що запобігає, затримує або усуває окиснювальні пошкодження молекули-мішені. Щоправда, і таке визначення не охоплює всіх механізмів антиоксидантного захисту *in vivo*. Зокрема, під нього не підпадають речовини, що інгібують системи генерації АФК, а також сполуки, що забезпечують альтернативні процеси перенесення електронів, за яких ймовірність утворення АФК зменшується (наприклад, характерна лише для мітохондрії рослинних клітин альтернативна оксидаза).

Було чимало спроб систематизації АО за різними ознаками: молекулярною масою, механізмом дії, гідрофобністю та гідрофільністю (Gill, Tuteja, 2010). Відповідно до класифікації, що базується одночасно на механізмі дії та молекулярній масі, виділяють такі групи АО: 1) ферменти, що знешкоджують АФК (супероксиддисмутаза – СОД, каталаза, різні пероксидази); 2) ферменти детоксикації ліпідів (глутатіон S-пероксидаза, фосфоліпід-гідропероксид глутатіонпероксидаза та ін); 3) низькомолекулярні АО (глутатіон, аскорбінова кислота, фенольні сполуки, токофероли, каротиноїди та ін.); 4) регенератори активних форм АО (монодегідроаскорбатредуктаза, дегідроаскорбатредуктаза, глутатіонредуктаза) (Blokina et al., 2003).

В останні роки до АО також відносять деякі сполуки, для яких антиоксидантна функція не є основною, але які мають явно виражені антиоксидантні властивості і накопичуються у відповідь на дію стрес-факторів у великих кількостях, в першу чергу пролін і цукри (Liang et al., 2013; Колупаєв, Карпец, 2019), так звані “неспеціалізовані” АО.

Виділяють також АО прямої та непрямой дії. Якщо до категорії перших може бути включена більшість згаданих вище АО, то окреслити межі речовин з непрямой антиоксидантною дією дуже складно. До них можна віднести активатори антиоксидантних ферментів; речовини, що пригнічують реакції, які призводять до утворення АФК; індуктори генів, що кодують антиоксидантні ферменти та ін.

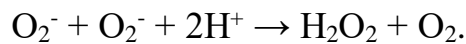
2.2.1. Визначення активності антиоксидантних ферментів.

Антиоксидантні ферменти є обов'язковими учасниками захисної відповіді рослин на дію стресових чинників. У багатьох дослідженнях показана кореляція між стійкістю видів та сортів рослин до дії стресових факторів і функціонуванням їх ферментативної антиоксидантної системи. Вплив індукторів стійкості (зокрема, ФАР) зазвичай супроводжується підвищенням активності антиоксидантних ферментів та посиленням експресії їх генів. Ми

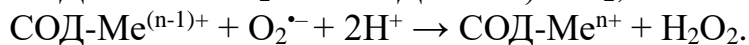
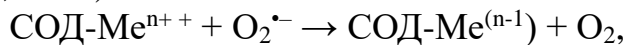
розглянемо лише прості і доступні методи визначення активності ключових антиоксидантних ферментів.

2.2.1.1. Супероксиддисмутаза (СОД). СОД (КФ 1.15.1.11) є ключовим ферментом антиоксидантного захисту та виконує роль первинного рубежу у захисті клітин проти АФК (Alscher et al., 2002). Таку функцію СОД пов'язують з тим, що, елімінуючи супероксидні радикали, цей фермент опосередковано зменшує ймовірність утворення гідроксильних радикалів, синглетного кисню, пероксинітриту та інших АФК, які через високу реакційну здатність не можуть бути видалені білковими каталізаторами.

СОД каталізує реакцію диспропорціонування супероксидних аніон-радикалів до молекулярного кисню та пероксиду водню з коефіцієнтом 10^4 за рівнянням:



Механізм дії СОД полягає у послідовному відновленні та окисненні супероксидними аніон-радикалами металу (Me) активного центру ферменту (Asada, 1996):



СОД представлена значною кількістю молекулярних форм. В їх активних центрах можуть бути такі метали як Cu, Zn, Mn, Fe. Cu/Zn-СОД (Mr 30-33 кДа) є найбільш поширеною формою СОД у клітинах рослин. Вона локалізована у різних компартментах – у хлоропластах, мітохондріях, пероксисомах та апопласті. Значна кількість Cu/Zn-СОД виявлено у цитозолі. Цитозольна форма ферменту виявлена на тонопласті або біля нього, а також у самому ядрі. Припускають, що в ядро СОД потрапляє через ядерні пори та захищає ДНК-філаменти від окиснювальних пошкоджень.

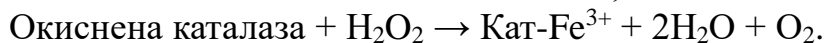
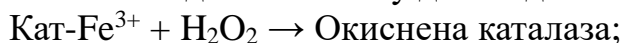
Mn-СОД (Mr 75-94 кДа) міститься в матриксі мітохондрій та пероксисомах. Відзначено високу гомологію амінокислотних послідовностей ферменту в мітохондріях з такою в пероксисомах.

Fe-СОД (Mr 36-48 кДа) локалізована в клітинах рослин переважно в хлоропластах як у стромі, так і на мембранах тилакоїдів.

Протокол аналізу. Наважку (≈ 300 мг) коренів або пагонів інтактних проростків гомогенізують в 0,15 М К/Na-фосфатному буфері (рН 7,8) з додаванням 1 мМ дитіотреїтолу, 100 мкМ ЕДТА і 0,5 мМ фенілметилсульфонілфториду в ДМСО. Гомогенат центрифугують на холоді протягом 15 хв при 10000 g.

У реакційну кювету вносять 2,25 мл приготованого на 0,15 М К/Na-фосфатному буфері (рН 7,8) реактиву, що містить ЕДТА (62 мкг/мл), нітротетразолій синій (0,5 мкг/мл), феназинметосульфат (92 мкг/мл), додають 0,75 мл супернатанту і 0,3 мл розчину НАДН (760 мкг/мл), приготованого на Трис-ЕДТА-буфері (37 мг ЕДТА, 24 мг Трис розчиняють в колбі на 100 мл і доводять рН до 8,0). У контрольну кювету вносять ті ж реактиви, але фермент попередньо інактивують десятихвилинним прогрівом порції супернатанту у киплячій водянній бані. Контрольну і дослідну кювети після змішування реактивів і вимірювання вихідної величини абсорбції за довжини хвилі 530 нм інкубують 5 хв у темряві і далі знову вимірюють абсорбцію. Активність ферменту виражають в умовних одиницях (різниця величин зміни абсорбції контрольної і дослідної проб віднесена до грама наважки або міліграма білка за хв).

2.2.1.2. Каталаза. Каталаза (КФ 1.11.1.6) є гемовмісним ферментом з Мг близько 250 кДа, що каталізує розкладання H_2O_2 на воду і молекулярний кисень. Каталаза локалізована переважно в пероксисомах і гліоксисомах, її специфічна форма виявлена також у мітохондріях. Розкладання пероксиду водню каталазою здійснюється у дві стадії:



У тварин виявлено лише одну ізоформу каталази, що кодується одним геном. У той самий час у рослинах присутні різні ізоформи ферменту, кодовані генним сімейством.

Одним з простих методів визначення активності каталази є метод, в основі якого пряме спектрофотометричне визначення зменшення вмісту пероксиду водню, що розкладається в реакційній суміші під впливом каталази (Аєбі, 1984).

Протокол аналізу. Рослинний матеріал (300 мг) гомогенізують в ступці на льоду, екстракцію проводять 0,05 М К/Na-фосфатним буфером (рН 7,8) з додаванням 1 мМ дитіотреїтолу, 100 мкМ ЕДТА і 0,5 мМ фенілметилсульфонілфториду в ДМСО. Суспензію центрифугують при 10000 g протягом 20 хв за температури 4°C.

Супернатант переносять в кювети, які встановлюють в спектрофотометрі. Як контрольний розчин порівняння використовують вихідний буфер. Безпосередньо перед вимірюванням в реакційну суміш додають 0,1 мл 0,1 М пероксиду водню. Динаміку змін екстинкції реєструють за довжини хвилі 240 нм протягом 3 хв.

Як стандарт використовують пероксид водню з відомими концентраціями, концентрацію пероксиду водню у дослідних пробах

знаходять на основі даних калібрувального графіка. Активність ферменту виражають в мкмоль пероксиду водню на г рослинного матеріалу або на мг білка за хв.

2.2.1.3. Неспецифічна пероксидаза. Пероксидази класу III, або так звані "класичні" (неспецифічні) пероксидази (КФ 1.11.1.7), належать до мультифункціональних ферментів (Tognolli et al., 2003). Неспецифічні пероксидази є гемовмісними глікопротеїнами. Їхня простетична група – протогематин IX складається з протопорфірину IX та іона Fe^{3+} . Первинну структуру апоферменту утворюють: (1) один поліпептидний ланцюг (близько 300 амінокислотних залишків, можливе утворення димерів та тетрамерів); (2) окремі бічні вуглеводні ланцюги – близько 20% загальної молекулярної маси, можлива відсутність вуглеводів у деяких пероксидаз; атоми кальцію. Вуглеводи підтримують стійкість білка до протеолітичних ферментів, кальцій бере участь у збереженні структурної конформації білка, зв'язуванні пероксидаз із клітинними структурами та підтриманні термостабільності молекул (Кутузова, Угарова, 1981). Мономерні ізоферментів пероксидази різних рослин мають молекулярну масу від 6 до 60 кДа.

Залежно від характеру локалізації в рослинних клітинах розрізняють розчинні (які містяться у вакуолях і цитоплазмі), іонноsv'язані (локалізовані в мембранах і клітинній стінці) і ковалентно пов'язані (перебувають в основному в клітинній стінці) форми пероксидази, кожна з яких представлена численними молекулярними формами.

Поряд з антиоксидантною функцією, пероксидазна система бере участь у забезпеченні перебігу багатьох інших реакцій, у яких пероксид водню використовується як окисник. Пероксидази також можуть проявляти оксидазну активність з передачею електронів від відновників (наприклад, НАДН) на молекулярний кисень (Chen, Schopfer, 1999). За такої дії пероксидази утворюються супероксидний аніон-радикал і пероксид водню. Вважається, що найбільшу кількість супероксиду і, як наслідок, H_2O_2 може генерувати пероксидаза клітинних стінок. У той же час для розчинних пероксидаз класу III більш характерні антиоксидантні функції. Такі форми пероксидази локалізуються переважно у цитоплазмі та вакуолях. Як відновники вони можуть використовувати різні сполуки, зокрема, феноли. Активність розчинних пероксидаз вважається одним з показників стану антиоксидантної системи.

Протокол аналізу. Рослинний матеріал гомогенізувати в 0,05 М К/Na-фосфатному буфері (рН 7,8) з додаванням 1 мМ дитіотреїтолу, 100 мкМ ЕДТА і 0,5 мМ фенілметилсульфонілфториду в ДМСО. Гомогенат

відцентрифугувати на холоді протягом 15 хв при 8000 g. Аліквоту гомогенату (0,5 мл) змішати з 4,5 мл 0,1 М /Na-фосфатного буферу (рН 6,2) і безпосередньо використовувати для аналізу (пропорції у цій суміші можна створювати різні, залежно від активності ферменту). В фотометричну кювету об'ємом 5 мл внести 0,75 мл 0,07% розчину гваяколу, 0,75 мл 0,1 М К/Na-фосфатного буферу (рН 6,2), 2,25 мл проби, що містить фермент. Після цього поставити кювету в кюветне відділення фотометра і внести 0,75 мл 0,15% пероксиду водню, почавши відлік часу. Результати вимірювань екстинкції при 470 нм фіксувати, починаючи з 40 с через кожні 20 протягом 2 хв.

Результати розраховують за формулою:

$$E = ((D2-D1) \cdot V \cdot \text{екстр.} \cdot V \text{ кювети} \cdot P) / (V \text{ ан} \cdot m \cdot t),$$

де D2-D1 абсорбція через 120 і 60 секунд від початку вимірювань, V · екстр. - об'єм буферу, взятого для екстракції ферменту, V кювети – загальний об'єм рідини в кюветі, P — кратність розбавлення ферментного екстракту перед вимірюванням, V ан — об'єм ферментного екстракту, внесений в кювету для аналізу; m — маса наважки (г) або вміст білка в наважці (мг), · t – час (хв).

2.2.1.4. Визначення вмісту білка за методом Бредфорд. Оскільки активність ферментів часто розраховують на кількість білка проби, відповідні аналізи супроводжують визначенням загального вмісту розчинних білків в пробі. Одним з найбільш простих, швидких, недорогих і чутливих методів є метод Baradford (1976). Він дозволяє надійно визначати від 10 до 100 мкг білка/мл проби. В основі методу пряме зв'язування барвника Кумассі G-250 з амінокислотними залишками аргініну, триптофану, тирозину, гістидину і фенілаланіну в білку. Обмеження методу полягають у тому, що барвник може зв'язуватися з деякими компонентами буферу для екстракції ферментів, зокрема, його не можна використовувати, якщо буфер містить детергенти (наприклад, Тритон X 100). Гранична допустима концентрація ЕДТА в буфері при використанні методу Бредфорд становить 0,1 М.

