

УДК 581.1

№ держресстрації 0117U002514

Інв. №

ДЕРЖАВНИЙ БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

вул. Алчевських, 44, м. Харків, 61002

тел. +38(057) 7003888 <http://btu.kharkov.ua>, info@btu.kharkov.ua



П р о р е к т о р з н а у к о в о ї р о б о т и

В а л е р и й М И Х А Й Л О В

З В І Т

П Р О Н А У К О В О Д О С Л І Д Н І Р О Б О Т У

«МЕХАНІЗМИ ІНДУКУВАННЯ КОМПОНЕНТІВ СТРЕС-ПРОТЕКТОРНОЇ СИСТЕМИ

РОСЛИН»

(остаточний)

Керівник НДР

канд. с.-г. наук












М.В. Швиденко

Харків – 2022

Рукопис закінчено 25 листопада 2022 року

Результати цієї роботи розглянуто науково-технічною радою факультету агрономії та захисту рослин, протокол № 2 від 23.12.2022 р.

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР: канд. с.-г. наук, доцент		М. В. Швиденко (розділи 4, 5, 6, висновки)
Виконавці:		
д-р біол. наук, професор		Ю. Е. Колупасв (вступ, розд. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, висновки)
д-р біол. наук, професор		Ю. В. Карпець (розд. 1, 2, 4, 6)
канд. біол. наук, доцент		Т. О. Ястреб (розд. 1, 6)
канд. біол. наук, доцент		Г. А. Лугова (розд. 1, 2, 4, 6)
д-р філософії (біол.)		М. А. Шкляревський (розд. 4, 5, 7, 8)
д-р філософії (біол.)		О. І. Кокорев (розд. 4, 5, 7)
д-р філософії (біол.)		О. І. Горелова (розд. 4, 5, 8)
асистент		К. М. Гавва (розд. 3)
аспірант		С. М. Приходько (розд. 7)
аспірант		Д. А. Тарабан (розд. 6)

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 98 с., 23 рис., 5 табл., джерел 172.

Об'єкт дослідження – фізіологічно активні речовини, стресові чинники, стрес-протекторні системи рослин.

Мета роботи – з'ясування механізмів впливу оксиду азоту, сірководню, монооксиду вуглецю, поліамінів та мелатоніну на стійкість рослин до дії абіотичних стресорів, вивчення регуляції антиоксидантної і осмопротекторної систем за дії на рослини стресових чинників помірної сили.

Методи дослідження – біохімічні, фізіологічні, польові, статистичні.

Досліджено вплив донорів оксиду азоту на активність антиоксидантних ферментів злаків. Встановлено, що помірні концентрації нітропрусида натрію (НПН) викликають підвищення активності супероксиддисмутази, каталази, гваяколпероксидази і аскорбатпероксидази, у той час як високі інгібують ці ферменти. В індукованні їх активності екзогенним NO беруть участь кальцій і АФК як сигнальні посередники.

Вивчено стрес-протекторну дію НПН на рослини ячменю. Обробка донором оксиду азоту НПН підвищувала їх посухостійкість в умовах ґрунтової культури, що виявлялося у зменшенні спричиненого посухою пригнічення росту, збереженні пулу фотосинтетичних пігментів, підтриманні водного балансу та підвищенні антиоксидантної активності. Показано сортоспецифічні особливості дії НПН за умов посухи.

Досліджено участь ендогенного сірководню у формуванні теплостійкості проростків пшениці (*Triticum aestivum*), спричиненому короткочасною дією високої температури. Показано транзиторне зростання вмісту сірководню у коренях з максимумом через 1,5 год після однохвилинного впливу на проростки температури 42°C. Попередній загартувальний прогрів значно підвищував теплостійкість, зменшуючи інтенсивність ПОЛ і рівень загибелі проростків після 10-хвилинного ушкоджувального прогріву за температури 45°C. При цьому їх обробка скавенджером сірководню гіпотаурином та інгібітором L-цистеїндесульфгідрази пірватом натрію нівелювала розвиток теплостійкості.

При дослідженні впливу екзогенного монооксиду вуглецю на теплостійкість рослинних об'єктів встановлено, що обробка проростків пшениці донором СО геміном індукувала розвиток їх теплостійкості. Однією з причин стрес-протекторної дії донора СО на проростки пшениці є активація ферментативної антиоксидантної системи. Встановлено, що донор СО підвищував активність супероксиддисмутази (СОД), каталази та гваяколпероксидази у коренях проростків пшениці. Ймовірними посередниками у реалізації стрес-протекторного впливу донора СО на проростки пшениці є іони кальцію та АФК.

Вивчено вплив фоліарної обробки рослин пшениці путресцином і сперміном на функціонування їх протекторних систем за посухи в умовах лабораторної ґрунтової культури. Показано зменшення ристінгуючого впливу посухи за обробки рослин цими поліамінами. За їх дії зменшувалися спричинювані посухою прояви водного дефіциту та окиснювального стресу. Обробка рослин

поліамінами сприяла збереженню пулу хлорофілів і каротиноїдів у листках за стресових умов. Також передобробка передобробка поліамінами модифікувала зміни вмісту проліну, цукрів і флавоноїдних сполук, спричинювані дією посухи.

Досліджено вплив екзогенного мелатоніну на теплостійкість проростків пшениці. Показано його стрес-протекторний вплив в концентраціях діапазону 0,1–10 мкМ. Методом інгібіторного аналізу встановлено участь АФК та кальцію як сигнальних посередників у реалізації такого ефекту мелатоніну.

Ключову роль в адаптації рослин до зневоднення відіграють осмопротекторна і антиоксидантна захисні системи. Функціонування цих систем у рослин з різною таксономічною приналежністю може істотно відрізнятися. Порівнювали стан осмопротекторної і антиоксидантної систем етіюльованих проростків озимих жита (*Secale cereale*), тритикале (\times *Triticosecale*) і пшениці (*Triticum aestivum*) за нормального зволоження і дії агента осмотичного стресу 12% ПЕГ 6000. Показано, що стійкість етіюльованих проростків жита була вищою ніж тритикале, але резистентність тритикале перевершувала стійкість пшениці. Зроблено висновок про відмінності стратегій адаптації у злаків різних видів. У жита найбільший внесок в захисну систему мають пролін, флавоноїдні сполуки і пероксидаза. Водночас особливістю тритикале за стресових умов є підвищені активність СОД і вміст безбарвних флавоноїдів. Вищі показники функціонування антиоксидантної і осмопротекторної систем у проростків жита і тритикале зумовлюють їх вищу порівняно з пшеницею стійкість до дегідратації.

Механізми низькотемпературної адаптації тритикале, що поєднує високу продуктивність і морозостійкість, вивчені недостатньо. Досліджували динаміку загального вмісту фенольних сполук, флавоноїдів і окремо кількості антоціанів за умов холодого загартування (6 діб за температури 2–4°C) проростків сортів з різною морозостійкістю: Букет і Раритет (озимі високоморозостійкі) та Олександра і Підзимок харківський (менш стійкі, що належать до «дворучок»). Загартування спричиняло невеликий підйом сумарного вмісту фенольних сполук та значне підвищення вмісту флавоноїдів у проростках усіх досліджуваних сортів, при цьому істотних сортових відмінностей не відзначалося. В процесі холодого загартування вміст антоціанів також зростав і досягав приблизно однакових величин у сортів Букет, Раритет і Олександра, проте у найменш морозостійкого сорту Підзимок харківський цей показник був значно нижчим. Зроблено висновок про внесок антоціанів, але не вторинних метаболітів в цілому, у формування морозостійкості проростків тритикале та систему антиоксидантного захисту при низьких температурах.

Ключові слова: оксид азоту, активні форми кисню, сірководень, монооксид вуглецю, поліаміни, мелатонін, антиоксидантна система, низькомолекулярні протектори, абіотичні стресори, стійкість, злаки.

ABSTRACT

Research report: p. 98, 23 fig., 5 table., 172 literary sources.

The object of research is physiologically active substances, stress factors, stress-protective systems of plants.

The purpose of the work is to find out the mechanisms of the influence of nitric oxide, hydrogen sulfide, carbon monoxide,

polyamines and melatonin on the resistance of plants to the action of abiotic stressors, to study the regulation of antioxidant and osmoprotective systems under the influence of moderate stress factors on plants.

Research methods are biochemical, physiological, field, statistical.

The influence of nitrogen oxide donors on the activity of antioxidant enzymes of cereals was studied. Moderate concentrations of sodium nitroprusside (SNP) have been found to increase the activity of superoxide dismutase, catalase, guaiacol peroxidase, and ascorbate peroxidase, while high concentrations inhibit these enzymes. Calcium and ROS are involved in the induction of their activity by exogenous NO as signal mediators.

The stress-protective effect of SNP on barley plants was studied. Nitric oxide donor treatment of SNP increased their drought resistance under soil culture conditions, which was manifested in the reduction of drought-induced growth inhibition, preservation of the pool of photosynthetic pigments, maintenance of water balance, and increase in antioxidant activity. Variety-specific features of SNP action under drought conditions are shown.

The participation of endogenous hydrogen sulfide in the formation of heat resistance of wheat seedlings (*Triticum aestivum*) caused by the short-term effect of high temperature was studied. A transient increase in the content of hydrogen sulfide in the roots was shown, with a maximum after 1.5 h after a one-minute exposure to the temperature of 42°C. Pre-hardening heating significantly increased heat resistance, reducing the intensity of LOP and the level of death of seedlings after a 10-minute damaging heating at a temperature of 45°C. At the same time, their treatment with the hydrogen sulfide scavenger hypotaurine and the L-cysteine desulphydrase inhibitor sodium pyruvate did not affect the development of heat resistance.

When studying the effect of exogenous carbon monoxide on the heat resistance of plant objects, it was established that the treatment of wheat seedlings with the CO donor hemin induced the development of their heat resistance. One of the reasons for the stress-protective action of the CO donor on wheat seedlings is the activation of the enzymatic antioxidant system. It was established that the CO donor increased the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase, and guaiacol peroxidase in the roots of wheat seedlings. Calcium ions and ROS are likely mediators in the realization of the stress-protective effect of the CO donor on wheat seedlings.