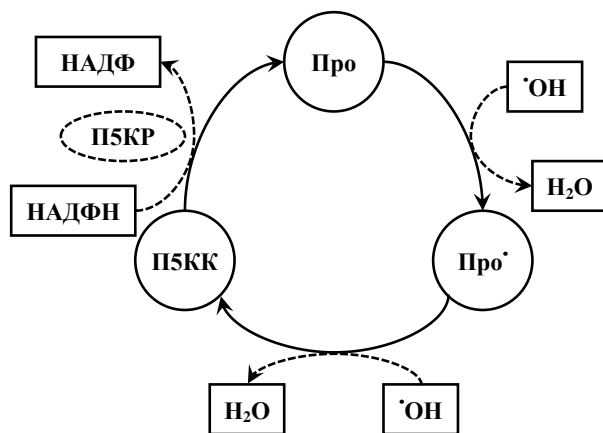
Протокол аналізу. Напередодні проведення аналізу слід приготувати маточний розчин Кумассі G-250 (об'єм 50 мл) шляхом розчинення 5 мг барвника в суміші з 12,5 мл етанолу і 37,5 мл дистильованої води. Із маточного розчину готують робочий розчин (100 мл). Для цього 22,2 мл маточного розчину змішують з 44,4 мл дистильованої води та 33,3 мл концентрованої фосфорної кислоти.

Для аналізу білка в пробі у пробірку з 3 мл робочого розчину барвника вносять 0,37 мл досліджуваного екстракту, що містить білок. Абсорбцію проб можна одразу вимірювати за довжини хвилі 590 нм. Як стандарт зазвичай використовують розчин бичачого сироваткового альбуміну.

2.2.2. Визначення вмісту поліфункціональних стресових метаболітів з антиоксидантними властивостями.

2.2.2.1. *Пролін.* Ця імінокислота є одним із найбільш багатofункціональних стресових метаболітів рослин. У даний час вважається, що, крім відомої функції сумісного осмоліту, він виконує антиоксидантні функції. Також пролін розглядається як низькомолекулярний шаперон (Liang et al., 2013), який може брати участь у підтримці нативної структури ферментів, зокрема антиоксидантних.

Останніми десятиліттями найбільша увага приділяється саме антиоксидантним ефектам проліну. Його структурні особливості дають підстави розглядати можливість прямої інактивації радикальних форм кисню. Зокрема, пролін може мати велике значення в інактивації гідроксильного радикала. Signorelli та співавт. (2014) запропоновано модель, яка пояснює механізм процесу. Згідно з цією моделлю, молекула проліну по черзі зв'язує два гідроксильні радикали, перетворюючись на Δ^1 -піролін-5-карбонову кислоту, яка за участю НАДФН і Δ^1 -піролін-5-карбоксилатредуктази відновлюється до проліну:



В цілому пролін багатогранно впливає на функціонування рослин у стресових умовах. При цьому багато його ефектів зумовлені прямим і непрямим впливом на про/антиоксидантну рівновагу в клітинах. У той же час пролін може чинити не тільки антиоксидантну, але й прооксидантну дію. Його катаболізм у мітохондріях може спричиняти посилення утворення АФК (Miller et al., 2009).

Разом з тим у багатьох дослідженнях вивчаються зв'язки між вмістом проліну і стійкістю видів або сортів рослин до стресових чинників, особливо пов'язаних із зневодненням. У деяких випадках вплив на вміст проліну може бути однією з причин стрес-протекторної дії ФАР. Порівняльний аналіз

вмісту проліну у рослин за нормальних і стресових умов разом з активністю антиоксидантних ферментів слугує показником ефективності захисної відповіді.

Одним з найбільш популярних методів залишається нінгідриновий метод у потрактуванні Bates et al. (1973).

Протокол аналізу. Наважку рослинного матеріалу масою 100-400 мг гомогенізують у дистильованій воді (кінцевий об'єм 10 мл), пробірки з гомогенатом одразу поміщають у киплячу водяну баню і кип'ятять протягом 10 хв. Далі гомогенат охолоджують і фільтрують через паперовий фільтр.

Для аналізу в пробірки вносять по 1 мл досліджуваного фільтрату, льодяної оцтової кислоти і нінгідринового реактиву (готується так: 1,25 г нінгідрину розчиняють у суміші з 20 мл 6 М H_3PO_4 та 30 мл льодяної оцтової кислоти, суміш обережно нагрівають на бані до повного розчинення нінгідрину). Пробірки з реакційною сумішшю ретельно закривають ковпачками з фольги і нагрівають на водяній бані при помірному кипінні протягом 1 год. Контрольна проба (розчин порівняння) містить ті самі реактиви, але замість 1 мл рослинного екстракту 1 мл дистильованої води.

Після закінчення кип'ятіння пробірки з пробами охолоджують і вимірюють абсорбцію при довжині хвилі 520 нм. Концентрацію проліну розраховують за калібрувальним графіком, дані для побудови якого отримують, використовуючи комерційний L-пролін.

2.2.2.2. Розчинні вуглеводи. Зміни вуглеводного складу рослин спричиняють стресори найрізноманітнішої природи (Колупаєв, Карпец, 2019). Давно з'ясовано, що за дії низьких загартовувальних температур у злакових відбувається накопичення вуглеводів у вигляді поліфруктозанів, передусім у вузлах кушіння (Bancal, Gaudillere, 1989). Дія високих температур також може викликати посилення гідролізу полімерних форм вуглеводів, а останні здатні виявляти захисні функції в умовах теплового стресу (Henle et al., 1984). Подібні зміни може спричиняти і зневоднення рослин. (Jacomini et al., 1988). Загалом, наявні в літературі факти свідчать, що однією з головних функцій вуглеводів, що накопичуються при стресах, є їхня антиденатураційна дія на білково-ліпідні компоненти клітин, які зазнають дегідратації або впливу інших альтеруючих факторів.

Досить давно відомо, що цукрам властиві й антиоксидантні властивості, зумовлені здатністю зв'язувати вільні радикали. У рослинах арабідопсису, оброблених глюкозою, накопичувалося менше синглетного кисню та пероксиду водню (Ramel et al., 2009). У той же час антиоксидантна дія цукрів може бути і непрямую – пов'язаною з метаболічною регуляцією компонентів антиоксидантної системи. Так, екзогенна обробка проростків

арабідопсису сахарозою підвищувала їх стійкість до атразину – агента фотоокиснювальних ушкоджень (Soueef et al., 2006). Показано можливість індукування глюкозою багатьох генів стресової відповіді у арабідопсису, зокрема генів глутатіон-S-трансфераз та транспортерів кон'югатів глутатіону (Soueef et al., 2006).

Показник вмісту розчинних вуглеводів у рослин, що зазнають дії стресорів, є важливою характеристикою їх адаптації. Найбільш простим і популярним протягом кількох десятиліть методом визначення сумарного вмісту цукрів є метод з використанням антронового реактиву, з яким цукри утворюють синє забарвлення. Проте використання методу потребує видалення розчинних білків з досліджуваної суміші, для чого використовують відповідні солі-осаджувачі.

Протокол аналізу. Цукри екстрагують з наважки рослинного матеріалу дистильованою водою при 10-хвилинному нагріванні на киплячій водяній бані (може бути одна наважка для визначення проліну і цукрів (див. вище)). Освітлення екстракту проводять додаванням в пробірки однакових об'ємів (зазвичай 0,2 мл) 30% розчину сульфату цинку і 15% розчину жовтої кров'яної солі. Проби фільтрують через паперовий фільтр. За необхідності фільтрат перед вимірюваннями розбавляють дистильованою водою в кілька разів. У реакційні пробірки вносять 2,25 мл антронового реактиву (готується розчиненням 0,5 г антрону в 100 мл концентрованої сірчаної кислоти) і 0,75 мл фільтрату, в контрольну пробу замість фільтрату вносять дистильовану воду. Після цього проби нагрівають протягом 7 хв на киплячій водяній бані, після чого перед вимірюванням охолоджують до кімнатної температури. Світлопоглинання визначають відносно до контрольного розчину при 610 нм. Як стандарт для підготовки калібрувального графіка використовують D-глюкозу.

2.2.2.3. Фенольні і флавоноїдні сполуки. Фенольні сполуки — речовини ароматичної природи, що містять одну або кілька гідроксильних груп. Особливістю природних фенолів є формування величезної кількості сполук за рахунок модифікацій молекул і утворення кон'югатів з різноманітними речовинами. Класифікують фенольні сполуки в залежності від числа ароматичних кілець і кількості приєднаних до них атомів вуглецю. Зазвичай фенольні сполуки поділяють на три великі підгрупи: з одним ароматичним кільцем, з двома ароматичними кільцями і полімерні фенольні сполуки.

Незважаючи на те, що природні фенольні сполуки об'єднують не менше ніж 10 різних груп, а кожна з них включає сотні й навіть тисячі (флавоноїди) індивідуальних сполук, вони мають біогенетичну спорідненість.

Зумовлено це тим, що основний структурний елемент – бензольне ядро з фенольним гідроксилем – у багатьох фенольних сполук утворюється шикіматним шляхом. Після утворення L-фенілаланіну та L-тирозину, побудова бензольного ядра завершується, а з L-фенілаланіну синтезується п-гідроксикорична (п-кумарова) кислота, яка з біогенетичної точки зору є найпростішою фенольною сполукою. п-Кумарова кислота, в свою чергу, виступає як родоначальник більшості природних фенолів.

Надалі біосинтез полікетометиленових попередників другого бензольного ядра флавоноїдів відбувається ацетатно-малонатним шляхом. п-Кумарова кислота вступає в реакцію з активованими молекулами маленової кислоти – малоніл – КоА, а до аліфатичного ланцюга приєднуються ацетатні фрагменти. Таким чином утворюється друге бензольне ядро 15-вуглецевого скелету флавоноїдів. На основі такої структури, спочатку утворюється найпростіший флавоноїд – халкон, у якого відсутній гетероцикл. Халкон перетворюється на ізомерну форму – флаванон. Більшість флавоноїдів синтезується із флаванону.

Усі флавоноїди тією чи іншою мірою беруть участь у антиоксидантній захисту клітин. Відповідно до загальноприйнятої точки зору, антиоксидантні властивості флавоноїдів пояснюються їхньою здатністю служити пастками для вільних радикалів, а також хелатувати іони металів, що беруть участь у радикальних процесах (Es-Safi et al., 2007).

У порівняльних експериментах отримані дані про дуже високу антиоксидантну активність флавоноїдів, що багато в чому перевершує активність інших АО. Так, показано, що ефективність взаємодії флавоноїдів з АФК та активними формами азоту в чотири рази вища, ніж у аскорбінової кислоти та α -токоферолу (Khlestkina et al., 2013). Окремо слід зазначити високу антиоксидантну активність антоціанів, здатних ефективно деактивувати супероксидні аніон-радикали (Neill, Gould, 2003).

Зміну вмісту флавоноїдів у рослинах зареєстровано за дії стресорів різної природи. У деяких роботах відзначається зв'язок між стійкістю сортів культурних рослин до тих чи інших стресорів та вмістом у них флавоноїдів (Treutter, 2006). Таким чином, флавоноїди виконують різноманітні фізіологічні функції, багато з яких, ймовірно, прямо чи опосередковано пов'язані з їх антиоксидантними ефектами. При цьому їх можна розглядати як поліфункціональні протектори рослинних клітин, оскільки крім антиоксидантної функції вони можуть виконувати роль осмопротекторів, зв'язувати важкі метали, екранувати надмірне освітлення і, можливо, брати участь у передачі клітинних сигналів (Khlestkina, 2013). У зв'язку з цим зміни

загального вмісту фенольних сполук, а також їх окремих груп розглядаються як важливі складові комплексу адаптивних реакцій рослин.

Існують прості оптичні методи визначення загального вмісту фенольних сполук та окремо представників деяких класів. Нижче наводяться протоколи визначення загального вмісту фенольних сполук та окремо антоціанів і безбарвних флавоноїдів, що поглинають в області УФ-В.

Протокол аналізу. Для вилучення фенольних і флавоноїдних сполук наважку рослинного матеріалу (200-300 мг) розтирають в 10 мл 80% етанолу, залишають для екстракції на 20 хв при кімнатній температурі, після чого фільтрують. В реакційні пробірки вносять 0,5 мл фільтрату, 8 мл дистильованої води і 0,5 мл реактиву Фоліна, перемішують і через 3 хв додають 1 мл 10% карбонату натрію. Через 1 год вимірюють абсорбцію розчину при 725 нм відносно набору реактивів без рослинного матеріалу. Як стандарти використовують галову або хлорогенову кислоту.

Для визначення вмісту антоціанів і флавоноїдів, що поглинають в області УФ-В, до 5 мл спиртового екстракту, отриманого за прописом, описаним вище, додають 0,15 мл концентрованої HCl і визначають світлопоглинання отриманого розчину при 530 нм (для антоціанів) та 300 нм (для безбарвних флавоноїдів, що поглинають в області УФ-В) (Nogués, Baker, 2000). Результати виражають в умовних одиницях оптичної густини, віднесених до маси рослинного матеріалу.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ПРАКТИЧНОГО ВИКОРИСТАННЯ ПРОРОСТКІВ ЗЛАКІВ ТА ЇХ ОРГАНІВ ЯК МОДЕЛЬНИХ ОБ'ЄКТІВ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ СТРЕС-ПРОТЕКТОРНОЇ ДІЇ ФАР

3.1. Дослідження протекторного впливу мелатоніну на проростки пшениці за умов дії теплового стресу і участі АФК та іонів кальцію в реалізації його ефектів (за матеріалами публікації: Тарабан та ін., 2022)

Мелатонін (*N*-ацетил-5-метокситриптамін) розглядається як плейотропна сигнальна молекула, що відіграє важливу роль у регуляції відповідей на дію різних стресових чинників (Buttar et al., 2020). Однією з важливих складових його стрес-протекторної дії вважається зменшення спричинюваних стресорами окиснювальних пошкоджень клітинних структур. Такий ефект зумовлений, зокрема, прямою антиоксидантною дією мелатоніну. Показано, що його антиоксидантна активність вища від ефектів таких «класичних» антиоксидантів, як аскорбінова кислота, глутатіон, НАДФН і токоферол (Yu et al., 2018). Водночас відомо, що мелатонін може спричиняти експресію генів антиоксидантних ферментів, зокрема, різних

форм супероксиддисмутази, каталази і ферментів аскорбат-глутатіонового циклу (Yu et al., 2018). Зрештою, є відомості про пригнічення мелатоніном стрес-індукованої експресії генів каталітичної субодиниці НАДФН-оксидази (*RbohD* і *RbohF*) (Lei et al., 2021).