The effect of foliar treatment of wheat plants with putrescine and spermine on the functioning of their protective systems during droughts in laboratory soil culture conditions was studied. A decrease in the inhibitory effect of drought was shown when plants were treated with these polyamines. Under their action, drought-induced manifestations of water deficit and oxidative stress were reduced. Treatment of plants with polyamines contributed to the preservation of the pool of chlorophylls and carotenoids in leaves under stressful conditions. Also, pretreatment with polyamines modified changes in the content of proline, sugars, and flavonoid compounds caused by drought.

The effect of exogenous melatonin on heat resistance of wheat seedlings was investigated. Its stress-protective effect is shown in concentrations of 0.1–10 mM. Using the method of inhibitory analysis, the participation of ROS and calcium as signal mediators in the implementation of this effect of melatonin was established.

Osmoprotective and antioxidant systems play a key role in the adaptation of plants to dehydration. The functioning of these systems in plants with different taxonomic affiliations can differ significantly. The state of the osmoprotective and antioxidant systems of etiolated seedlings of winter rye (*Secale cereale*), triticale (\times *Triticosecale*) and wheat (*Triticum aestivum*) was compared under normal moisture and the action of the osmotic stress agent 12% PEG 6000. It was shown that the stability of etiolated rye seedlings was higher than that of triticale, but the resistance of triticale exceeded that of wheat. A conclusion was made about the differences in adaptation strategies in cereals of different species. Proline, flavonoid compounds and peroxidase make the biggest contribution to the defense system in rye. At the same time, a feature of triticale under stressful conditions is increased SOD activity and the content of colorless flavonoids. Higher indicators of the functioning of the antioxidant and osmoprotective systems in rye and triticale seedlings determine their higher resistance to dehydration compared to wheat.

The mechanisms of low-temperature adaptation of triticale, which combines high productivity and frost resistance, have not been sufficiently studied. We studied the dynamics of the total content of phenolic compounds, flavonoids and, separately, the amount of anthocyanins under the conditions of cold hardening (6 days at a temperature of 2–4°C) of seedlings of varieties with different frost resistance: Buket, Rarytet (high winter frost resistance), Oleksandra, Pidzymok Kharkivskiyi (less resistant, belonging to "two-doors"). Hardening caused a small increase in the total content of phenolic compounds and a significant increase in the content of flavonoids in the seedlings of all studied varieties, while no significant varietal differences were noted. In the process of cold hardening, the content of anthocyanins also increased and reached approximately the same values in the varieties Buket, Rarytet and Oleksandra, but this indicator was significantly lower in the least frost-resistant variety Pidzymok Kharkivskiyi. A conclusion was made about the contribution of anthocyanins, but not secondary metabolites in general, to the formation of frost resistance of triticale seedlings and the system of antioxidant protection at low temperatures.

Key words: nitric oxide, reactive oxygen species, hydrogen sulfide, carbon monoxide, polyamines, melatonin, antioxidant system, low-molecular protectors, abiotic stressors, resistance, cereals.

ЗМІСТ

ВСТУП	10
1. РОЛЬ ОКСИДУ АЗОТУ В РЕГУЛЯЦІЇ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ РОСЛИН.....	13
2. АДАПТИВНІ РЕАКЦІЇ РОСЛИН ЯЧМЕНЮ НА ДІЮ ПОСУХИ ЗА ОБРОБКИ ДОНОРОМ ОКСИДУ АЗОТУ.....	17
3. УЧАСТЬ ЕНДОГЕННОГО СІРКОВОДНЮ У ФОРМУВАННІ ТЕПЛОСТІЙКОСТІ ПРОРОСТКІВ ПШЕНИЦІ.....	19
4. АНТИОКСИДАНТНА СИСТЕМА ПРОРОСТКІВ ПШЕНИЦІ ЗА ДІЇ МОНООКСИДУ ВУГЛЕЦЮ ЗА УМОВ ТЕПЛООВОГО СТРЕСУ	30
5. ВПЛИВФОЛІАРНОЇ ОБРОБКИ РОСЛИН ПШЕНИЦІ ПУТРЕСЦИНОМ І СПЕРМІНОМ НА ФУНКЦІОНУВАННЯ ЇХ ПРОТЕКТОРНИХ СИСТЕМ ЗА УМОВ ПОСУХИ	38
6. УЧАСТЬ АФК ТА ІОНІВ КАЛЬЦІЮ В ІНДУКУВАННІ ТЕПЛОСТІЙКОСТІ ПРОРОСТКІВ ПШЕНИЦІ ЕКЗОГЕННИМ МЕЛАТОНІНОМ.....	51
7. СТАН ОСМОПРОТЕКТОРНОЇ І АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМ ПРОРОСТКІВ ОЗИМИХ ЖИТА, ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ І ТРИТИКАЛЕ ЗА АДАПТАЦІЇ ДО ОСМОТИЧНОГО СТРЕСУ.....	59
8. ВМІСТ ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ У ПРОРОСТКАХ ТРИТИКАЛЕ РІЗНИХ СОРТІВ ЗА АДАПТАЦІЇ ДО НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР.....	71
ВИСНОВКИ	79
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ	81

ВСТУП

Абіотичні стресові чинники є основними обмеженнями для росту і розвитку рослин [36]. Вплив на рослини екстремальних температур, засолення, посухи, важких металів призводить до значних втрат в сільськогосподарській сфері. У зв'язку з глобальними кліматичними змінами та впливом антропогенних факторів актуальність проблеми стійкості рослин дедалі зростає. Як відомо, серед шляхів підвищення стійкості культурних рослин є генетико-селекційний (включно з трансгенозом) та агротехнічний, пов'язаний із застосуванням фізіологічно активних речовин та інших засобів, що індукують фізіологічні механізми стійкості. Для ефективного використання обох підходів необхідне постійне поглиблення фундаментальних знань у галузі стресу і адаптації рослин.

Формування адаптивних реакцій рослин на дію стресорів відбувається за участю мережі сигнальних посередників, серед яких особливу роль відіграють кальцій і активні форми кисню [39, 103]. В останні роки до ключових сигнальних речовин відносять і газотрансмітери [79, 96, 101, 167], передусім монооксид азоту (NO), сірководень (H₂S) і монооксид вуглецю (CO) [162].

Реакції рослин у відповідь на дію несприятливих чинників включають в себе запуск універсальних захисних систем, до яких належать, зокрема, синтез стресових білків, активація антиоксидантної системи і накопичення поліфункціональних низькомолекулярних сполук [24, 67]. Ймовірно, що з подібними реакціями у багатьох випадках пов'язані ефекти неспецифічної або перехресної стійкості рослин до стресових чинників різної природи. Прояв перехресної стійкості за дії на організм стресового чинника може бути зумовлений не тільки індукцією одним стресором широкого спектра адаптивних реакцій, а й здатністю протекторних сполук виконувати множинні функції [18]. Серед таких мультифункціональних органічних молекул особливе значення для адаптації рослин має накопичення ряду азотовмісних сполук – вільних амінокислот (в першу чергу проліну), бетаїнів (метильованих похідних амінокислот) і поліамінів.

Поліаміни являють собою аліфатичні аміни, що мають регулярне просторове розташування позитивних зарядів в молекулі [102]. Найпоширеніші у рослин поліаміни путресцинового ряду – путресцин, спермідин і спермін [74].

Останніми десятиліттями активно досліджуються механізми участі поліамінів в адаптації рослин до несприятливих умов [27, 72]. Частково протекторні ефекти поліамінів пояснюють їх стабілізуючою дією на білки, нуклеїнові кислоти і мембранні структури [43, 84]. Однак в цілому спектр біологічних ефектів поліамінів значно ширший і досліджений далеко не повною мірою.

Індоламін мелатонін (*N*-ацетил-5-метокситриптамін) відомий насамперед як нейрогормон, що синтезується в епіфізі ссавців і бере участь у регуляції циркадних ритмів, сну, настрою, температури тіла, імунної системи та багатьох інших функцій. У рослин мелатонін був вперше ідентифікований у 1995 році [61], а інтенсивні дослідження його функцій здійснюються лише в останні 10–15 років [34, 62]. Нині відомо, що мелатонін впливає на експресію значного різноманіття генних елементів у різних умовах, насамперед стресових [163, 168]. Проте в цілому уявлення про механізм дії мелатоніну як біорегулятора у рослин лише формуються. Зокрема, недостатньо інформації про сигнальні посередники, що залучаються до реалізації стрес-протекторної дії мелатоніну на рослини.

Видові особливості стратегій адаптації і функціонування антиоксидантної та осмопротекторної систем як неспецифічних

компонент стійкості у культурних злаків в цілому залишаються малодослідженими. У зв'язку з цим, доцільні комплексні дослідження змін стану ферментативної антиоксидантної системи та вмісту низькомолекулярних протекторів (у тому числі антиоксидантів) при адаптації злаків до посухи, екстремальних температур та інших несприятливих чинників. Так само є доцільним і вивчення видових особливостей стрес-протекторної дії нових груп фізіологічно активних сполук – газотрансмітерів, біогенних амінів, гормоноподібних сполук.

У зв'язку з викладеним, мета досліджень полягала у з'ясуванні механізмів впливу оксиду азоту, сірководню, монооксиду вуглецю, поліамінів та мелатоніну на стійкість рослин до дії абіотичних стресорів, вивчення регуляції антиоксидантної і осмопротекторної систем за дії на рослини стресових чинників помірної сили. Робота включала в себе такі завдання:

- дослідження вплив донорів оксиду азоту на активність антиоксидантних ферментів злаків;
- оцінка впливу донорів оксиду азоту на посухостійкість рослин ячменю у зв'язку з функціонуванням стрес-протекторних систем;
- дослідження участі ендогенного сірководню у формуванні теплостійкості проростків пшениці, спричиняваному короткочасною дією високої температури;
- дослідження впливу донора монооксиду вуглецю геміну на теплостійкість проростків пшениці і участі АФК та іонів кальцію в реалізації його фізіологічних ефектів;
- встановлення участі АФК та іонів кальцію в індукванні мелатоніном стійкості проростків пшениці до потенційно летального теплового стресу;
- порівняння стану осмопротекторної і антиоксидантної систем проростків озимих жита, пшениці м'якої і тритикале за адаптації до осмотичного стресу;
- дослідження особливостей накопичення вторинних метаболітів проростками тритикале різних сортів за адаптації до низьких температур.