Зменшення вмісту АФК у рослинних клітинах під впливом мелатоніну, що досягається за рахунок різних механізмів, запобігає розвитку окиснювальних ушкоджень за стресових умов. Однак АФК, насамперед, молекули пероксиду водню, є важливими сигнальними молекулами, що беруть участь як у передачі стресових сигналів, так і у реалізації ефектів різноманітних регуляторних молекул, у тому числі деяких фітогормонів (Kolupaev et al., 2019). Можлива участь АФК в прояві стрес-протекторної дії мелатоніну на рослини досліджена поки що слабо. Проте на прикладі рослин томатів показано підвищення активності НАДФН-оксидази і вмісту пероксиду водню під впливом екзогенного мелатоніну (Gong et al., 2017). При цьому інгібітор НАДФН-оксидази дифеніленіодоніум усував ефект підвищення стійкості томатів до теплового, холодого і осмотичного стресів, спричинюваний дією мелатоніну. На рослинах кавуна показано роль пероксиду водню, генерованого з участю НАДФН-оксидази, у розвитку їх холодостійкості за обробки мелатоніном (Chang et al., 2021). У цій же роботі виявлено підвищення концентрації цитозольного кальцію за дії мелатоніну.

Однак причинно-наслідкові зв'язки між можливими змінами кальцієвого гомеостазу і генерацією АФК та формуванням стійкості рослин до стресових температур донедавна залишалися майже не дослідженими. У зв'язку з викладеним, було досліджено участь АФК в індукуванні мелатоніном стійкості проростків пшениці до потенційно летального теплового стресу. Також з використанням інгібіторного методу у роботі вивчали можливе значення різних пулів кальцію в прояві впливу мелатоніну на генерацію АФК клітинами коренів і розвиток теплостійкості проростків.

Для експериментів використовували етіольовані проростки пшениці (*Triticum aestivum* L.) сорту Досконала. Зернівки після поверхневого знезараження пророщували в темряві за температури 22°C впродовж трьох діб. Після цього у середовище додавали мелатонін у кінцевих концентраціях діапазону 0,01–100 мкМ та інкубували проростки протягом доби. Контрольні зразки інкубували на дистильованій воді.

В окремих варіантах досліду проростки протягом 26 год обробляли скавенджером пероксиду водню диметилтіосечовиною (ДМТС, 0,15 мМ), інгібітором НАДФН-оксидази імідазолом (10 мкМ), антагоністами кальцію – 500 мкМ ЕГТА (хелатор позаклітинного Ca^{2+}) або 200 мкМ неоміцином – інгібітором залежного від фосфоліпази С надходження кальцію в цитозоль з

внутрішньоклітинних компартментів. У варіантах з вивчення комбінованого впливу мелатоніну та антагоністів АФК і кальцію останні вносили в середовище інкубації проростків за 2 год до введення в нього мелатоніну. Концентрації вказаних інгібіторів, що істотно модифікували ефекти екзогенного мелатоніну, але не спричиняли помітних токсичних ефектів, вибирали у попередніх дослідах.

Під час інкубації проростків на досліджуваних розчинах визначали вміст у коренях пероксиду водню феротіоціанатним методом.

Для визначення теплостійкості проростків їх прогрівали у водяному ультратермостаті за температури $45,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ протягом 10 хв (див. 2.1). Після цього проростки усіх варіантів переносили на очищену воду. Через 3 доби оцінювали виживаність проростків.

Обробка проростків розчинами мелатоніну у концентраціях діапазону від 0,1 до 10 мкМ спричинювала істотне підвищення їх виживаності після ушкоджувального прогріву (рис. 1). Максимальний стрес-протекторний ефект мелатонін чинив у концентрації 1 мкМ. За дії концентрацій 0,01 та 100 мкМ виживаність також була вищою від контролю, але цей ефект був вірогідним лише при $p \leq 0,1$. В усіх подальших експериментах для обробки проростків використовували мелатонін у концентрації 1 мкМ.

Вміст пероксиду водню в коренях проростків контрольного варіанта впродовж доби експерименту істотно не змінювався (рис. 2). Додавання мелатоніну у середовище інкубації проростків спричиняло швидке підвищення в коренях вмісту пероксиду водню. Вірогідний ефект відзначався вже через 20 хв від початку його дії (рис. 2). Через 1 год вміст H_2O_2 у коренях проростків дослідного варіанта досягав максимальних значень. Надалі (через 2–3 год інкубації) вміст пероксиду водню поступово знижувався, хоча й перевищував відповідні значення контролю. Через 4–24 год вміст пероксиду водню у варіанті з обробкою коренів мелатоніном істотно знижувався і його величини ставали меншими від контролю. Таким чином, підвищення вмісту пероксиду водню за дії мелатоніну було транзиторним.

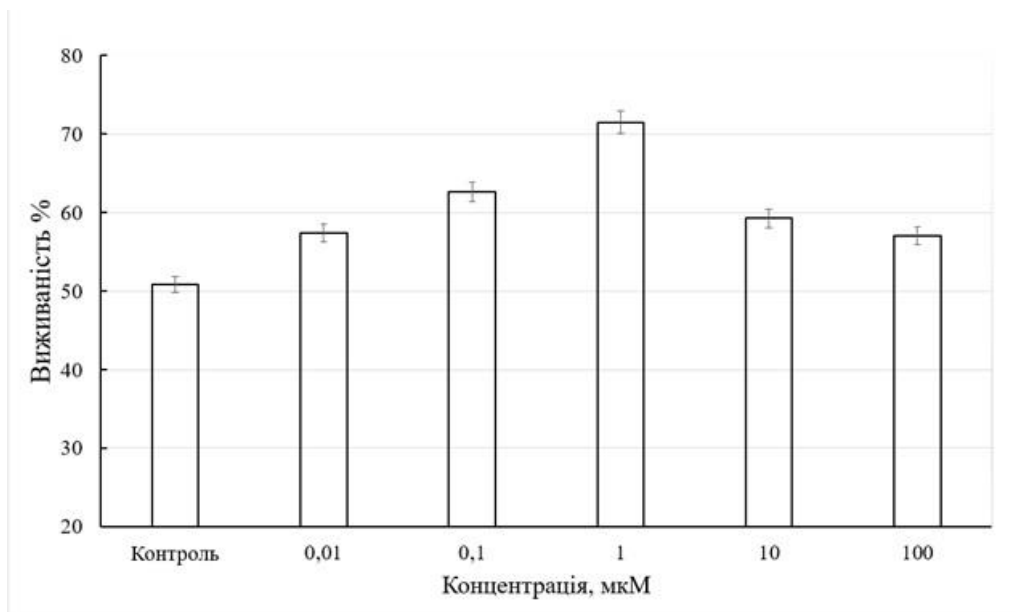


Рис. 1. Концентраційна залежність впливу мелатоніну на виживаність проростків пшениці після 10 хв прогріву за температури 45°C

Обробка проростків скавенджером пероксиду водню ДМТС знижувала його вміст у коренях та усувала підвищення кількості H_2O_2 , спричинюване дією мелатоніну (рис. 3, *a*). У варіанті з обробкою інгібітором НАДФН-оксидази імідазолом відзначалася тенденція до деякого зниження вмісту пероксиду водню. При цьому вказаний інгібітор помітно пригнічував зростання кількості H_2O_2 за обробки коренів проростків мелатоніном. Це вказує на роль НАДФН-оксидази як ферментативного джерела АФК, задіяного у зростанні вмісту пероксиду водню в коренях під впливом мелатоніну.

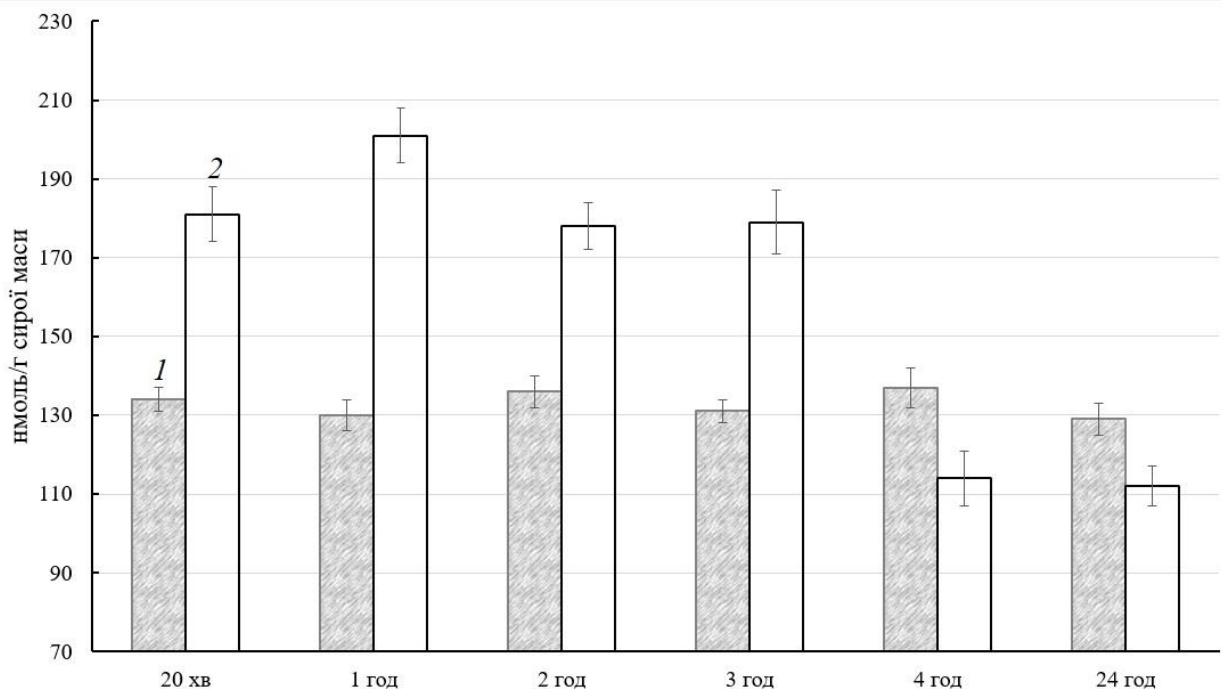


Рис. 2. Динаміка вмісту перексиду водню у коренях проростків пшениці за інкубації у середовищі з додаванням мелатоніну. 1 – контроль; 2 – мелатонін.

Хелатор кальцію ЕГТА сам по собі практично не впливав на вміст H₂O₂ у коренях проростків пшениці (рис. 3, а). Однак передобробка коренів проростків цим антагоністом кальцію нівелювала зростання вмісту перексиду водню, спричинюване мелатоніном. Під впливом інгібітору надходження кальцію з внутрішньоклітинних компартментів неоміцину відзначалася тенденція до невеликого зменшення вмісту перексиду водню у коренях проростків. При цьому даний антагоніст кальцію повністю усував підвищення вмісту H₂O₂ у варіанті з мелатоніном. Отже, результати інгібіторного аналізу вказують на участь різних пулів кальцію у підвищенні вмісту перексиду водню в клітинах коренів проростків за їх обробки мелатоніном.

Кальційзалежне зростання кількості перексиду водню у проростках, ймовірно, є сигналом, необхідним для розвитку їх теплостійкості під впливом обробки мелатоніном. Про це свідчить усунення спричинюваного мелатоніном підвищення їх теплостійкості у присутності антиоксиданту ДМТС, інгібітору НАДФН-оксидази імідазолу та антагоністів кальцію – ЕГТА і неоміцину (рис. 3, б). При цьому слід зауважити, що обробка проростків жодним із вказаних модуляторів редокс-гомеостазу і кальцієвого

статусу сама по собі істотно не змінювала теплостійкість, що свідчить про відсутність можливого їх токсичного впливу.

Для з'ясування механізмів впливу кальцію на формування сигналу АФК, що опосередковує індуковане мелатоніном підвищення теплостійкості проростків пшениці, необхідні спеціальні дослідження. Однак, поведений інгібіторний аналіз і пряме визначення вмісту пероксиду водню в клітинах коренів проростків пшениці засвідчують наявність зв'язків між змінами кальцієвого гомеостазу, посиленням залежного від НАДФН-оксидази утворення АФК і формуванням теплостійкості проростків пшениці.

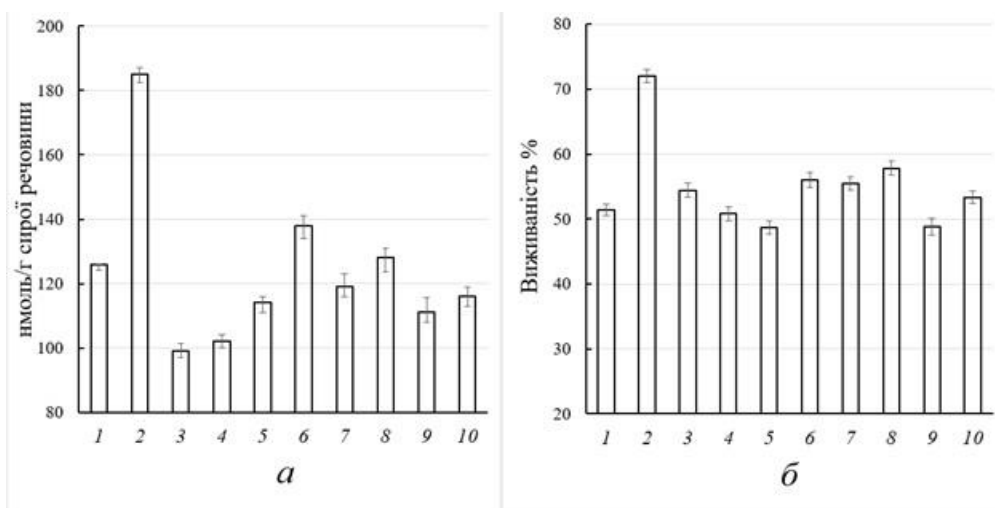


Рис. 3. Вміст пероксиду водню у коренях (а) та виживаність проростків пшениці (б) після ушкоджувального прогріву (45°C , 10 хв) за їх обробки мелатоніном, ДМТС, імідазолом та антагоністами кальцію. 1 – контроль; 2 – мелатонін (1 мкМ); 3 – ДМТС (150 мкМ); 4 – мелатонін (1 мкМ) + ДМТС (150 мкМ); 5 – імідазол (10 мкМ); 6 – мелатонін (1 мкМ) + імідазол (10 мкМ); 7 – ЕГТА (500 мкМ); 8 – мелатонін (1 мкМ) + ЕГТА (500 мкМ); 9 – неоміцин (200 мкМ); 10 – мелатонін (1 мкМ) + неоміцин (200 мкМ).

Помітні стрес-протекторні ефекти екзогенного мелатоніну дозволяють розглядати модуляцію його вмісту у рослинах як дієвий прийом підвищення їх стійкості до абіотичних, зокрема температурних, стресів.

3.2. Вплив праймінгу насіння пшениці і жита мелатоніном на функціонування їх протекторних систем за умов помірного теплового стресу (за матеріалами публікації: Kolupaev et al., 2023b)

На даний час на рослинах різних видів зафіксовані протекторні ефекти мелатоніну за умов таких класичних стресів як посуха, засолення,

екстремальні температури (Cui et al., 2018; Chang et al., 2021; Nawaz et al., 2021). При цьому, однак, поки що практично відсутні порівняльні дослідження впливу мелатоніну на рослини з різними адаптивними стратегіями, а для окремих культурних рослин стосовно ефектів мелатоніну не отримано навіть феноменологічних даних. Так, в літературі повністю відсутні дані про можливу стрес-протекторну дію мелатоніну на рослини жита, що вирізняються від інших культурних злаків вищою стійкістю до низьких і високих температур, а також до дії прямих агентів окиснювального стресу (Koster, Linch, 1992; Kolupaev et al., 2022; Romanenko et al., 2022)

Зважаючи на це, було проведено порівняльне дослідження дії праймінгу мелатоніном зернівок озимих пшениці (*Triticum aestivum* L.) і жита (*Secale cereale* L.) на стійкість проростків до високих температур у зв'язку з функціонуванням ключових клітинних захисних систем – антиоксидантної та осмопротекторної.

У роботі використовували насіння пшениці м'якої озимої сорту Досконала і жита озимого сорту Пам'ять Худоєрка репродукції 2020 року, отримане в Національному центрі генетичних ресурсів рослин України. Зернівки дослідних варіантів занурювали у розчини мелатоніну в концентраціях діапазону 5–500 мкМ протягом 2 год, в контрольному варіанті зернівки обробляли дистильованою водою. Насіння пророщували впродовж 3 діб в термостаті за температури $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Після цього оцінювали теплостійкість проростків за ростовою реакцією на високу температуру з використанням методу, запропонованого О.І. Жук та І.П. Григорюком (Pat. 45879 UA, 2002) з нашими модифікаціями (див. 2.1). Дослідні проростки протягом 6 год піддавали прогріву у відкритих чашках Петрі у повітряному термостаті за температури $44 \pm 1^\circ\text{C}$ і відносної вологості повітря 42–45%, проростки контрольного варіанта у цей час залишалися в термостаті з температурою 24°C і вологістю повітря 60–70%. Для недопущення підсихання коренів фільтрувальний папір у чашках через кожен годину зволожували однаковою кількістю дистильованої води відповідної температури. Після закінчення прогріву проростки дослідних варіантів знову переносили в термостат з температурою 24°C . Температуру та часову експозицію, що спричиняли інгібування росту приблизно на 50–70%, добирали у попередніх дослідках.

Одразу після закінчення експозиції проростків за стресових умов визначали оводненість їх тканин гравіметричним методом шляхом висушування за температури 103°C до сталої маси. Величину водного дефіциту оцінювали за насиченням відокремлених від проростків пагонів водою протягом 12 год і виражали у відсотках від загального вмісту води у

стані повного насичення (Barrs, Weatherley, 1962).

Біохімічні показники визначали у пагонах проростків одразу після 6-годинного впливу на них високої температури, використовуючи методи, описані в Розділі 2.

Праймування зернівок пшениці і жита розчинами мелатоніну в концентраціях діапазону 5–100 мкМ істотно не впливало на ріст коренів і пагонів на 3–4 добу експерименту при вирощуванні проростків в контрольних умовах за температури 24°C (результати не наводяться). Водночас обробка 500 мкМ мелатоніном спричиняла інгібування росту пагонів і коренів приблизно на 35 і 25%, відповідно.

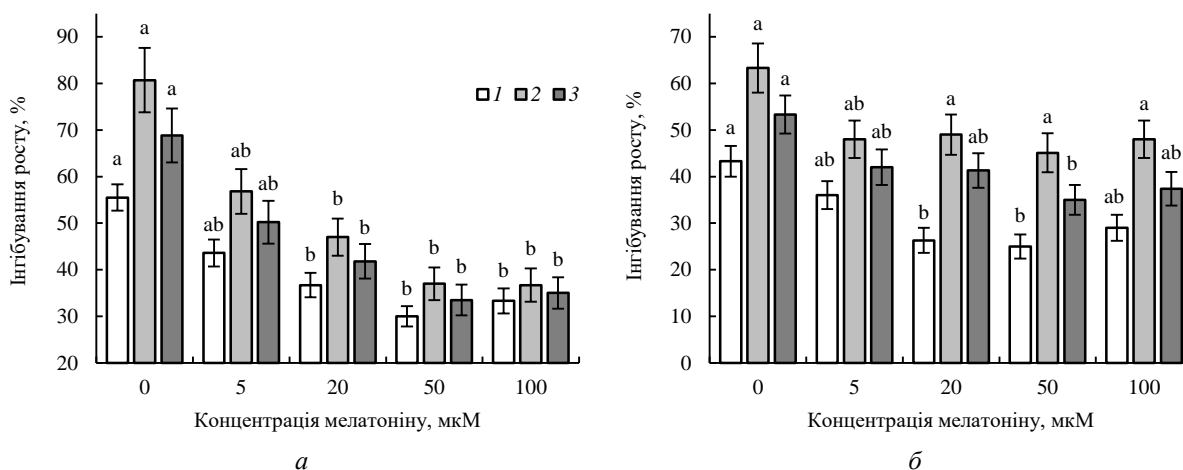


Рис. 4. Вплив праймінгу зернівок мелатоніном на інгібування росту (%) пагонів (1), коренів (2) і проростків в цілому (3) після дії теплового стресу (44°C, 6 год). (а) – *Triticum aestivum*; (б) – *Secale cereale*. Тут і на рис. 2–5 однаковими літерами позначені величини, різниці між якими не вірогідні при $P \leq 0,05$ при їх порівнянні в межах одного виду рослин.

Тепловий стрес викликав істотне інгібування росту проростків пшениці, пригнічення росту коренів було сильнішим, ніж пагонів (рис. 4). Проростки жита виявляли меншу чутливість до теплового стресу (рис. 4). При цьому у них так само ріст коренів пригнічувався помітніше, ніж ріст пагонів.

Праймінг зернівок мелатоніном помітно зменшував інгібування росту пагонів і коренів у пшениці за теплового стресу (рис. 4). Вірогідний стрес-протекторний ефект спостерігався при використанні мелатоніну в концентраціях 20, 50 і 100 мкМ. Вплив передобробки мелатоніном на ростові показники проростків жита за умов теплового стресу виявився менш виразним. Відзначалося вірогідне зменшення інгібування росту пагонів за

попередньої обробки зернівок мелатоніном в концентраціях 20 і 50 мкМ. Мелатонін в усіх досліджуваних концентраціях дещо зменшував спричинюване тепловим стресом інгібування росту коренів, проте ці ефекти виявилися не вірогідними за $P \leq 0,05$ (рис. 4). При розрахунку ростових ефектів на цілі проростки жита вірогідне зменшення інгібування росту відзначалося при використанні мелатоніну в концентрації 50 мкМ. Зважаючи на це, саме цю концентрацію мелатоніну використовували у наступних серіях експериментів.

Після експозиції проростків пшениці і жита за високої температури істотно (у 2,50–2,65 раза) зростала генерація ними супероксидного аніон-радикала (рис. 5, а). Обробка мелатоніном зменшувала прояв такого ефекту в обох видів злаків.

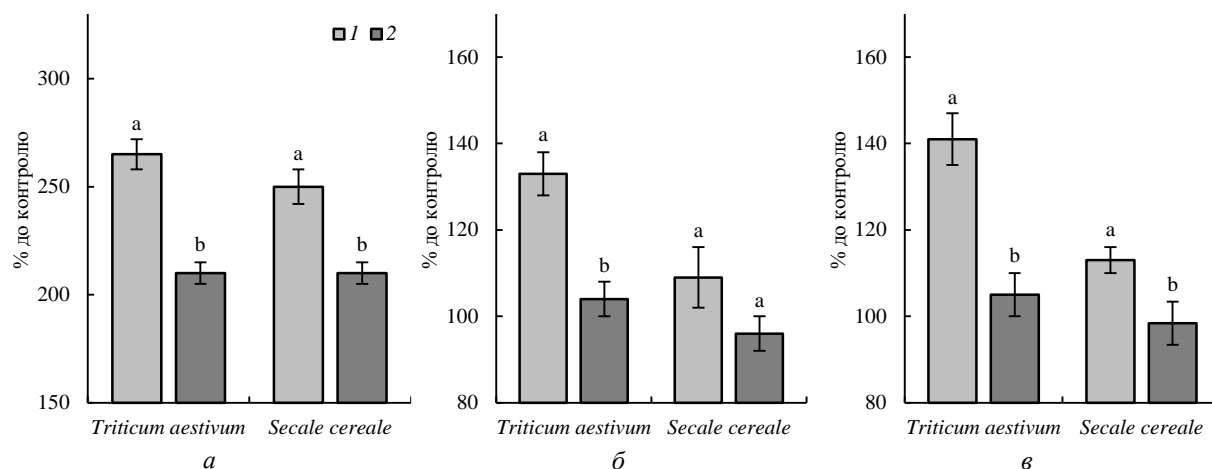


Рис. 5. Генерація супероксидного аніон-радикала (а – % до контролю), вміст пероксиду водню (б – % до контролю) і вміст МДА (в – % до контролю) у пагонах проростків пшениці і жита. 1 – тепловий стрес (44°C, 6 год); 2 – тепловий стрес + мелатонін (50 мкМ).

Тепловий стрес також спричиняв зростання вмісту пероксиду водню у пагонах проростків пшениці приблизно на 33%, а у жита такий ефект був незначним (рис. 5, б). Праймінг мелатоніном майже повністю усував спричинюване тепловим стресом зростання вмісту пероксиду водню у проростках пшениці, у жита під впливом мелатоніну відзначалася тенденція до невеликого зменшення вмісту H_2O_2 у пагонах (рис. 5, б).

Вміст продукту ПОЛ МДА після теплового стресу помітно зростав у пагонах проростків пшениці і незначною мірою у жита (рис. 5, в).

Передобробка мелатоніном знижувала вміст МДА у пагонах проростків пшениці і жита за стресових умов до рівня контролю.

Активність каталази у пагонах проростків пшениці під впливом теплового стресу знижувалася, а у жита істотно не змінювалася (рис. 6, а). Попередній праймінг зернівок пшениці мелатоніном спричиняв істотне (в 1,6 раза) зростання активності ферменту в стресових умовах. Підвищення активності каталази у пагонах проростків жита під впливом мелатоніну за умов стресу було менш виразним (рис. 6, а).

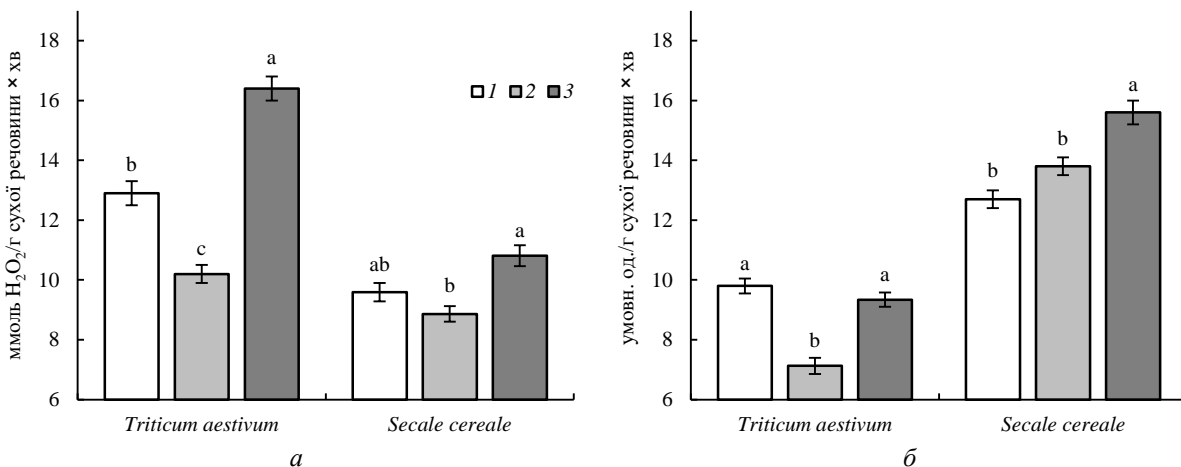


Рис. 6. Активність каталази (а – ммоль Н₂О₂/г сухої речовини × хв) і пероксидази (б – умовн. од./г сухої речовини × хв) ферментів у пагонах проростків пшениці і жита. 1 – контроль; 2 – тепловий стрес (44°С, 6 год); 3 – тепловий стрес + мелатонін (50 мкМ).