1. РОЛЬ ОКСИДУ АЗОТУ В РЕГУЛЯЦІЇ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ РОСЛИН

Однією з універсальних протекторних систем рослин є антиоксидантна система [70]. Оксид азоту може чинити на антиоксидантну систему досить складний і неоднозначний вплив, механізми якого досліджені далеко не повністю [85, 116, 161]. NO має здатність модифікувати багато антиоксидантних ферментів як *in vivo*, так і *in vitro*. Серед них аскорбатпероксидаза, гваяколпероксидаза, різні форми супероксиддисмутази, каталаза, глутатіон-S-трансфераза, глутатіонредуктаза [45, 63, 121]. При цьому тип посттрансляційної модифікації білків дією оксиду азоту може по-різному впливати на їх функціональну активність. Водночас за дії донорів NO на рослини *in vivo* накладаються ефекти прямого і непрямого впливу NO не тільки на ферментні системи, які знешкоджують АФК, а й на ензими, які генерують АФК.

Завданням даного розділу було дослідження ролі АФК і різних пулів кальцію у NO-залежній регуляції активності антиоксидантних ферментів колеоптилів пшениці.

1.1. Матеріал, умови і методи досліджень

Для досліджень використовували рослини виду *Triticum aestivum* L. Експериментальним об'єктом слугували інтактні етіоловані проростки пшениці озимої м'якої сорту Досконала.

Насіння озимої м'якої пшениці знезаражували 5%-ним перексидом водню і пророщували в чашках Петрі в темряві за температури 20°C на очищеній водопровідній воді. При дослідженні ефектів донора оксиду азоту та інших фізіологічно активних речовин (ФАР) відрізки колеоптилів, відділені від 4-добових проростків, вирощуваних за температури 20°C, переносили на простерилізований 2% розчин сахарози з добавкою пеніциліну (Na-сіль – 100 тис. од./л), у відповідних варіантах у середовище інкубації колеоптилів досліджувані речовини додавали до цільових концентрацій.

Активність цитозольної СОД, визначали, використовуючи метод, в основі якого здатність ферменту конкурувати з нітротетразолієм синім за супероксидні аніони, які утворюються внаслідок аеробної взаємодії НАДН і феназинметосульфату [21]. Активність каталази визначали за кількістю розкладеного перексиду водню за одиницю часу [20]. Активність аскорбатпероксидази (АПО) оцінювали за зменшенням оптичної густини у результаті окиснення аскорбінової кислоти у присутності H₂O₂ [130]. При визначенні активності розчинної гваяколпероксидази (ГПО) як субстрат використовували перексид водню, у ролі відновника – гваякол.

Біохімічні аналізи виконували у 3-5-разовому біологічному повторенні у 3-4 незалежних дослідах. Статистичну обробку результатів здійснювали загальноприйнятими методами [15]. На рисунках наведені середні значення та їх стандартні відхилення.

1.2. Активність антиоксидантних ферментів у колеоптилях пшениці за дії донора оксиду азоту і модифікаторів редокс- і кальцієвого гомеостазу

Активність СОД в колеоптилях пшениці збільшувалася під впливом всіх трьох досліджуваних концентрацій НРН через 4

год після початку його дії на колеоптилі (рис. 1, а). Через 24 год обробки ефект посилювався. Максимальні значення активності ферменту спостерігали за дії на колеоптилі 0,2 мМ НПН. Активність каталази через 4 год обробки колеоптилів НПН у концентраціях 0,1 і 0,2 мМ не змінювалася, а під його впливом у концентрації 0,5 мМ відбувалося незначне зниження активності ферменту (рис. 1, б). Через 24 год за впливу НПН у концентраціях 0,1 і 0,2 мМ відбувалося підвищення активності каталази, а у варіанті з 0,5 мМ НПН активність ферменту була нижчою, ніж у контролі.

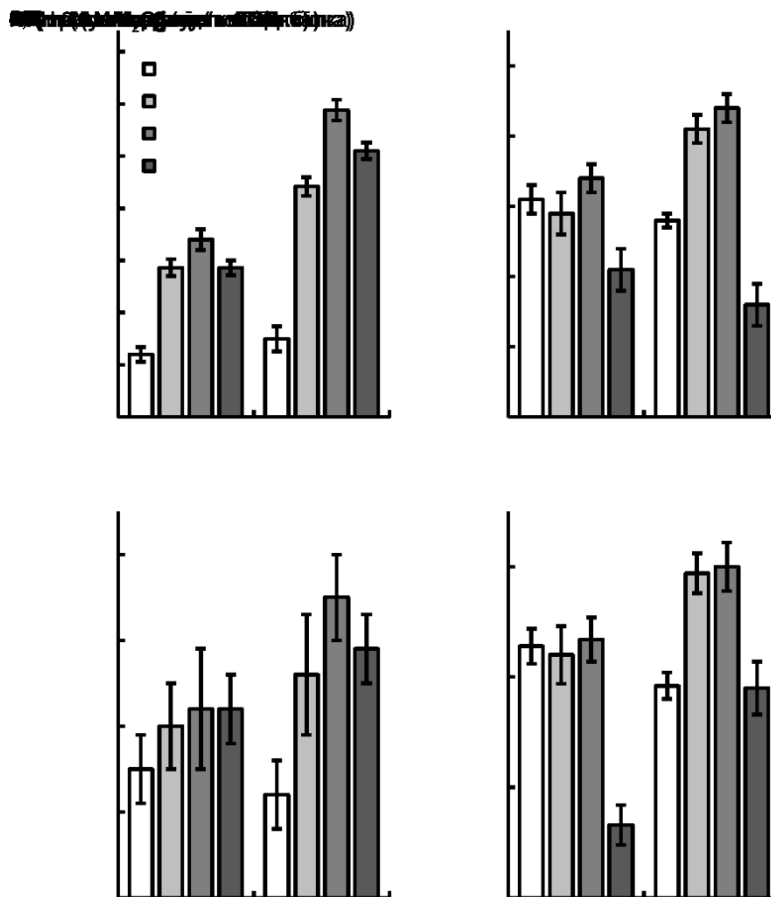


Рис. 1. Концентраційна залежність впливу НПН на активність СОД (а), каталази (б), АПО (в) і ГПО (г) у колеоптилях пшениці.

Активність АПО через 4 год впливу НПН на колеоптилі істотно не змінювалася (рис. 1, в). Через 24 год після початку обробки донором оксиду азоту активність ферменту підвищувалася у варіанті з концентрацією НПН 0,2 мМ. Через 4 год впливу НПН у концентраціях 0,1 і 0,2 мМ активність ГПО у колеоптилях пшениці не змінювалася, а за впливу 0,5 мМ НПН відбувалося зниження активності ферменту (рис. 1, г). Через 24 год спостерігалось підвищення активності ГПО у варіантах із 0,1 і 0,2 мМ НПН, а у колеоптилях, оброблених донором NO у концентрації 0,5 мМ, активність ферменту відновлювалася до значень контрольного варіанта.

Обробка колеоптилів антиоксидантом іонолом (5 мкМ) та інгібітором НАДФН-оксидази імідазолом (2 мкМ), а також антагоністами кальцію неоміцином (50 мкМ) і нікотинамідом (1 мМ) усувала підвищення активності досліджуваних антиоксидантних

ферментів, спричинюване дією НПН.

Отже, кальційзалежне посилення генерації АФК, яке відбувається за впливу донора NO, очевидно, бере участь у формуванні сигналу, що індукує захисні реакції клітин колеоптилів, зокрема, спричиняє активацію антиоксидантної системи.

2. АДАПТИВНІ РЕАКЦІЇ РОСЛИН ЯЧМЕНЮ НА ДІЮ ПОСУХИ ЗА ОБРОБКИ ДОНОРОМ ОКСИДУ АЗОТУ

Більшість даних про стрес-протекторну дію донорів NO на рослини отримано на клітинних культурах, калюсах, ізольованих органах та інших модельних об'єктах. Досліджували вплив обробки донором оксиду азоту НПН на ростові показники, водний статус, накопичення осмолітів та активність антиоксидантних ферментів – каталази, гваяколпероксидази (ГПО) і аскорбатпероксидази (АПО) за ґрунтової посухи у рослин трьох сортів ячменю.

У лабораторній ґрунтовій культурі використовували сорти Геліос (слабопосухостійкий), Козак (середньопосухостійкий) і Мономах (високопосухостійкий). Рослини вирощували у пластикових контейнерах (ґрунт чорнозем типовий важкосуглинковий). Вологість субстрату – близько 80% від ПВ, освітлення – 6 клк, фотоперіод – 16 год, температура 25/20°C (день/ніч). Посуху створювали протягом шести діб, починаючи з 11-го дня вирощування рослин шляхом зменшення норми поливу з поступовим зниженням вологості ґрунту до 25-30% від ПВ. Після цього (через 6 днів) поновлювали полив.

Вміст проліну визначали за методом [40] з модифікаціями. Сумарний вміст цукрів визначали методом Морріса-Рое з використанням антронового реактиву [170].

Активність каталази визначали за кількістю розкладеного пероксиду водню за одиницю часу [20]. Активність АПО оцінювали за зменшенням оптичної густини у результаті окиснення аскорбінової кислоти у присутності пероксиду водню [130]. При визначенні активності розчинної ГПО як субстрат використовували пероксид водню, у ролі відновника – гваякол.

Кількість хлорофілів *a* та каротиноїдів визначали спектрофотометричним методом за довжини хвилі 665, 649 і 440,5 нм, використовуючи для екстракції 96% етанол [22].

Під впливом посухи відбувалося пригнічення росту надземної частини рослин ячменю всіх трьох сортів. Обприскування рослин розчинами НПН (0,5, 2 і 10 мМ) пом'якшувало негативний вплив посухи на ріст рослин. Найбільш ефективною була концентрація 2 мМ.

Посуха викликала значне збільшення водного дефіциту у рослин слабопосухостійкого сорту Геліос (до 22%), у той час як у сортів Козак і Мономах ці величини склали приблизно 18 і 13%, відповідно. Під впливом НПН в усіх концентраціях водний дефіцит рослин всіх трьох сортів помітно зменшувався. Обробка рослин НПН також запобігала спричинюваній посухою деградації фотосинтетичних пігментів.

Під дією донора оксиду азоту за умов посухи у листках ячменю підвищувалися активність каталази, АПО і ГПО та вміст цукрів. Найбільш виразним ефект підвищення активності антиоксидантних ферментів був у сорту Геліос, який відрізнявся низькою базовою активністю каталази та АПО. І, навпаки, у сортів Козак і особливо Мономах, що мали вищу базову активність антиоксидантних ферментів, активність каталази та АПО під впливом НПН підвищувалася незначно.

3. УЧАСТЬ ЕНДОГЕННОГО СІРКОВОДНЮ У ФОРМУВАННІ ТЕПЛОСТІЙКОСТІ ПРОРОСТКІВ ПШЕНИЦІ

Нині сірководень розглядається як агент, що бере участь у регуляції багатьох функцій рослинного організму, зокрема, ростових процесів, дозрівання і старіння плодів та адаптації рослин до дії стресорів різної природи [171]. Активація адаптивних реакцій рослин є одним з найбільш яскравих фізіологічних ефектів сірководню [111, 113, 147, 148]. Встановлено, що з участю сірководню відбувається посилення функціонування антиоксидантної, осмопротекторної систем та активація синтезу стресових білків [41, 112]. Такі реакції важливі при адаптації рослин до дії стресових чинників різної природи.

Нині накопичені відомості щодо залучення сірководню у процеси адаптації рослин до зневоднення [99, 108], засолення [57], дії важких металів [152], гіпо- і гіпертермії [29, 98, 147]. З'ясування участі сигнальних посередників в адаптації рослин до останнього чинника особливо актуальне, оскільки, згідно з прогнозними кліматичними моделями, до кінця 21 століття температура на планеті може збільшитися майже на 4 градуси, що може призвести до зниження глобальної врожайності основних сільськогосподарських культур на 3-8% [107].

На різних рослинних об'єктах встановлений позитивний вплив донорів сірководню на стійкість до високих температур. Так, обробка суспензійної культури клітин тютюну NaHS пом'яксувала окиснювальні пошкодження, спричинювані нагріванням [111]. Ефект зменшення окиснювальних пошкоджень проростків кукурудзи за умов гіпертермії виявлений також під впливом повільно діючого донора сірководню GYY4137 (morpholin-4-ium 4 methoxyphenyl(morpholino) phosphinodithionate) [113]. Підвищення теплостійкості ізольованих колеоптилів пшениці під дією донора сірководню NaHS супроводжувалося збільшенням активності ключових антиоксидантних ферментів [98]. Одним із механізмів прямого впливу сірководню на редокс-гомеостаз рослинних клітин за стресових умов може бути активація окремих захисних ферментів шляхом персульфідування [35, 118].

Вказані ефекти досліджувалися шляхом застосування екзогенних донорів сірководню [98, 111, 113]. Значно слабше вивчена роль ендогенного сірководню в адаптації рослин до високих температур. Ефекти підвищення вмісту сірководню в клітинах і органах зареєстровано за відносно тривалої (години, дні) дії помірно високих температур на рослини полуниці [52] і тютюну [47]. Водночас не дослідженою залишається можлива роль H₂S як посередника у підвищенні теплостійкості рослин внаслідок короточасного впливу ушкоджувальних температур. Феномен зростання теплостійкості рослинних об'єктів після хвилиних і навіть секундних впливів на них високих температур описано досить давно [28]. Його наявність дозволяє використовувати ефекти розвитку теплостійкості рослин після короточасного нагріву як зручну модель для вивчення участі сигнальних посередників у формуванні терморезистентності [82, 92].

Мета досліджень, результати яких викладені у даному розділі, полягала у встановленні участі ендогенного сірководню у формуванні теплостійкості проростків пшениці під впливом короточасного прогріву і регуляції їх ферментативної антиоксидантної системи.

3.1. Об'єкт, умови і методи досліджень

Об'єктом дослідження служили етіоловані проростки м'якої пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.) сорту Досконала, вирощені при 20–22°C на воді, очищеній з використанням системи водопідготовки, що включає в себе фільтр механічного очищення, вугільний фільтр і напівпроникну зворотноосмотичну мембрану з розміром комірок 1 нм. Тридобові проростки відповідних варіантів досліду на 24 год переносили на розчини скавенжера сірководню гіпотаурину (300 мкМ) [80] або інгібітору L-цистеїндисульфгідрази пірвату натрію (300 мкМ) [83]. Концентрації цих сполук, які самі по собі незначно впливали на ріст проростків, їх теплостійкість, але при цьому помітно модифікували ефекти теплового загартування вибирали за результатами попередніх дослідів.

Після обробки досліджуваними сполуками проростки піддавали однохвилинному загартувальному прогріву у водяному ультратермостаті за температури 42,0±0,1°C [92]. Потім зразки відповідних варіантів витримували на розчинах гіпотаурину або пірвату натрію ще протягом 3 год і далі інкубували на очищеній воді. Проростки, які не обробляли гіпотаурином або пірватом натрію, весь час інкубували на воді.

Як було встановлено раніше максимальний розвиток теплостійкості внаслідок короточасного впливу високої температури відзначався через 24 год [92]. Зважаючи на це, теплостійкість проростків оцінювали через 24 год після впливу на них загартувальної температури. Для цього зразки піддавали потенційно летальному прогріву у водяному ультратермостаті за температурі 45,0±0,1°C протягом 10 хв. Через 3 доби після ушкоджувального прогріву визначали відносну кількість проростків, що вижили. Такими вважали проростки, що зберегли здатність до росту і не мали значних некрозів.

Для біохімічних аналізів використовували корені інтактних проростків, які чутливі до впливу гіпертермії та зручні для досліджень з використанням інгібіторного аналізу [92].

Вміст сірководню в коренях визначали за реакцією з 5,5'-дітіобіс-2-нітробензойною кислотою, як описано у роботі Li і співавт. [112] з незначними модифікаціями [83].

Для визначення активності антиоксидантних ферментів наважки коренів гомогенізували за температури 2–4°C в 0,15 М К/Na-фосфатному буфері (рН 7,6) з додаванням ЕДТА (0,1 мМ) та дитіотреїтолу (1 мМ) [82]. Для аналізу використовували супернатант після центрифугування гомогенату при 8000 g протягом 10 хвилин при 4°C. Активність цитозольної СОД (КФ 1.15.1.1) визначали при рН реакційної суміші 7,6, використовуючи метод, в основі якого здатність ферменту конкурувати з нітросинім тетразолієм за супероксидні аніони, що утворюються внаслідок аеробної взаємодії НАДН і феназинметосульфату. Активність каталази (КФ 1.11.1.6) аналізували при рН реакційної суміші 7,0 за кількістю пероксиду водню, розкладеного за одиницю часу. Активність гваяколпероксидази (КФ 1.11.1.7) визначали, використовуючи як донор водню гваякол, а як субстрат – пероксид водню. З допомогою К,Na-фосфатного буфера рН реакційної суміші доводили до 6,2.

Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), що реагують з 2-тіобарбітуровою кислотою (переважно малоновий діальдегід – МДА), визначали за методикою, описаною у роботі Fazlieva і співавт.[65]. Оптичну густину продуктів реакції вимірювали при довжинах хвиль 532 нм (максимум світлопоглинання МДА) та 600 нм (для поправки на неспецифічне світлопоглинання).

Досліди проводили у 4 разовому біологічному повторенні та кожен з них відтворювали незалежно 2–3 рази. На рисунках наведено середні величини та їх стандартні похибки. Крім окремо відзначених випадків обговорюються відмінності, вірогідні за *P*

3.2. Вплив загартувальної температури на вміст сірководню у коренях проростків пшениці та участь сірководню у підтриманні окиснювально-відновного балансу

Однохвилинний вплив на проростки загартувальної температури (42°C) спричинював зростання вмісту сірководню у тканинах коренів (рис. 2). Помітний ефект відзначався уже через 15 хв після прогріву, а через 1,5 год він був максимальним, після чого кількість H₂S в коренях знижувалася, через 24 год після прогріву цей показник не відрізнявся від контролю. Таким чином, зростання вмісту сірководню після загартувального прогріву проростків було транзиторним.

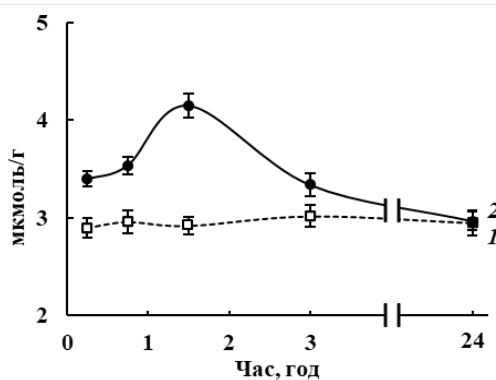


Рис. 2. Динаміка вмісту сірководню в коренях проростків пшениці після дії загартувальної температури. 1 – контроль; 2 – загартування (42°C, 1 хв).

За попередньої обробки скавенджером сірководню гіпотаурином вміст ендogenous H₂S знижувався, а спричинений загартовальним прогрівом ефект його підвищення не проявлявся (рис. 3). Обробка коренів піруватом натрію – інгібітором L-цистеїндесульфгідрази (ключового ферменту синтезу H₂S) – також спричиняла зниження вмісту сірководню в коренях і повністю усувала його зростання після дії загартовальної температури (рис. 3).

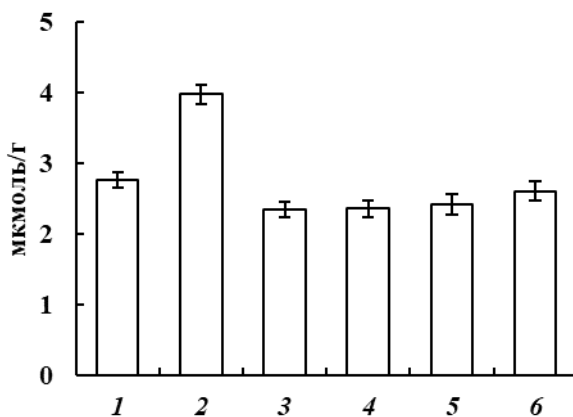


Рис. 3. Модифікація вмісту сірководню у коренях пшениці дією гіпотаурину і пірувату. 1 – контроль; 2 – загартування (42°C, 1 хв); 3 – гіпотаурин (300 мкМ); 4 – загартування (42°C, 1 хв) + гіпотаурин (300 мкМ); 5 – піруват натрію (300 мкМ); 6 – загартування (42°C, 1 хв) + піруват натрію (300 мкМ).