Активність гваяколпероксидази у пагонах проростків жита після дії високої температури знижувалася, а у проростків жита дещо підвищувалася, але цей ефект був вірогідним лише за $P \leq 0,1$ (рис. 6, б). Обробка мелатоніном спричиняла стабілізацію активності ферменту у проростків пшениці до рівня контролю, а у проростків жита відзначалося її вірогідне підвищення порівняно з контрольним і стресовим варіантами.

Тепловий стрес викликав деяке (вірогідне за $P \leq 0,1$) зниження вмісту розчинних вуглеводів у пагонах проростків пшениці, натомість у жита відзначалася тенденція до деякого збільшення вмісту цукрів після стресового впливу (рис. 7, а). Обробка зернівок мелатоніном спричиняла значне підвищення вмісту розчинних вуглеводів у пагонах обох видів за умов теплового стресу.

Під впливом нагріву відзначалося істотне зростання вмісту проліну у пагонах проростків пшениці і менше у жита (рис. 7, б). При цьому однак базовий вміст проліну у жита був дещо вищим, ніж у пшениці. Праймінг мелатоніном вірогідно не впливав на вміст проліну у проростках обох видів злаків.

Таким чином, обробка зернівок пшениці і жита мелатоніном зменшувала негативний вплив теплового стресу на ростові процеси та показники водного режиму, а також модифікувала прояв окиснювального стресу і функціонування клітинних протекторних систем.

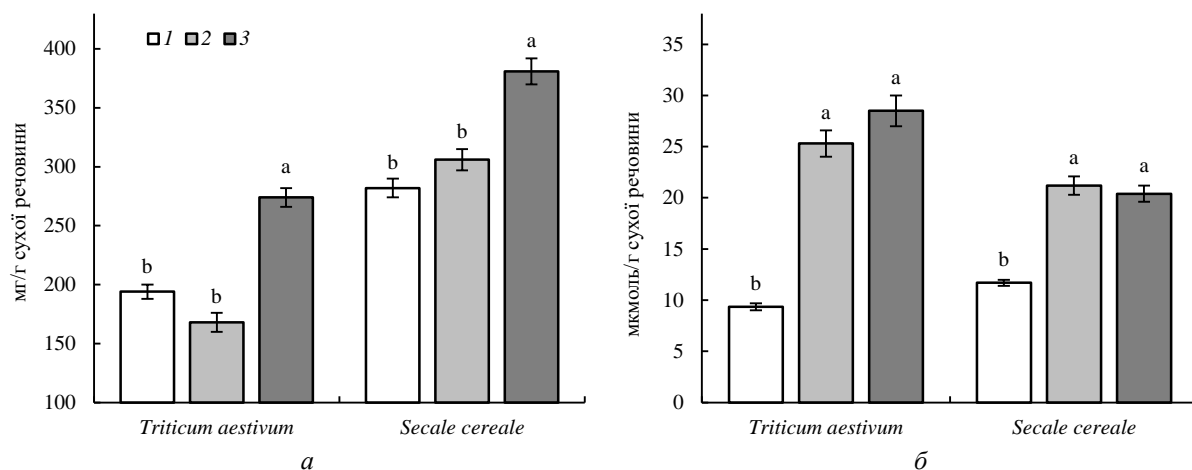


Рис. 7. Вміст розчинних вуглеводів (а – мг/г сухої речовини) і проліну (б – мкмоль/г сухої речовини) у пагонах проростків пшениці і жита. 1 – контроль; 2 – тепловий стрес (44°C, 6 год); 3 – тепловий стрес + мелатонін (50 мкМ).

Результати досліджень свідчать як про схожість, так і про відмінності в реакції протекторних систем у двох видів злаків з різною стійкістю до теплового стресу (таблиця). У проростків пшениці прогрів спричиняв помітний розвиток окиснювального стресу, що виявлялося в істотному збільшенні генерації супероксидного радикала, накопиченні пероксиду водню і продукту ПОЛ МДА. При цьому обробка мелатоніном значно зменшувала ефект зростання всіх цих показників за дії високої температури.

Характер змін показників функціонування клітинних протекторних систем у проростків пшениці жита за умов теплового стресу і праймінгу мелатоніном

Вид рослин	Варіант	Показники окиснювального стресу			Активність антиоксидантних ферментів		Вміст осмопротекторів	
		Генерація $O_2^{\cdot-}$	Вміст H_2O_2	Вміст МДА	Каталаза	ГПО	Цукри	Пролін
<i>Triticum aestivum</i>	Тепловий стрес	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↑
	Тепловий стрес + мелатонін	→	→	→	↑	→	↑	↑
<i>Secale cereale</i>	Тепловий стрес	↑	→	→	→	→	→	↑
	Тепловий стрес + мелатонін	→	→	→	↑	↑	↑	↑

Примітки. ↑ – підвищення відносно контролю; → – відсутність змін або наближення до показників контролю; ↓ – зниження відносно контролю.

У проростків жита внаслідок теплового стресу істотно зростала тільки генерація супероксидного аніон-радикала, а інші показники окиснювального стресу слабо відрізнялися від контролю. При цьому обробка мелатоніном дещо зменшувала спричинюване нагрівом посилення генерації $O_2^{\cdot-}$.

У проростків пшениці внаслідок теплового стресу знижувалася активність ключових ферментів, що знешкоджують пероксид водню – каталази і гваяколпероксидази. Обробка зернівок пшениці мелатоніном спричиняла значне підвищення активності каталази і сприяла збереженню активності гваяколпероксидази на рівні, близькому до значень контролю. У жита за умов теплового стресу активність досліджуваних антиоксидантних ферментів істотно не змінювалася, а обробка мелатоніном спричиняла підвищення активності гваяколпероксидази.

Тепловий стрес викликав тенденцію до зменшення вмісту цукрів та істотне зростання вмісту проліну у проростків пшениці. Натомість у проростків жита вміст цукрів зберігався стабільним, а зростання вмісту проліну внаслідок стресу було менш помітним. Обробка мелатоніном призводила до посилення накопичення розчинних вуглеводів у проростків обох видів за стресових умов і майже не впливала на вміст проліну.

В цілому отримані результати вказують на більш істотну модуляцію мелатоніном клітинних протекторних систем у пшениці як виду з меншою порівняно з житом конститутивною теплостійкістю. Індукування мелатоніном клітинних протекторних систем злаків шляхом праймування

зернівок вказують на перспективність вивчення цього прийому як елемента рослинних біотехнологій.

3.3. Вивчення впливу гамма-аміномасляної кислоти на стійкість проростків пшениці різних генотипів до модельної посухи (за матеріалами публікації: Kolupaev et al., 2023c)

γ-аміномасляна кислота (ГАМК) – непотеїногенна чотириуглецева амінокислота, виявлена у багатьох прокариотичних та еукаріотичних організмів. Останніми роками динамічно накопичуються нові знання про регуляторні функції ГАМК у рослин (Suhel et al., 2023), інтенсивно досліджується вплив екзогенної ГАМК на стійкість рослин різних таксономічних груп до стресових факторів. Протекторні ефекти ГАМК на рослини виявлено за дії гіпоксії, посухи, засолення, низьких та високих температур, важких металів та низки біотичних стресів (Sheteiwu et al., 2019). Застосування екзогенної ГАМК зазвичай підвищує її ендogenous вміст та спричиняє різноманітні зміни на молекулярному, біохімічному та організмовому рівнях. В огляді Shelp та співавторів (2021) наведено ряд прикладів, що свідчать про те, що підвищений вміст ендogenous ГАМК може посилювати індуковане стрес-факторами підвищення активності антиоксидантних ферментів, вмісту низькомолекулярних антиоксидантів та накопичення осмолітів, у тому числі проліну. Всі ці ефекти є важливими для розвитку посухостійкості рослин (Kolupaev et al., 2023a).

Захисні ефекти екзогенної ГАМК показані на прикладі *Trifolium repens* (Yong et al., 2017), *Agrostis stolonifera* (Tang et al., 2020), *Phaseolus vulgaris* (Abd El-Gawad et al., 2021). Незважаючи на важливість та поширеність пшениці м'якої (*Triticum aestivum*), вплив ГАМК на її посухостійкість вивчено недостатньо. У роботі Fagoog та співавт. (2017), виконаній на рослинах пшениці, вирощуваних у ґрунтовій культурі, показано, що обробка ГАМК сприяла збереженню стабільності мембран, збільшувала показники їхньої продуктивності, вміст хлорофілу, а також кількість осмолітів — проліну та гліцинбетаїну. Zhao та співавторами (2023) показано, що обробка ГАМК 2-6-денних проростків пшениці в умовах осмотичного стресу, створюваного дією ПЕГ, зменшувала інгібування росту, знижувала вміст продуктів пероксидного окислення ліпідів, підвищувала активність пероксидаз і сприяла збільшенню вмісту фенольних антиоксидантів.

При цьому сортові особливості дії ГАМК вивчені в поодиноких дослідженнях і стосуються лише інтегральних фізіологічних показників – стабільності мембран, ефективності використання води та продуктивності (Fagoog та співавт. 2017). У зв'язку з викладеним, нами було досліджено

вплив ГАМК на стан антиоксидантної та осмопротекторної систем в умовах модельної посухи у двох сортів пшениці, які істотно відрізняються за посухостійкістю.

Для досліджень використовували етіольовані проростки двох сортів *Triticum aestivum*: Досконала (чутливий до посухи) та Тобак (посухостійкий). Проведене раніше спеціальне дослідження стійкості 4-добових етіольованих проростків до дії модельної посухи, створюваної за допомогою ПЕГ 6000, підтвердило значно вищу стійкість сорту Тобак порівняно з сортом Досконала (Kolupaev et al., 2023c).

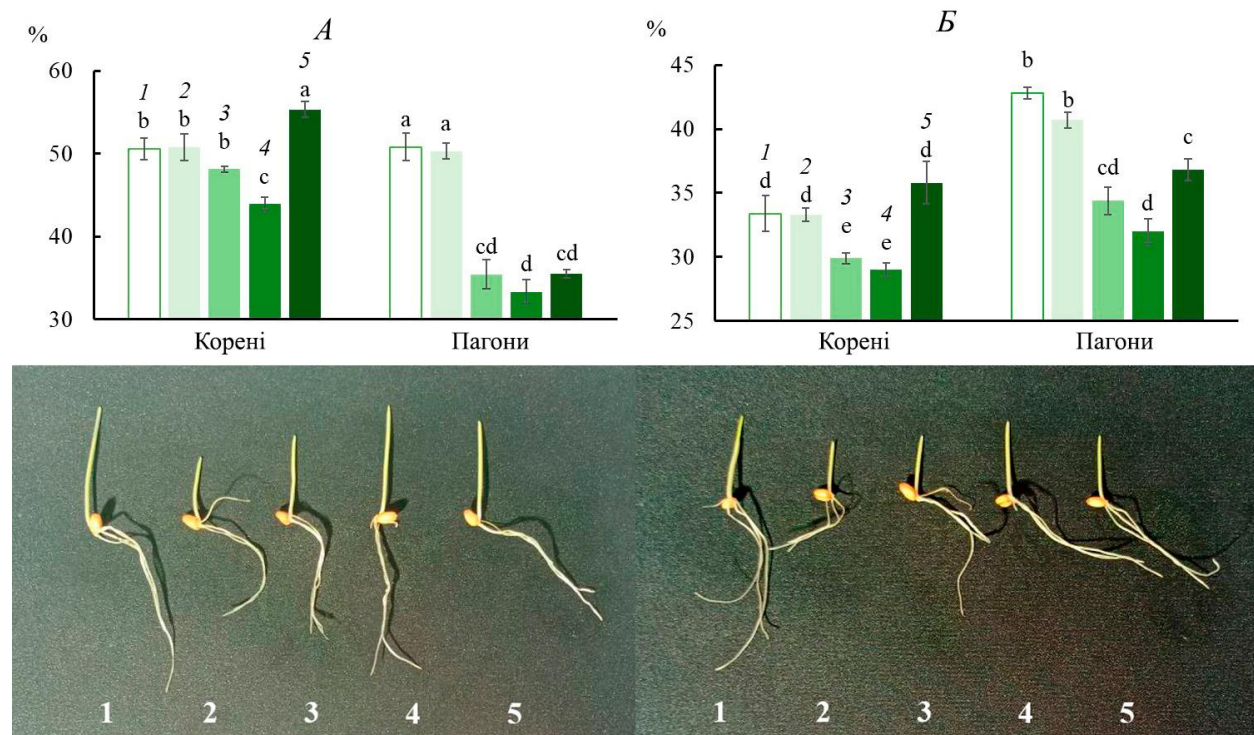


Рис. 8. Модуляція ростиногубуючої дії 15% ПЕГ 6000 на проростки пшениці сортів Досконала (А) і Тобак (В) обробкою ГАМК. 1 — ПЕГ 6000 (15%); 2 — ПЕГ 6000 (15%) + 0.025 мМ ГАМК; 3 — ПЕГ 6000 (15%) + 0,1 мМ ГАМК; 4 — ПЕГ + 0,5 мМ ГАМК; 5 — ПЕГ + 2,5 мМ ГАМК.