Примітка. Вміст сірководню визначали через 1,5 год після загартування проростків. Загальний час інкубації на розчинах гіпотаурину або пірувату натрію становив 27 год (24 год перед загартуванням і 3 год після нього).

Загартовальний прогрів спричиняє формування сигналу, що активує антиоксидантну та інші стрес-протекторні системи, завдяки чому відбувається розвиток теплостійкості рослинних об'єктів [82, 92]. Екзогенний сірководень також викликає посилення експресії генів і підвищення активності антиоксидантних ферментів у рослин [29, 52, 98]. Зважаючи на це, досліджували динаміку активності ключових антиоксидантних ферментів у коренях проростків пшениці і вплив антагоністів сірководню на стан антиоксидантної системи.

Уже через 1,5 год після загартовального прогріву відзначалося підвищення активності СОД у коренях (таблиця). Ще більш помітно активність СОД відрізнялася від контролю через 24 год після дії загартування. Активність каталази через 1,5 і 3 год після одноквилинного загартування не відрізнялася від контролю, проте, через 24 год помітно перевищувала його (таблиця). Активність гваялпероксидази у перші години після загартовального прогріву також змінювалася слабо, але істотно зростала через добу після короткочасної дії високої температури (табл. 1).

Таблиця 1.

Динаміка активності антиоксидантних ферментів у коренях проростків пшениці після 1-хвилинного загартування при 42°C

Варіант	Час після загартування, год		
	1,5	3	24

Контроль	17,3 ± 0,51	16,9 ± 0,33	17,6 ± 0,40
Загартування (42°C, 1 хв)	21,6 ± 0,38	22,6 ± 0,61	24,4 ± 0,33
Каталаза, мкмоль H ₂ O ₂			
Контроль	699 ± 13	693 ± 14	707 ± 17
Загартування (42°C, 1 хв)	712 ± 16	702 ± 12	909 ± 14
Гваяколпероксидаза			
Контроль	2,26 ± 0,06	2,31 ± 0,09	2,40 ± 0,08
Загартування (42°C, 1 хв)	2,37 ± 0,06	2,59 ± 0,07	3,09 ± 0,11

Обробка проростків скавенджером сірководню гіпотаурином спричиняла тенденцію до деякого зростання активності СОД у коренях (рис. 4, а), що може бути зумовлено побічними ефектами цієї сполуки. При цьому за умов загартування гіпотаурин не впливав на величину активності ферменту. Інгібітор L-цистеїндесульфгідрази піруват натрію сам по собі не впливав на активність СОД і не перешкоджав її зростанню, спричиненому загартуванням (рис. 4, а).

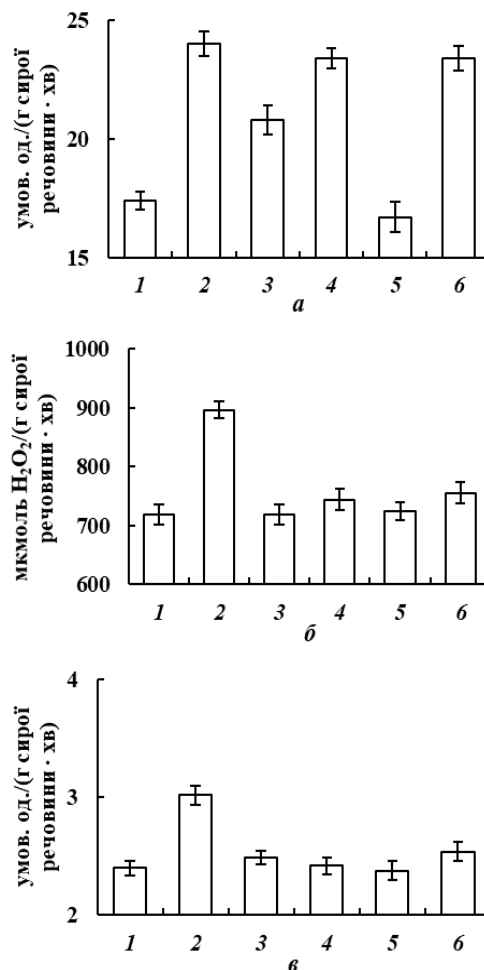


Рис. 4. Вплив загартування та антагоністів сірководню на активність СОД (а), каталази (б) і гваяколпероксидази (в). 1 – контроль; 2 – загартування (42°C, 1 хв); 3 – гіпотаурин (300 мкМ); 4 – загартування (42°C, 1 хв) + гіпотаурин (300 мкМ); 5 – піруват натрію (300 мкМ); 6 – загартування (42°C, 1 хв) + піруват натрію (300 мкМ).

Примітка. Активність ферментів визначали через 24 год після загартування проростків. Загальний час інкубації на розчинах гіпотаурину або пірувату натрію становив 27 год (24 год перед загартуванням і 3 год після нього).

Інакше діяли антагоністи сірководню на активність двох інших антиоксидантних ферментів – каталази і гваяколпероксидази – за умов загартування проростків. Обробка коренів гіпотаурином і піруватом натрію істотно не впливала на активність каталази (рис. 4, б). При цьому як скавенджер H₂S, так і інгібітор його синтезу майже повністю усували ефект підвищення активності каталази, який спостерігався після дії загартувального прогріву. Так само як і у випадку з каталазою, гіпотаурин і піруват натрію самі по собі не впливали на активність гваяколпероксидази (рис. 4, в). Водночас ці антагоністи сірководню повністю нівелювали спричинюване загартувальним прогрівом підвищення активності цього ферменту.

Короткочасне теплове загартування зменшувало накопичення продуктів ПОЛ в тканинах коренів, спричинюване дією ушкоджувального прогріву (рис. 5, а). Обробка проростків гіпотаурином і піруватом натрію не впливала на інтенсивність ПОЛ у варіантах без загартування проростків. Водночас скавенджер сірководню гіпотаурин практично повністю усував ефект зменшення інтенсивності ПОЛ в коренях, спричинюваний дією загартування. Під впливом інгібітору L-цистеїндисульфгідрази відзначалося часткове усунення мембранопротекторного впливу теплового загартування на корені проростків (рис. 5, а).

Інтегральним показником теплостійкості проростків є їх виживаність після дії ушкоджувального прогріву. Попереднє загартування проростків значно підвищувало їх виживаність (рис. 5, б). Антагоністи сірководню гіпотаурин і піруват натрію самі по собі істотно не впливали на теплостійкість проростків пшениці, водночас вони помітно зменшували захисну дію попереднього теплового загартування, хоча й не усували її повністю (рис. 5, б).

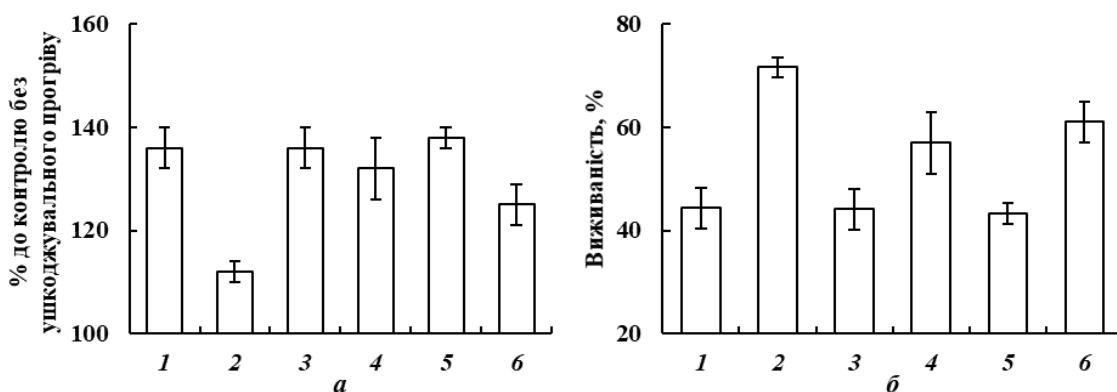


Рис. 5. Вміст МДА у коренях проростків (а) та їх виживаність після ушкоджувального прогріву (45°C, 10 хв). 1 – контроль; 2 – загартування (42°C, 1 хв); 3 – гіпотаурин (300 мкМ); 4 – загартування (42°C, 1 хв) + гіпотаурин (300 мкМ); 5 – піруват натрію (300 мкМ); 6 – загартування (42°C, 1 хв) + піруват натрію (300 мкМ).

Примітка. Вміст МДА визначали через 24 год, а виживаність проростків через 72 год після ушкоджувального прогріву. Загальний час інкубації на розчинах гіпотаурину або пірувату натрію становив 27 год (24 год перед загартуванням і 3 год після нього).

Загалом отримані результати свідчать про залучення сірководню у реалізацію впливу загартовувальної температури на теплостійкість проростків пшениці. На це вказує транзиторне зростання вмісту сірководню у тканинах коренів через певний час після дії на них загартовувальної температури (рис. 2). Такий ефект не виявлявся за попередньої їх інкубації на середовищі з додаванням інгібітору L-цистеїндесульфгідрази пірувату натрію (рис. 3), що свідчить про основну роль цього ферменту в синтезі H₂S за дії загартовувальної температури.

Одним з механізмів захисної дії загартовувального прогріву може бути активація антиоксидантної системи. Цілком ймовірно, що до формування сигналу, який спричиняє активацію антиоксидантної системи, причетний сірководень. На це вказує усунення спричинюваного тепловим загартуванням зростання активності каталази і гваяколпероксидази в присутності гіпотаурину або пірувату натрію (рис. 5). Водночас слід відзначити відсутність впливу гіпотаурину і пірувату натрію на активність СОД за умов загартування. Варто зауважити, що активність СОД в тканинах коренів під впливом теплового загартування зростала у часі раніше, ніж активність інших антиоксидантних ферментів – каталази і гваяколпероксидази (табл. 1). Як було показано раніше, СОД, як фермент, що перетворює супероксидний аніон-радикал на пероксид водню (стабільну АФК, що виконує сигнальні функції), ймовірно, причетна до формування редокс-сигналів, які забезпечують активацію інших антиоксидантних ферментів [92]. Не виключено, що активність СОД, як ферменту, що посідає особливе місце в системі редокс-регуляції і редокс-сигналіngu клітин, може змінюватися без участі певних компонентів сигнальної мережі, зокрема, H₂S.

Отримані нами результати дозволяють говорити лише про участь сірководню в регуляції активності каталази і гваяколпероксидази (неспецифічної фенолпероксидази). Механізми такої регуляції можуть бути з'ясовані в спеціальних дослідженнях. Одним з механізмів впливу сірководню на активність антиоксидантних ферментів може бути безпосереднє персульфидування їх тиольних груп, тобто перетворення останніх на персульфідні групи (–SSH) [66]. Наприклад, встановлено, що персульфидування Cys32 в молекулі аскорбатпероксидази (APX1) підвищує її активність [151]. Щоправда, є відомості про зниження активності каталази внаслідок персульфидування [53]. Ймовірно, за умов *in vivo* механізми впливу сірководню на редокс-гомеостаз можуть бути дуже складними. Зокрема, відомо, що вплив H₂S на редокс-гомеостаз може бути пов'язаний зі зміною редокс-стану пероксиредоксинів, які у свою чергу є важливими учасниками клітинної редокс-регуляції [73].

Чимало ефектів сірководню, ймовірно, реалізується за рахунок його функціональної взаємодії з іншими посередниками, насамперед, АФК. Напевно H₂S як посередник у сильних ланцюгах може бути розташований як до, так і після пероксиду водню. Так, пероксид водню може індукувати синтез сірководню у клітинах рослин. Обробка насіння ятрофи (*Jatropha curcas* L.) пероксидом водню викликала підвищення в проростках активності L-цистеїндесульфгідрази та вмісту сірководню [110]. У рослин арабідопсису також відбувалося посилення експресії L/D-цистеїндесульфгідраз у відповідь на обробку пероксидом водню [148]. Водночас інгібіторними методами показано, що екзогенний сірководень у клітинах колеоптилів пшениці викликає залежне від НАДФН-

оксидази посилення генерації клітинною поверхнею супероксидного аніон-радикала та подальше його перетворення на пероксид водню за допомогою супероксиддисмутази [100]. Іншими словами, сірководень може спричиняти формування АФК-сигналів.

Сірководень також функціонально пов'язаний з оксидом азоту як сигнальним посередником. Взаємодія між H₂S і NO може бути зумовлена наявністю у них спільних сайтів зв'язування з білковими мішенями, насамперед тіолових груп. Сірководень здатний змінювати стан цих груп шляхом персульфидування, а оксид азоту – шляхом S-нітрузування [77, 153]. Також можливе транс-персульфидування або транс-нітрузування тіолових груп [54]. Ще одним механізмом взаємодії між сірководнем і оксидом азоту є їх вплив на синтез одне одного. У ряді робіт повідомляється про те, що фізіологічні ефекти сірководню можуть бути опосередковані оксидом азоту та навпаки [81]. Варто зауважити, що на модельному об'єкті, який використовувався нами у даній роботі – коренях інтактних проростків, що піддавалися короткочасному тепловому загартуванню, встановлено, що розвитку теплостійкості передують ефекти функціональної взаємодії АФК і оксиду азоту [82]. Напевно поряд з пероксидом водню і NO компонентом сигнальних ланцюгів, задіяних у передачі сигналу гіпертермії в генетичний апарат, а також в безпосередній посттрансляційній модифікації певних білків, є сірководень. Проте, клітинні механізми його участі у формуванні індукованої теплостійкості рослин ще належить з'ясувати.

Отже, отримані результати дозволяють констатувати участь ендогенного сірководню у формуванні теплостійкості проростків пшениці після короткочасного впливу на них загартувальної температури. Однією із складових такого впливу є модифікація з участю H₂S активності антиоксидантних ферментів, задіяних у захисті клітин коренів від окиснювальних ушкоджень, спричинюваних дією високої температури. При цьому однак варто зауважити, що ймовірно окремі процеси адаптації проростків до гіпертермії можуть відбуватися і без участі сірководню, оскільки спричинюваний загартуванням розвиток теплостійкості і резистентності до окиснювальних пошкоджень хоча й істотно пригнічувався, але не усувався повністю антагоністами сірководню (рис. 5).

4. АНТИОКСИДАНТНА СИСТЕМА ПРОРОСТКІВ ПШЕНИЦІ ЗА ДІЇ МОНООКСИДУ ВУГЛЕЦЮ ЗА УМОВ ТЕПЛОГО СТРЕСУ

Монооксид вуглецю (CO) є одним із газотрансмітерів тваринних і рослинних клітин [162]. CO як сигнальна молекула взаємодіє з іншими посередниками та фітогормонами і таким чином бере участь в регуляції ростових процесів та адаптивних реакцій рослин [162]. У рослинних клітинах, як і в тваринних, монооксид вуглецю утворюється переважно за допомогою гемоксигенази, яка в присутності НАДФН/ферредоксинредуктази, ферредоксину або аскорбату перетворює молекулу гема на білівердин IX α з вивільненням іонів Fe²⁺ та CO [146]. Серед чотирьох виявлених у рослин генів гемоксигеназ найбільш інтенсивно експресується *HO1*. Саме експресія гена гемоксигенази-1 зазвичай посилюється в стресових умовах, зокрема, при зневодненні [120], дії солей [160] та високих температур [50].

Для досліджень фізіологічних ефектів CO у рослинних і тваринних клітинах зазвичай використовують його донори, які є штучними субстратами для гемоксигенази, зокрема, гематин [114] та гемін [48]. У ряді робіт показано підвищення стійкості рослин до осмотичного [120], сольового [117] стресів, іонів важких металів [125] під впливом газоподібного монооксиду вуглецю та його донорів. Проте роль CO в адаптації рослин до стресових температур досліджена дуже слабо. Є відомості про підвищення виживаності культури клітин тютюну за дії гематину [114] та підвищення ендogenous вмісту CO в умовах гіпертермії [50]. Водночас дані про вплив донорів монооксиду вуглецю на теплостійкість інтактних рослин відсутні. Відкритим залишається і питання про участь інших молекул-посередників у реалізації стрес-протекторної дії CO на рослинні об'єкти.

Було досліджено феноменологію впливу геміну, як донора монооксиду азоту, на теплостійкість проростків пшениці, стан ферментативної антиоксидантної системи та участь інших сигнальних посередників (АФК, іонів кальцію, NO) у реалізації стрес-протекторного впливу екзогенного CO. При цьому для оцінки змін вмісту NO, АФК і редокс-гомеостазу використовували корені інтактних проростків пшениці, які є зручною моделлю для дослідження «швидких» відповідей на екзогенні впливи [92, 126]. Зокрема, ця модель широко використовується для дослідження процесів, пов'язаних з ефектами позаклітинних форм пероксидази, утворенням супероксидного аніон-радикала, оскільки дозволяє визначати ці показники методами неруйнівного контролю [126].

4.1. Матеріал, умови і методи досліджень

Насіння пшениці сорту Досконала генерації 2018-2019 рр. було надано для експериментів співробітниками Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України (оригіатор сорту). Зернівки знезаражували 6% H₂O₂ протягом 30 хв, потім промивали дистильованою водою і пророщували у темряві за температури 20°C впродовж чотирьох днів на водопровідній воді, очищеній за допомогою системи водопідготовки, що включає в себе фільтр механічного очищення, вугільний фільтр і напівпроникну зворотньоосмотичну мембрану з розміром комірки 1 нм.

Чотиридобові етіоловані проростки використовували для дослідження впливу донорів газотрансмітерів та стресових

фітогормонів на теплостійкість і функціонування стрес-протекторних систем. Як донор СО використовували гемін у кінцевих концентраціях діапазону 0,05-50 мкМ.

Проростки піддавали ушкоджуючому прогріву у водяному ультратермостаті за температури 45°C протягом 10 хв [92]. Далі їх переносили на очищену водопровідну воду і витримували протягом трьох діб за температури 20–22°C та освітлення 6000 лк для оцінки відносної кількості проростків, що вижили. До таких відносили проростки, що не мали виражених ознак некрозу на листках і зберігали здатність до росту. Температуру і час прогріву проростків вибирали у попередніх дослідах таким чином, щоб у контрольному варіанті виживаність становила близько 50%.

Стан мембран клітин коренів оцінювали через 24 год після ушкоджуючого прогріву по виходу речовин, що поглинають в ультрафіолетовій (УФ-В) частині спектру (переважно вільних нуклеотидів) [123]. Корені інтактних проростків занурювали у стаканчики з дистильованою водою на 1 год, після чого відокремлювали від проростків і зважували. Оптичну густину інкубаційного розчину визначали при А252 і А264. Вихід речовин оцінювали в умовних одиницях як співвідношення усередненої величини, виміряної при вказаних довжинах хвилі, до маси коренів і виражали у відсотках до величин, розрахованих для коренів проростків, що не зазнали ушкоджуючого прогріву.

Для визначення продуктів ПОЛ, що реагують з 2-тіобарбітуровою кислотою (переважно МДА), корені проростків пшениці або листки арабідопсису гомогенізували в реакційному середовищі, що містило 0,25%-ву 2-тіобарбітурову кислоту в 10%-й ТХО, гомогенат витримували на киплячій бані протягом 30 хв. Після цього проби різко охолоджували і центрифугували 15 хв при 10000 g. Оптичну густину супернатанту визначали при 532 нм (максимум світлопоглинання МДА) і 600 нм (для поправки на неспецифічне світлопоглинання) [65]. Показник виражали у нмоль/г сирової маси.

При визначенні активності антиоксидантних ферментів – супероксиддисмутази (СОД, КФ 1.15.1.1), каталази (КФ 1.11.16) і гваяколпероксидази (КФ 1.11.1.7) – наважки коренів пшениці або листків арабідопсису гомогенізували на холоді в 0,15 М К,Na-фосфатному буфері (рН 7,8), що містив ЕДТА (0,1 мМ) і дітіотрейтол (1мМ) [82]. Для аналізу використовували супернатант після центрифугування гомогенату при 8000 g протягом 10 хв при 4°C.