Знезаражене насіння пророщували на воді в чашках Петрі в термостаті при 24°C без освітлення протягом 2 діб. Після цього проростки приблизно однакової довжини переносили в чашки Петрі з двома шарами фільтрувального паперу, змоченого 15% розчином ПЕГ 6000. Проростки контрольних варіантів переносили чашки Петрі з фільтрувальним папером, змоченим дистильованою водою. ГАМК розчиняли в невеликому об'ємі

етанолу, розчини розбавляли дистильованою водою і вносили в чашки Петрі для отримання робочих розчинів з концентраціями діапазону 0,025-2,5 мМ. Після дводобової експозиції проростків на розчинах ПЕГ 6000 та/або ГАМК проводили біохімічні аналізи та оцінювали біомасу пагонів і коренів проростків. Біохімічні показники визначали у пагонах проростків, використовуючи методи, описані в Розділі 2.

Дводобова експозиція проростків на 15% розчині ПЕГ 6000 викликала пригнічення росту коренів і пагонів у нестійкого сорту Досконала більш ніж на 50% (рис. 8). У стійкішого сорту Тобак пригнічення росту коренів становило 33%, а пагонів близько 43%. Обробка ГАМК пом'якшувала рістінгібувальну дію модельної посухи. Значимий при $P \leq 0,05$ стрес-протекторний ефект на ріст коренів ГАМК чинила в концентраціях 0,1 і 0,5 мМ, діапазон концентрацій, що посилюють ріст пагонів, був ширшим — від 0,1 до 2,5 мМ (рис. 8). Загалом захисна дія ГАМК помітніше позначалася на рості пагонів. Відзначалися і сортові відмінності: більш виражений позитивний ефект ГАМК чинила на ріст проростків менш стійкого сорту Досконала.

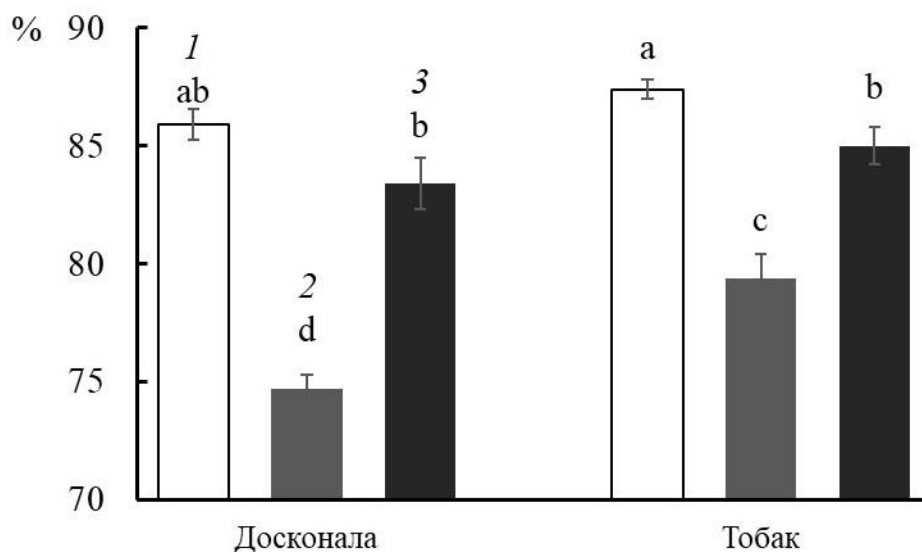


Рис. 9. Відносний вміст води у пагонах проростків пшениці. 1 — контроль; 2 - ПЕГ 6000; 3 — ПЕГ 6000+ 0,5 мМ ГАМК.

Модельна посуха викликала зниження відносного вмісту води в пагонах проростків пшениці обох сортів, проте у нестійкого сорту Досконала цей ефект був більш вираженим (рис. 9). Обробка ГАМК відновлювала відносний вміст води за умов інкубації проростків на розчині ПЕГ 6000 в обох сортах майже до рівня контролю.

Вплив модельної посухи спричиняв 1,5-разове підвищення вмісту H_2O_2

в пагонах проростків нестійкого сорту Досконала (рис. 10, А). При цьому у стійкішого сорту Тобак кількість пероксиду водню збільшувалася на третину. Обробка ГАМК практично повністю усувала підвищення вмісту H_2O_2 , спричинюване посухою, у сорту Тобак, а у сорту Досконала пом'якшувала цей ефект.

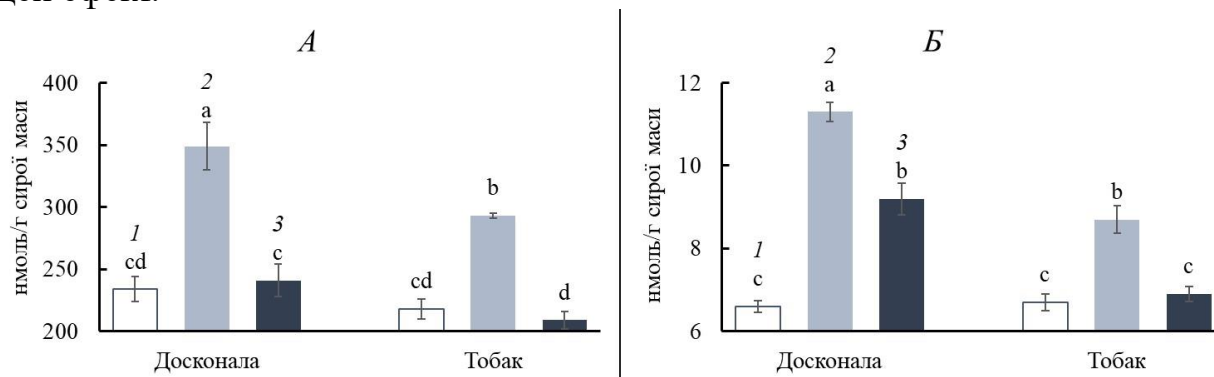


Рис. 10. Вміст пероксиду водню (А) та ТБК-активних продуктів (з розрахунку на МДА - В) у пагонах проростків пшениці. 1 — контроль; 2 - ПЕГ 6000; 3 — ПЕГ 6000+ 0,5 мМ ГАМК.

Ріст проростків нестійкого сорту Досконала у присутності агента осмотичного стресу ПЕГ 6000 супроводжувався підвищенням вмісту ТБК-активних продуктів (основним вважається МДА) в 1,7 раза (рис. 10, В). У той самий час у стійкого сорту Тобак цей показник окислювального стресу збільшувався лише на 30%. Обробка ГАМК зменшувала накопичення продуктів ПОЛ, спричинюване посухою, у сорту Досконала і практично повністю усувала цей ефект у сорту Тобак.

Базові величини активності СОД у двох досліджуваних сортів суттєво відрізнялися: у сорту Тобак активність ферменту була суттєво вищою, ніж у сорту Досконала (рис. 11, А). Під впливом осмотичного стресу активність СОД знижувалася в обох сортів. Обробка ГАМК запобігала спричинюваному стресом зниженню активності ферменту.

Базова активність каталази виявилася вищою у сорту Досконала (рис. 10, В). Однак, в умовах осмотичного стресу у цього сорту вона суттєво знижувалася. У посухостійкого сорту Тобак активність ферменту при стресі зберігалася лише на рівні, близькому до контрольного варіанту. Обробка ГАМК не мала істотного впливу на активність каталази за посухи в обох сортів.

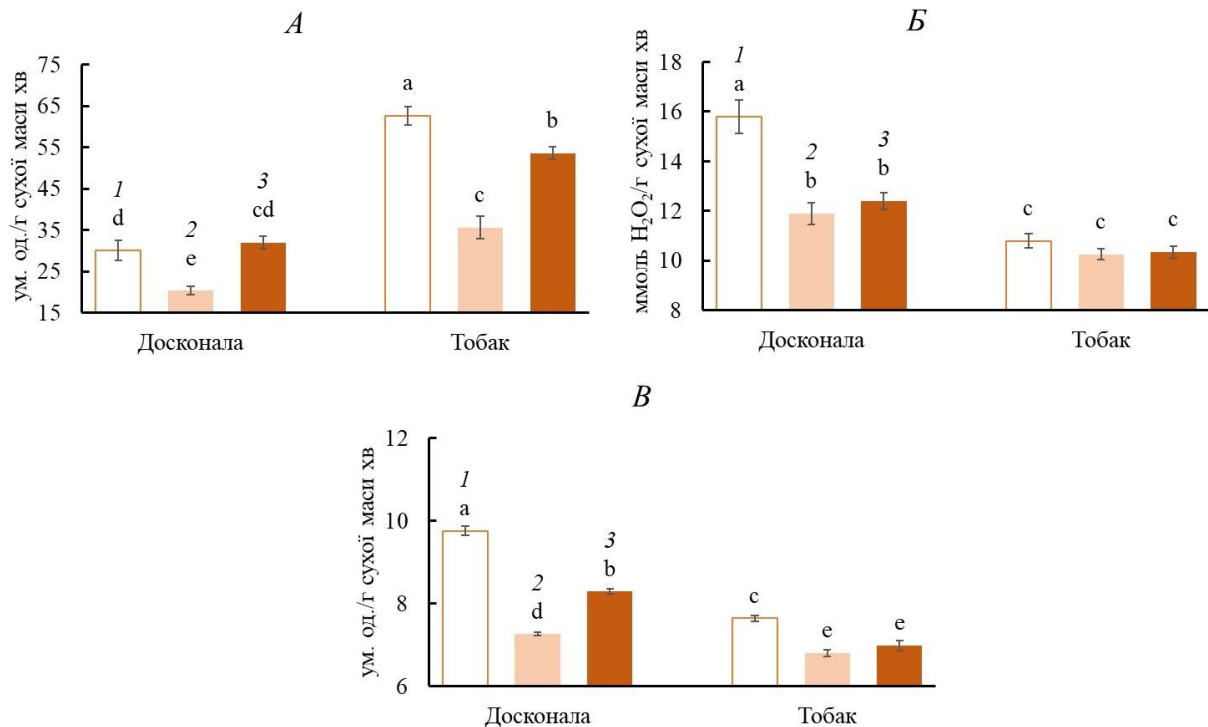


Рис. 11. Активність СОД (А), каталази (В) та гваяколпероксидази (С) у пагонах проростків пшениці. 1 — контроль; 2 - ПЕГ 6000; 3 — ПЕГ 6000+ 0,5 мМ ГАМК.

Активність неспецифічної пероксидази у відповідь на дію модельної посухи помітно знижувалася у сорту Досконала, тоді як у сорту Тобак такий ефект був меншим (рис. 11, С). Обробка ГАМК проростків сорту Досконала сприяла значному підвищенню активності ферменту в умовах посухи, водночас її вплив на цей показник у сорту Тобак виявлявся на рівні тенденції.

Базовий вміст проліну був вищим у нестійкого сорту Досконала (рис. 12, А). Вплив модельної посухи викликав збільшення цього показника на 57% у сорту Досконала і на 47% у сорту Тобак. При цьому характер впливу ГАМК на цей показник у двох сортів суттєво відрізнявся. Якщо у нестійкого сорту Досконала під впливом ГАМК вміст проліну підвищувався, то у стійкого сорту Тобак він, навпаки, знижувався.

Базовий вміст розчинних вуглеводів у сорту Тобак був вищим, ніж у сорту Досконала (рис. 12, В). Під впливом посухи він дещо знижувався в обох сортів. Обробка ГАМК сприяла збереженню пулу цукрів у проростках обох сортів за умов посухи.

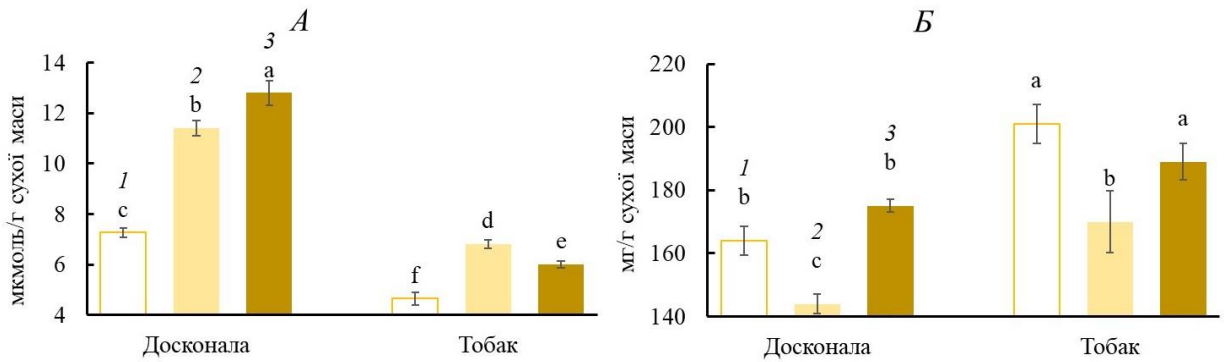


Рис. 12. Вміст проліну (А) та цукрів (В) у пагонах проростків пшениці. 1 — контроль; 2 - ПЕГ 6000; 3 — ПЕГ 6000+ 0,5 мМ ГАМК.

Загальний вміст фенольних сполук у двох сортів суттєво не відрізнявся. У сорту Досконала він майже не змінювався, а у сорту Тобак підвищувався за дії осмотичного стресу (рис. 13, А). Обробка ГАМК викликала підвищення вмісту фенолів у сорту Досконала, проте не впливала на цей показник у сорту Тобак.