Активність цитозольної СОД визначали при рН 7,8, використовуючи метод, що базується на здатності ферменту конкурувати з нітросинім тетразолієм за супероксидні аніони, які утворюються за аеробної взаємодії НАД·Н і феназинметосульфату. Оптичну густину вимірювали за довжини хвилі 540 нм й виражали в умовних одиницях/(г сирової маси хв). Активність каталази аналізували при рН 7,0 за кількістю пероксиду водню, розкладеного за одиницю часу і виражали в ммоль Н₂О₂/(г сирової маси хв). Активність розчинної внутрішньоклітинної пероксидази визначали, використовуючи як донора водню гваякол, а як субстрат – пероксид водню. Виразали показник в мкмоль гваяколу/(г сирової маси хв).

Всі досліди проводились в 4-5 кратному біологічному повторенні і кожен незалежно відтворювали 3-4 рази. Наважки рослинного матеріалу відбирали щонайменше з 6-7 рослин. Для оцінки виживаності рослин після дії теплового стресу, у кожному

варіанті досліджу було не менше 30 зразків рослинного матеріалу. У експериментах з визначення біохімічних показників використовували для кожного біологічного повторення використовували середню пробу не менш ніж з шести рослин.

Статистична обробка даних, отриманих під час експериментів, проводили за допомогою програмного середовища R (остання версія 4.0.3 від 10.10.2020) з використанням базових функцій (пакет *stats*) та спеціального статистичного пакету *psych* ('psych', 2020). Візуалізація результатів експериментів проведена з використанням *ggplot2* (пакет для створення графіки в R) або графічного функціоналу *MS Excel 2016*.

Для оцінки результатів експериментів використовувався ряд статистичних критеріїв: тест Шапіро-Вілка для перевірки нормальності розподілу, тест Бартлетта для перевірки гомогенності дисперсій, t-критерій Ст'юдента, непараметричний критерій Уїлкоксона, F-критерій Фішера а також дисперсійний аналіз. На рисунках і в таблицях наведені середні значення та їх стандартні похибки. Крім спеціально відзначених випадків, обговорюються результати, достовірні при *P*

P

4.2. Феноменологія впливу донора CO геміну на теплостійкість проростків пшениці

Обробка геміном підвищувала виживаність проростків пшениці після ушкоджуючого прогріву (рис. 6, а). Тенденція до підвищення теплостійкості проростків відзначалася за впливу мінімальної досліджуваної концентрації – 0,05 мкМ. Вірогідний ефект спостерігався при використанні донора CO в концентраціях діапазону 0,5-10 мкМ. Вища концентрація геміну (50 мкМ) захисної дії не чинила. У подальших експериментах гемін використовували в концентрації 5 мкМ, яка була найбільш ефективною.

Обробка проростків 10 мкМ гемоглобіном не впливала на їх теплостійкість (рис. 6, б). При цьому гемоглобін, який має здатність зв'язувати CO, в комбінації з геміном повністю усував стрес-протекторну дію останнього. Це свідчить про те, що ефекти геміну спричинені його дією саме як донора CO і не пов'язані з можливим впливом інших продуктів реакції, що утворюються при перетворенні геміну гемоксигеназою-1 (іони Fe^{2+} та білівердин) [146]. Для додаткового підтвердження зв'язку ефектів геміну саме з утворенням CO порівнювали його вплив з дією $FeSO_4$.

Протягом першої доби після ушкоджуючого прогріву проростки залишалися живими, їх пошкодження не візуалізувалися. Однак вплив стресора більш ніж на 80% посилював вихід з коренів речовин, що поглинають в УФ-В області. Обробка проростків геміном зменшувала цей ефект майже на 30%, що свідчить про мембрано-протекторний вплив донору CO.

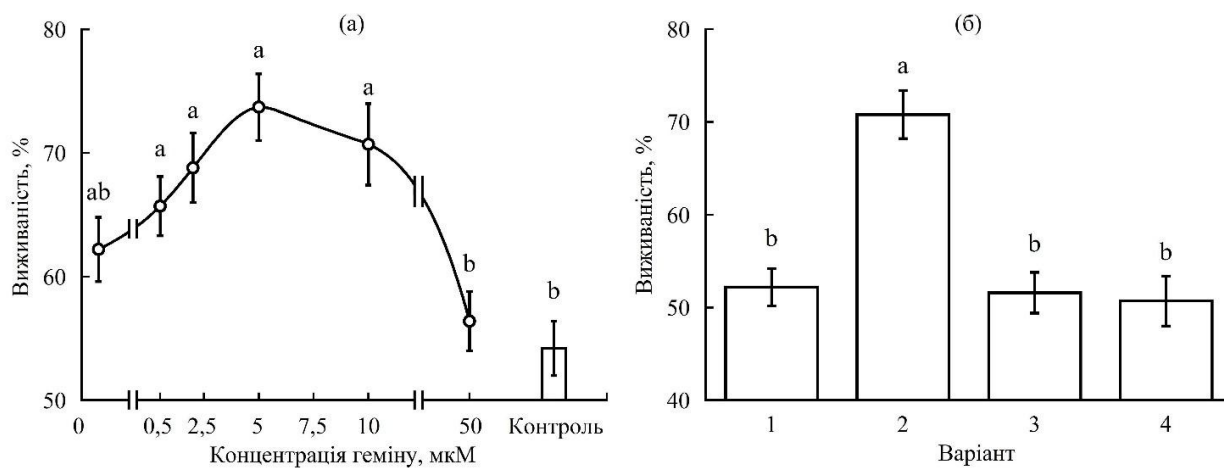


Рис. 6. Вплив геміну на виживаність (%): а - концентраційна залежність протекторного ефекту геміну; б - нівелювання ефекту геміну скавенджером СО гемоглобіном: 1 - контроль; 2 - гемін (5 мкМ); 3 - гемоглобін (10 мкМ); 4 - гемін (5 мкМ) + гемоглобін (10 мкМ).

Через добу після ушкоджуючого прогріву вміст продукту ПОЛ МДА в коренях проростків у контрольному варіанті збільшувався більш ніж на 40%. Обробка проростків геміном значно зменшувала окислювальні пошкодження, про що свідчить лише невелике підвищення вмісту МДА в коренях проростків відповідного варіанта.

Отримані результати свідчать про позитивний вплив обробки проростків пшениці геміном на їх теплостійкість. Цей ефект проявлявся в збереженні цілісності мембран, яка визначається за виходом речовин, що поглинають в ультрафіолетовій області спектра, зменшенні окиснювальних пошкоджень (відсутності значного накопичення МДА) порівняно з контрольним варіантом та в підвищенні інтегрального показника – виживаності проростків через 3 доби після ушкоджуючого прогріву (рис. 6). Є підстави стверджувати, що стрес-протекторні ефекти геміну в умовах наших експериментів пов'язані з його дією саме як донора СО. Як зазначалося, захисний вплив на проростки при гіпертермії повністю усувався скавенджером монооксиду вуглецю гемоглобіном. Крім того, редокс-активний продукт реакції розкладання геміну - Fe^{2+} , як показали спеціальні досліді з використанням $FeSO_4$ у концентрації 5 мкМ (еквімолярній концентрації геміну), не впливав на стан мембран клітин коренів та виживаність проростків після прогріву (див. п. 3.2. і 3.3). Слід зазначити, що солі Fe^{2+} використовуються в експериментах як агенти окиснювального стресу. Однак, як було показано раніше, при обробці проростків пшениці $FeSO_4$ викликав помітний прояв ефекту окиснювального стресу у концентрації 5 мМ [165], тобто на три порядки вищій від тієї, що використовувалася в наших експериментах.

4.3. Вплив донора СО на стан ферментативної антиоксидантної системи

Ефекти підвищення під впливом екзогенного монооксиду вуглецю активності антиоксидантних ферментів у рослин різних таксономічних груп, особливо у стресових умовах, виявлено у ряді досліджень [38, 117, 169]. Слід відзначити, що в контексті стійкості рослин до гіпертермії, вплив донорів монооксиду вуглецю на стан ферментативної антиоксидантної системи до цього часу спеціально не досліджувався. Тому було доцільним дослідити вплив геміну на активність ключових антиоксидантних ферментів в звичайних умовах і після ушкоджуючого прогріву проростків.

Обробка проростків геміном викликала підвищення активності СОД у коренях, достовірний ефект відзначався через 24 годин після початку впливу донора СО (табл. 3.1). Після прогріву у контрольному варіанті активність ферменту істотно не змінювалася, а у варіанті з обробкою геміном знижувалася і була на рівні відповідних значень контролю.

Тенденція до підвищення активності каталази під впливом донора СО відзначалася вже через 4 години після початку обробки, а до 24 год збільшення активності ферменту було більш істотним (табл. 2). Ушкоджуючий прогрів викликав зниження активності каталази як в контролі, так і при обробці донором монооксиду вуглецю. Однак, у варіанті з СО абсолютна величина активності ферменту була вищою, ніж у відповідному контролі.

**Активність антиоксидантних ферментів у коренях
проростків пшениці при обробці геміном та дії теплового стресу**

Варіант	Фаза експерименту			
	Через 1 год після початку обробки геміном	Через 4 год після початку обробки геміном	Через 24 год після початку обробки геміном	Через 24 год після ушкоджуючого прогріву
СОД, ум. од./г сирої речовини хв)				
Контроль	17,9 ± 0,30	18,6 ± 0,32	18,9 ± 0,33	19,2 ± 0,52
Гемін (5 мкМ)	18,9 ± 0,37	20,3 ± 0,41	24,4 ± 0,46	19,6 ± 0,60
Каталаза, ммоль H ₂ O ₂ /г сирої речовини хв)				
Контроль	0,693 ± 0,012	0,682 ± 0,014	0,667 ± 0,016	0,492 ± 0,010
Гемін (5 мкМ)	0,756 ± 0,014	0,779 ± 0,017	0,814 ± 0,024	0,566 ± 0,014
Гваяколпероксидаза, ум. од./г сирої речовини хв)				
Контроль	1,92 ± 0,06	2,01 ± 0,05	2,06 ± 0,08	2,34 ± 0,06
Гемін (5 мкМ)	2,12 ± 0,05	2,23 ± 0,06	2,72 ± 0,04	2,83 ± 0,06

Активність внутрішньоклітинної розчинної пероксидази під впливом обробки коренів геміном достовірно підвищувалася через 24 год (табл. 2). Ушкоджуючий прогрів викликав невелике збільшення активності розчинної пероксидази в контролі. У варіанті з донором СО активність ферменту змінювалася несуттєво. При цьому абсолютні величини активності пероксидази у випадку з обробкою проростків геміном були достовірно вищі, ніж у відповідному контролі.