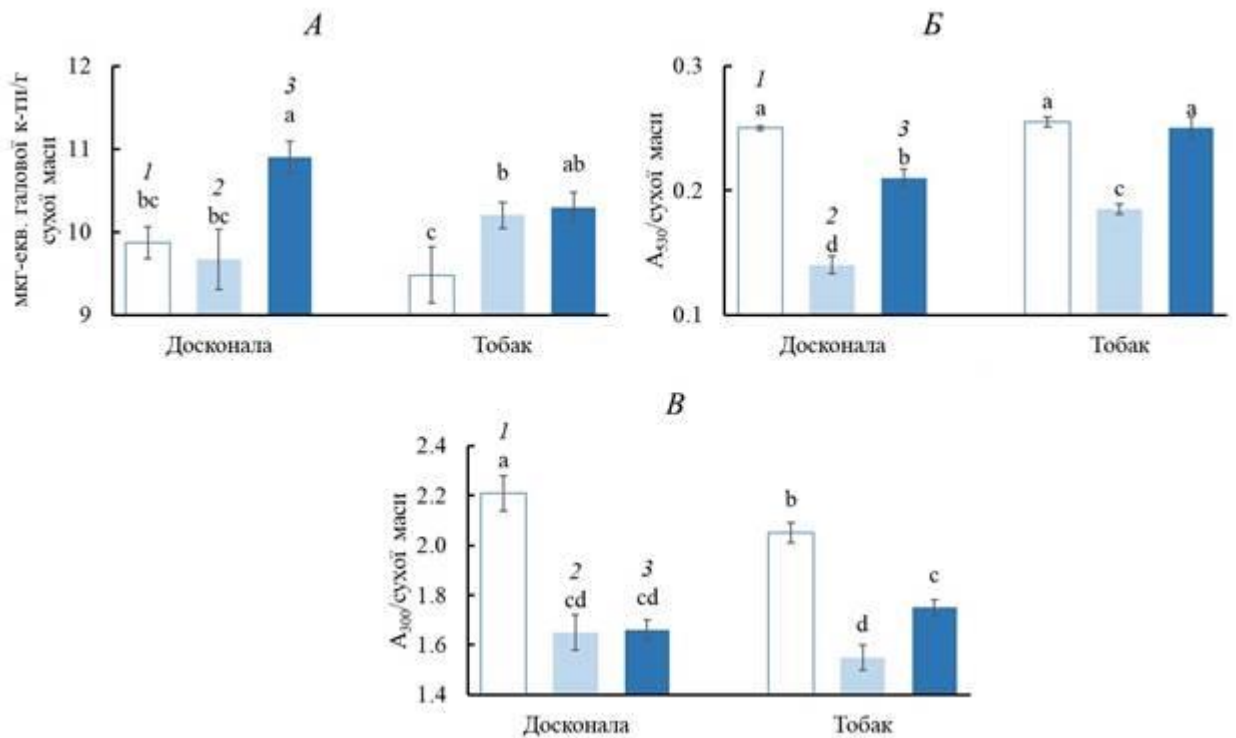


Рис. 13. Вміст фенольних сполук (А), антоціанів (В) та флавоноїдів, що поглинають в ділянці УФ-С (С) у пагонах проростків пшениці. 1 — контроль; 2 - ПЕГ 6000; 3 — ПЕГ 6000+ 0,5 мМ ГАМК.

Базовий вміст антоціанів у обох сортів був практично однаковим (рис. 13, В). Під впливом посухи відбувалося майже 2-разове його падіння у нестійкого сорту Досконала, у стійкого сорту Тобак зниження вмісту антоціанів було менш суттєвим. Обробка ГАМК сприяла збереженню пулу антоціанів у обох сортів. При цьому у сорту Тобак їх вміст при стресі у присутності ГАМК не відрізнявся від величин контролю.

Вміст безбарвних флавоноїдів, що поглинають в області УФ-В, у стресових умовах знижувався в обох сортів (рис. 13, С). Обробка ГАМК не впливала на їх кількість у сорту Досконала, але дещо пом'якшувала дію стресу на сорт Тобак.

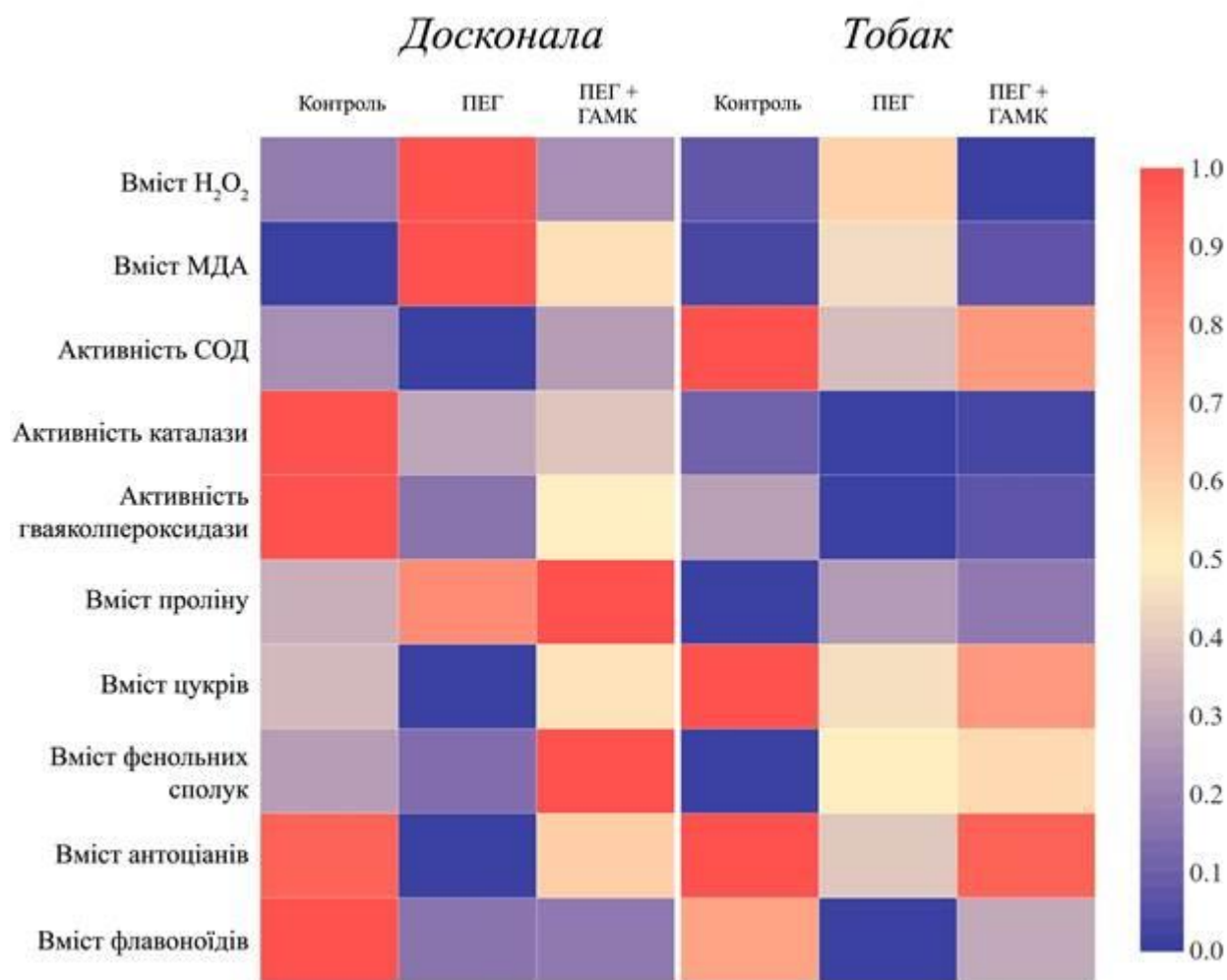


Рис. 14. Теплова карта зміни показників стану антиоксидантної та осмопротекторної систем проростків пшениці при дії модельної посухи (15% ПЕГ) та їх модуляції обробкою ГАМК. При побудові карти всі величини перетворені на відсотки величин у контрольних випадках.

Таким чином, обробка ГАВА підвищувала стійкість етіолованих проростків пшениці до осмотичного стресу, створеного ПЕГ 6000. При цьому більш помітно дію посухи обробка ГАМК пом'якшувала у непосухостійкого сорту Досконала. Під впливом ГАМК як у стійкого сорту Тобак, так і нестійкого сорту Досконала знижувалося стрес-індуковане накопичення пероксиду водню та МДА (рис. 14).

Отже, в обох сортів обробка ГАМК запобігала спричинюваному стресом зниженню активності СОД, а також зменшенню вмісту цукрів і антоціанів. У той же час ГАМК сприяла підвищенню активності гваколпероксидази, проліну та загального вмісту фенольних сполук у непосухостійкого сорту Досконала і слабо впливала на ці показники у стійкого сорту Тобак. Таким чином, зафіксовано диференційований прояв стрес-протекторної дії ГАМК, залежний від адаптивних стратегій конкретних сортів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Балюк, С.А., Медведєв, В.В., Мірошніченко, М.М., Скрильник, Є.В., Тимченко, Д.О., Фатєєв, А.І., Христенко, А.О., Цапко, Ю.Л. (2012). Екологічний стан ґрунтів України. Український географічний журнал, 2, 38-42.
- Карпец, Ю.В., Колупаєв, Ю.Е., Косаковская, И.В. (2016). Оксид азота и пероксид водорода как сигнальные посредники при индуцировании теплоустойчивости проростков пшеницы экзогенными жасмоновой и салициловой кислотами. Физиология растений и генетика, 48(2), 158-166.
- Колупаєв, Ю.Е., Карпец, Ю.В., Ястреб, Т.О. (2013). Колеоптилы пшеницы как модельный объект для исследования стресс-протекторного действия экзогенных соединений. Вісник Харківського національного аграрного університету. Сер. Біологія, 1(28), 103-108.
- Колупаєв, Ю.Е., & Карпец, Ю.В. (2019). Активные формы кислорода, антиоксиданты и устойчивость растений к действию стрессоров. Киев: Логос.
- Обозний, О.І., Криворученко, Р.В., Шевченко, М.В., Колупаєв, Ю.Є. (2013). Антиоксидантна активність проростків озимої пшениці різних екотипів у зв'язку зі стійкістю до гіпертермії і зневоднення. Вісник Харківського національного аграрного університету. Сер. Біологія, 1(28), 52-59.
- Тарабан, Д.А., Карпець, Ю.В., Ястреб, Т.О., Дяченко, А.І., Колупаєв, Ю.Є. (2022). Ca^{2+} - і АФК-залежне індукування теплостійкості проростків пшениці екзогенним мелатоніном. Доповіді Нац. акад. наук Укр, 4, 98-105.

- Abd El-Gawad, H.G., Mukherjee, S., Farag, R., Abd Elbar, O.H., Hikal, M., Abou El-Yazied, A., Abd Elhady, S.A., Helal, N., ElKelish, A., El Nahhas, N., Azab, E., Ismail, I.A., Mbarki, S., & Ibrahim, M.F.M. (2021). Exogenous γ -aminobutyric acid (GABA)-induced signaling events and field performance associated with mitigation of drought stress in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Signal Behav*, 16(2), 1853384.
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126.
- Akula, R., & Mukherjee, S. (2020). New insights on neurotransmitters signaling mechanisms in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 15(6), 1737450.
- Alscher, R.G., Erturk, N., & Heath, L.S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot*, 53, 1331-1341.
- Bancal, P., & Gaudillere, J.P. (1989). Oligofructan separation and quantification by high performance liquid chromatography. Application to *Asparagus officinalis* and *Triticum aestivum*. *Plant Physiol Biochem*, 27, 745-750.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Bates, L.S., Walden, R.P., & Tear, G.D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil*, 39, 205–210.
- Blokhina, O., Virolainen, E., & Fagerstedt, K.V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann. Bot*, 91, 179-194.
- Buttar, Z.A., Wu, S.N., Arnao, M.B., Wang, C., Ullah, I., Wang, C. (2020). Melatonin suppressed the heat stress-induced damage in wheat seedlings by modulating the antioxidant machinery. *Plants (Basel)*, 9(7), 809.
- Chang, J., Guo, Y., Li, J., Su, Z., Wang, C., Zhang, R., Wei, C., Ma, J., Zhang, X., & Li, H. (2021). Positive interaction between H_2O_2 and Ca^{2+} mediates melatonin-induced cbf pathway and cold tolerance in watermelon (*Citrullus lanatus* L.). *Antioxidants (Basel)*, 10(9), 1457.
- Couee, I., Sulmon, C., Gouesbet, G., & Amrani, A.E. (2006). Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot*, 57, 449-459.
- Cui, G., Sun, F., Gao, X., Xie K., Zhang C., Liu S., & Xi Y. (2018). Proteomic analysis of melatonin-mediated osmotic tolerance by improving energy metabolism and autophagy in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Planta*, 248(1), 69–87.
- Daryanto, S., Wang, L., & Jacinthe, P.A. (2016). Global synthesis of drought effects on maize and wheat production. *PLoS One*, 11(5), e0156362. doi: 10.1371/journal.pone.0156362
- Dubrovna, O.V., Mykhalska, S.I., & Komisarenko, A.G. (2022). Using proline

- metabolism genes in plant genetic engineering. *Cytology & Genetics*, 56, 361–378.
- Es-Safi, N.E., Ghidouche, S., & Ducrot, P.H. (2007). Flavonoids: hemisynthesis, reactivity, characterization and free radical scavenging activity. *Molecules*, 12(12), 2228-2258.
- Farooq, M., Nawaz, A., Chaudhry, M.A.M., Indrasti, R., Rehman, A. (2017). Improving resistance against terminal drought in bread wheat by exogenous application of proline and gamma-aminobutyric acid. *J. Agron Crop Sci.*, 203(6), 464-472.
- Flowers, T.J., Galal, H.K., & Bromham, L. (2010). Evolution of halophytes: multiple origins of salt tolerance in land plant. *Funct. Plant Biol*, 37, 604-612.
- Gill, S.S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem*, 48, 909-930.
- Gong, B, Yan, Y, Wen, D., & Shi, Q. (2017). Hydrogen peroxide produced by NADPH oxidase: a novel downstream signaling pathway in melatonin-induced stress tolerance in *Solanum lycopersicum*. *Physiol. Plant.*, 160, No. 4, pp. 396-409.
- Gupta, A., Rico-Medina, A., & Caño-Delgado, A.I. (2020). The physiology of plant responses to drought. *Science*, 368, 266-269.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J.M.C. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford Scholarship Online. doi: 10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001
- Henle, K.J., Monson, T.P., Moss, A.J., & Nagle, W.A. (1984). Protection against thermal cell death in Chinese hamster ovary cells by glucose, galactose, or mannose. *Cancer Res*, 44, 5499-5504.
- Hu, X., Jiang, M., Zhang, J., Zhang, A., Lin, F., & Tan, M. (2007). Calcium-calmodulin is required for abscisic acid-induced antioxidant defense and functions both upstream and downstream of H₂O₂ production in leaves of maize (*Zea mays*) plants. *New Phytol*, 173, 27-38.
- Isayenkov, S.V. (2012). Physiological and molecular aspects of salt stress in plants. *Cytology & Genetics*, 46(5), 302–318.
- Jacomini, E., Bertani, A., & Mapelli, S. (1988). Accumulation of polyethyleneglycol 6000 and its effect on water content and carbohydrate level in water-stressed tomato plants. *Can. J. Bot.*, 66, 970-973.
- Karpets, Y. V., Shkliarevskiy, M. A., Horielova, E. I., & Kolupaev, Y. E. (2020). Participation of hydrogen sulfide in induction of antioxidant system in roots of wheat plantlets and their heat resistance by salicylic acid. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 56(5), 467-472.
- Karpets, Y. V., Shkliarevskiy, M. A., Khripach, V. A., & Kolupaev, Y. E. (2021).

- State of enzymatic antioxidative system and heat resistance of wheat plantlets treated by a combination of 24-epibrassinolide and NO donor. *Cereal Research Communications*, 49, 207-216.
- Kavulych, Y., Kobyletska, M., Romanyuk, N., & Terek, O. (2023). Stress-protective and regulatory properties of salicylic acid and prospects of its use in plant production. *Studia Biologica*, 17(2), 173-200.
- Khlestkina, E. K. (2013). The adaptive role of flavonoids: emphasis on cereals. *Cereal Research Communications*, 41, 185-198.
- Kolupaev, Y. E., Karpets, Y. V., & Kabashnikova, L. F. (2019). Antioxidative system of plants: Cellular compartmentalization, protective and signaling functions, mechanisms of regulation. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 55(5), 441-459.
- Kolupaev, Y. E., Karpets, Y. V., Shkliarevskiy, M. A., Yastreb, T. O., Plohovska, S. H., Yemets, A. I., & Blume Y. B. (2022a). Gasotransmitters in plants: Mechanisms of participation in adaptive responses. *The Open Agriculture Journal*, 16(Suppl-1, M5), e187433152207050.
- Kolupaev, Y. E., Kokorev, A. I., & Dmitriev, A. P. (2022b). Polyamines: Involvement in cellular signaling and plant adaptation to the effect of abiotic stressors. *Cytology & Genetics*, 56(2), 148–163.
- Kolupaev, Y. E., Yastreb, T. O., & Dmitriev, A. P. (2023a). Signal mediators in the implementation of jasmonic acid's protective effect on plants under abiotic stresses. *Plants*, 12(14), 2631.
- Kolupaev Y. E, Yastreb T. O, Ryabchun N. I, Kuzmyshyna N. V, Shkliarevskiy M. A., Barabolia, O., Pysarenko, V. M. (2023c). Response of *Triticum aestivum* seedlings of different ecological and geographical origin to heat and drought: relationship with resistance to oxidative stress and osmolyte accumulation. *Agriculture and Forestry*, 69(2), 83-99.
- Kolupaev Yu.E., Shakhov I.V., Kokorev A.I., Kryvoruchko L., Yastreb T. O. (2023d). Gamma-aminobutyric acid modulates antioxidant and osmoprotective systems in seedlings of *Triticum aestivum* cultivars differing in drought tolerance. *Ukr. Biochem. J.*, 95(5), 85-97.
- Kosakivska, I. V., Vedenicheva, N. P., Babenko, L. M., Voytenko, L. V., Romanenko, K. O., & Vasyuk, V. A. (2022). Exogenous phytohormones in the regulation of growth and development of cereals under abiotic stresses. *Molecular Biology Reports*, 49(1), 617–628.
- Koster K. L, Lynch D. V. (1992). Solute accumulation and compartmentation during the cold acclimation of puma rye. *Plant Physiol*, 98(1), 108–113.
- Lei, K., Sun, S., Zhong, K., Li, S., Hu, H., Sun, C., Zheng, Q., Tian, Z., Dai, T., & Sun, J. (2021). Seed soaking with melatonin promotes seed germination under

- chromium stress via enhancing reserve mobilization and antioxidant metabolism in wheat. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 220, Art. 112241.
- Liang X., Zhang L., Natarajan S.K., & Becker D.F. (2013). Proline mechanisms of stress survival. *Antioxid. Redox Signal*, 19, 998-1011.
- Miller, G., Arik, H., Stein, H., Suzuki, N., Mittler, R., & Avia, Z. (2009). Unraveling Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate-proline cycle in plants by uncoupled expression of proline oxidation enzymes. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(36), 26482-26492.
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651-681.
- Nawaz, F., Majeed, S., Ahmad, K. S., Hamid, A., Shabbir, R. N., Aqib, M., & Ikram, R. M. (2019). Use of osmolytes in improving abiotic stress tolerance to wheat (*Triticum aestivum* L.). In M. Hasanuzzaman et al. (Eds.), *Wheat Production in Changing Environments* (pp. 497-519). Springer Nature Singapore.
- Neill, S. O., & Gould, K. S. (2003). Anthocyanins in leaves: light attenuators or antioxidants? *Functional Plant Biology*, 30(8), 865-873.
- Nogués, S., & Baker, N. R. (2000). Effects of drought on photosynthesis in Mediterranean plants grown under enhanced UV-B radiation. *Journal of Experimental Botany*, 51, 1309-1317.
- Ramel, F., Sulmon, C., Bogard, M., Couée, I., & Gouesbet, G. (2009). Differential patterns of reactive oxygen species and antioxidative mechanisms during atrazine injury and sucrose-induced tolerance in *Arabidopsis thaliana* plantlets. *BMC Plant Biology*, 9(1), 28.
- Rao, M. V., Paliyath, G., Ormrod, D. P., Murr, D. P., & Watkins, C. B. (1997). Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂-metabolizing enzymes (salicylic acid-mediated oxidative damage requires H₂O₂). *Plant Physiology*, 115, 137-149.
- Raza, A., Razzaq, A., Mehmood, S. S., Zou, X., Zhang, X., Lv, Y., & Xu, J. (2019). Impact of climate change on crops adaptation and strategies to tackle its outcome: A review. *Plants*, 8(2), 34.
- Rivero, L., Scholl, R., Holomuzki, N., Crist, D., & Grotewold, E. (2014). *Arabidopsis* plants: growth, preservation of seeds, transformation, and genetic crosses. In J. J. Sanchez-Serrano & J. Salinas (Eds.), *Arabidopsis Protocols* (Methods in Molecular Biology, vol. 1062, pp. 3-25). Springer Science+Business Media.
- Romanenko, K. O., Babenko, L. M., Smirnov, O. E., & Kosakivska, I. V. (2022). Antioxidant protection system and photosynthetic pigment composition in *Secale cereale* subjected to short-term temperature stresses. *Open Agriculture*

- Journal, 16, e187433152206273.
- Sagisaka, S. (1976). The occurrence of peroxide in a perennial plant, *Populus gelrica*. *Plant Physiology*, 57, 308–309.
- Scholl, R., Rivero-Lepinckas, L., & Crist, D. (1998). Growth of plants and preservation of seeds. In J. Martinez-Zapater & J. Salinas (Eds.), *Arabidopsis Protocols (Methods in Molecular Biology, vol. 82, pp. 1-12)*. Humana Press Inc.
- Shelp, B. J., Aghdam, M. S., & Flaherty, E. J. (2021). γ -Aminobutyrate (GABA) regulated plant defense: Mechanisms and opportunities. *Plants*, 10, 1939.
- Sheteiwy, M. S., Shao, H., Qi, W., Hamoud, Y. A., Shaghaleh, H., Khan, N. U., Yang, R., & Tang, B. (2019). GABA-alleviated oxidative injury induced by salinity, osmotic stress and their combination by regulating cellular and molecular signals in rice. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 5709.
- Shkliarevskiy, M. A., Kolupaev, Y. E., Karpets, Y. V., et al. (2021). Involvement of Nitrate Reductase and Nitric Oxide (NO) in Implementation of the Stress-Protective Action of a Carbon Monoxide (CO) Donor on Wheat Seedlings under Hyperthermy. *Russian Journal of Plant Physiology*, 68(5), 688-695. DOI: 10.1134/S1021443721040166
- Signorelli, S., Coitin, O., E.L., Borsani, O., & Monza, J. (2014). Molecular mechanisms for the reaction between OH radicals and proline: insights on the role as a reactive oxygen species scavenger in plant stress. *The Journal of Physical Chemistry*, 118, 37-47.
- Singh, S., Parihar, P., Singh, R., Singh, V.P., & Prasad, S.M. (2016). Heavy metal tolerance in plants: Role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1143.
- Suhel, M., Husain, T., Pandey, A., Singh, S., Dubey, N.K., Prasad, S.M., & Singh, V.P. (2023). An appraisal of ancient molecule GABA in abiotic stress tolerance in plants, and its crosstalk with other signaling molecules. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42, 614-629.
- Tang, M., Li, Z., Luo, L., Cheng, B., Zhang, Y., Zeng, W., & Peng, Y. (2020). Nitric oxide signal, nitrogen metabolism, and water balance affected by γ -aminobutyric acid (GABA) in relation to enhanced tolerance to water stress in creeping bentgrass. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 7460.
- Tognolli, M., Penel, C., Greppin, H., & Simon, P. (2003). Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 288(1-2), 129-138.
- Yong, B., Xie, H., Li, Z., Li, Y.P., Zhang, Y., Nie, G., Zhang, X.Q., Ma, X., Huang, L.K., Yan, Y.H., & Peng, Y. (2017). Exogenous application of GABA improves

- polyamines PEG-induced drought tolerance positively associated with GABA-shunt, and proline metabolism in white clover. *Frontiers in Physiology*, 8, 1107.
- Yu, Y., Lv, Y., Shi, Y., Li, T., Chen, Y., Zhao, D., & Zhao, Z. (2018). The role of phyto-melatonin and related metabolites in response to stress. *Molecules (Basel)*, 23(8), 1887.
- Zhao, K., Fan, H., Zhou, S., & Song, J. (2003). Study on the salt and drought tolerance of *Suaeda salsa* and *Kalanchoe clavigrammontiana* under iso-osmotic salt and water stress. *Plant Science*, 165(4), 837-844.
- Zhuk, O.I., & Grygoryuk, I.P. (2002). Method for assessing the heat resistance of winter wheat varieties. Patent 45879 UA, IPC 6A01G7/OO. Published on April 15, 2002.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	3
1. МЕТОДИКА ПІДГОТОВКИ РОСЛИННОГО МАТЕРІАЛУ.....	6
1.1. Дослідження впливу ФАР на стійкість проростків злаків до потенційно летального теплового стресу.....	6
1.2. Дослідження впливу ФАР на стійкість проростків злаків до помірною (сублетального) теплового стресу.....	8
1.3. Дослідження впливу ФАР на стійкість проростків до модельної посухи (осмотичного стресу, створюваного ПЕГ 6000).....	9
2. МЕТОДИКА СУПУТНИХ БІОХІМІЧНИХ АНАЛІЗІВ.....	10
2.1. Показники генерації активних форм кисню, розвитку окиснювального стресу і пошкоджень мембран.....	11
2.1.1. Визначення генерації супероксидного аніон-радикала органами проростків злаків.....	13
2.1.2. Визначення вмісту пероксиду водню у рослинному матеріалі.....	14
2.1.3. Визначення вмісту 2-тіобарбітурат-активних продуктів пероксидного окиснення ліпідів у рослинному матеріалі.....	15
2.1.4. Оцінка стану біологічних мембран за виходом речовин, що поглинають в області УФ-В.....	15
2.2. Основні показники стану антиоксидантної системи.....	15
2.2.1. Визначення активності антиоксидантних ферментів.....	16
2.2.1.1. Супероксиддисмутаза	17
2.2.1.2. Каталаза	18
2.2.1.3. Неспецифічна пероксидаза.....	19
2.2.1.4. Визначення вмісту білка за методом Бредфорд.....	20
2.2.2. Визначення вмісту поліфункціональних стресових метаболітів з антиоксидантними властивостями.....	21
2.2.2.1. Пролін.....	21
2.2.2.2. Розчинні вуглеводи.....	22
2.2.2.3. Фенольні і флавоноїдні сполуки.....	23
3. РЕЗУЛЬТАТИ ПРАКТИЧНОГО ВИКОРИСТАННЯ ПРОРОСТКІВ ЗЛАКІВ ТА ЇХ ОРГАНІВ ЯК МОДЕЛЬНИХ ОБ'ЄКТІВ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ СТРЕС-ПРОТЕКТОРНОЇ ДІЇ ФАР.....	25

3.1. Дослідження протекторного впливу мелатоніну на проростки пшениці за умов дії теплового стресу і участі АФК та іонів кальцію в реалізації його ефектів	25
3.2. Вплив праймінгу насіння пшениці і жита мелатоніном на функціонування їх протекторних систем за умов помірного теплового стресу	30
3.3. Вивчення впливу гамма-аміномасляної кислоти на стійкість проростків пшениці різних генотипів до модельної посухи	37
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	44