Таким чином, обробка проростків пшениці донором монооксиду вуглецю геміном індукувала розвиток їх теплостійкості.

Стрес-протекторна дія геміну як донора монооксиду вуглецю була специфічною. Вона усувалася скавенджером СО гемоглобіном. Крім того, інший редокс-активний продукт розкладання геміну – іони заліза (II) – в еквівалентних концентраціях не впливали на теплостійкість проростків пшениці.

Однією з причин стрес-протекторної дії донора СО на проростки пшениці, ймовірно, є активація ферментативної антиоксидантної системи.

5. ВПЛИВ ФОЛІАРНОЇ ОБРОБКИ РОСЛИН ПШЕНИЦІ ПУТРЕСЦИНОМ І СПЕРМІНОМ НА ФУНКЦІОНУВАННЯ ЇХ ПРОТЕКТОРНИХ СИСТЕМ ЗА УМОВ ПОСУХИ

Нині відомо, що поліаміни є мультифункціональними сполуками і беруть участь у багатьох фізіологічних процесах різних груп організмів, у тому числі вищих рослин. Зокрема, підтверджена їх роль в таких ключових процесах, як поділ клітин, ризогенез, ембріогенез, запилення, ініціація цвітіння, утворення зав'язі, дозрівання плодів [11, 13, 76]. Особливе значення поліаміни мають для адаптації рослин до дії несприятливих чинників. Частково протекторна роль поліамінів пов'язана з їх властивостями органічних катіонів [43, 84]. Припускають, що зв'язування катіонів поліамінів з від'ємно зарядженими білковими молекулами або нуклеїновими кислотами не тільки захищає їх від розпаду за рахунок пригнічення активності ДНКаз, РНКаз і протеаз [105], а й спричиняє формування більш ефективної конформації макромолекул [13].

Водночас поліаміни через складні механізми істотно впливають на редокс-гомеостаз рослинних клітин і здатні зменшувати розвиток вторинного окиснювального стресу, спричинюваного дією стресових чинників. Отримані дані як про прямий антиоксидантний вплив поліамінів, зумовлений їх здатністю зв'язувати вільні радикали [164], так і про опосередковані ефекти, пов'язані з формуванням сигналів, що індукують антиоксидантну систему [9]. Одним із механізмів формування таких сигналів може бути підвищення вмісту пероксиду водню в реакціях окиснення поліамінів ді- та поліаміноксидазами [136]. Також отримано відомості про здатність екзогенних поліамінів підвищувати активність НАДФН-оксидази, що так само призводить до збільшення вмісту активних форм кисню (АФК) [33, 97]. Крім АФК за дії поліамінів у рослинних клітинах може посилюватися синтез інших редокс-активних молекул, зокрема, оксиду азоту (NO). Наприклад, показано швидке накопичення NO рослинами арабідопсису після обробки спермідіном і сперміном [159]. Путресцин індукував генерацію NO у сої [166]. Формування під впливом поліамінів сигналу, що включає в себе АФК і оксид азоту, може призводити до посилення експресії генів антиоксидантних ферментів та підвищення активності відповідних ензимів [136].

Крім впливу на антиоксидантну систему, поліаміни здатні посилювати накопичення низькомолекулярних сполук, які вважаються сумісними осмолітами, зокрема, проліну [68, 129] та цукрів [140]. Також встановлено, що поліаміни можуть індукувати сигнал, що спричиняє закривання продихів у рослин [149], та виступати у ролі посередників у реалізації продихових ефектів абсцизової кислоти [32].

Відомо, що внаслідок глобальних кліматичних змін у світі відбувається збільшення частоти і тривалості посух [59]. Одним із наслідків впливу посухи на рослини є посилення утворення АФК в хлоропластах і мітохондріях [8]. Зважаючи на це, екзогенні впливи, що індукують антиоксидантну систему, розглядаються як прийоми підвищення посухостійкості рослин. Загальновідомо також, що чинники, які посилюють накопичення осмолітів, теж можуть підвищувати посухостійкість рослин [128]. Зрештою, важливим механізмом посухостійкості рослин є регуляція функціонування продихового апарату [12]. До всіх вказаних процесів можуть бути причетні поліаміни, що дає підстави очікувати прояв їх стрес-протекторного впливу на рослини за умов посухи.

На прикладі рослин різних таксономічних груп встановлені ефекти підвищення ендogenous вмісту поліамінів у відповідь на дію стресорів, що спричиняють зневоднення клітин, зокрема, посуху та засолення [26, 69, 138, 144]. Накопичено значний обсяг даних щодо впливу екзогенних поліамінів на стійкість рослин до зневоднення. Так, показано, що додавання путресцину в середовище культивування клітин картоплі в присутності ПЕГ 8000 підвищувало їх виживаність [145]. Обробка конюшини сперміном перед впливом ПЕГ 6000 сприяла збереженню пулу хлорофілів [49] та росту рослин [109]. На проростках пшениці показано, що обробка 1 мМ путресцином і сперміном зменшувала інгібування росту, спричинюване дією 12% ПЕГ 6000 [7]. При цьому обидва поліаміни попереджали спричинювані осмотичним стресом ефекти зниження активності супероксиддисмутази і розвитку окиснювального стресу в проростках. Водночас путресцин сприяв підвищенню вмісту проліну, а спермін – кількості флавоноїдів, що поглинають в області УФ-В.

Відомо, що ефекти посухи на модельних системах та інтактних рослинах можуть істотно відрізнятися, оскільки реакція рослинного організму на брак вологи реалізується в результаті взаємодії різних органів і систем [59]. Проте більшість фізіологічних ефектів поліамінів досліджувалася переважно в модельних експериментах з використанням ПЕГ, частіше на етіологованих проростках. Вплив поліамінів на посухостійкість інтактних рослин в умовах, наближених до природних, вивчався лише у поодиноких роботах. Так, показано, що обприскування рослин пшениці 0,1 мМ путресцином підвищувало інтенсивність фотосинтезу за умов посухи, а також знижувало вміст проліну і підвищувало вміст цукрів у листках [75]. Проте вміст осмолітів у даній роботі розраховувався на сиру речовину, що не дозволяє однозначно тлумачити результати для об'єкта, що зазнавав зневоднення. На рослинах рису за умов посухи в ґрунтовій культурі показано посилення асиміляції CO₂ та підвищення вмісту проліну і фенольних антиоксидантів під впливом путресцину і (більшою мірою) сперміну [64]. Передпосівна обробка насіння сої 0,2 мМ сперміном підвищувала вміст фотосинтетичних пігментів, кількість цукрів, антоціанів і фенольних сполук у листках за умов природної посухи [58]. Проте ці результати отримані у нефакторостаних польових умовах.

У зв'язку з викладеним, метою роботи було дослідження впливу фоліарної обробки рослин пшениці путресцином і сперміном на стійкість до посухи в умовах лабораторної ґрунтової культури. У роботі оцінювали такі інтегральні параметри, як інтенсивність росту рослин, водний дефіцит, вміст фотосинтетичних пігментів, а також рівень окиснювальних пошкоджень та вміст низькомолекулярних протекторів – проліну, цукрів і флавоноїдних сполук у листках.

5.1. Матеріали і методи

Для досліджень використовували рослини озимої м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.) сорту Досконала, які вирощували в пластикових контейнерах (ґрунт чорнозем типовий важкосуглинистий). Вологість субстрату – 70% від ПВ, освітлення – 7 клк, фотоперіод – 15 год, температура 25/20° С (день/ніч). Перед створенням умов посухи рослини у віці 7 діб обприскували розчинами путресцину або сперміну в концентраціях 0,25, 1 і 5 мМ, контроль – обприскування дистильованою водою.

Посуху створювали протягом чотирьох діб, починаючи з 8-го дня вирощування рослин, зменшенням норми поливу з поступовим зниженням вологості ґрунту до 25% від повної вологоємності (ПВ). У контролі вологість ґрунту підтримували на рівні 70% від ПВ.

Через 4 доби посухи у перших листках визначали вміст малонового діальдегіду, фотосинтетичних пігментів, антоціанів, флавоноїдів, що поглинають в області УФ-В, проліну і цукрів. Також оцінювали величину водного дефіциту і ростові показники перед початком посухи і наприкінці експерименту.

Інгібування росту, спричинюване посухою, розраховували за формулою:

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

де I – інгібування росту (%); C1 і C2, E1 і E2 – відповідно, початкові і кінцеві величини довжини надземної частини рослин у контрольних (з нормальним поливом) і дослідних (посуха) варіантах.

Водний дефіцит оцінювали за насиченням відокремлених від рослин листків водою і виражали у відсотках від загального вмісту води у стані повного насичення [1].

Для визначення продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), що реагують з 2-тіобарбітуровою кислотою (переважно малонової діальдегід – МДА), рослинний матеріал гомогенізували в реакційному середовищі, що містило 0,25% 2-тіобарбітурову кислоту в 10% ТХО, гомогенат поміщали в киплячу водяну баню на 30 хв. Після цього проби різко охолоджували і центрифугували 15 хв при 10000 g. Оптичну густину супернатанту визначали при довжинах хвиль 532 нм (максимум світлопоглинання МДА) і 600 нм (для поправки на неспецифічне світлопоглинання). Вміст МДА виражали у відсотках до вмісту у листках контрольних рослин (без посухи та обробки поліамінами).

Фотосинтетичні пігменти екстрагували з листків етанолом і визначали їх вміст спектрофотометричним методом [22]. Кількість пігментів виражали в мг/г сухої речовини листків. Масу сухої речовини листків визначали шляхом висушування за температури (103 ± 1°C) до сталої ваги.

Вміст проліну в листках визначали з використанням нінгідринного реактиву, як описано раніше [40] і виражали в мкмоль/г сухої маси. Сумарний вміст цукрів в рослинному матеріалі визначали з використанням антронового реактиву [170] і виражали в мг/г сухої речовини.

Для визначення вмісту флавоноїдів, що мають максимумом поглинання в УФ-В області, і антоціанів наважки листків гомогенізували в 1% -ому розчині HCl в метанолі [133]. Після центрифугування гомогенату протягом 15 хв при 8000g визначали оптичну густину супернатанту при 300, 530 і 657 нм [133, 137]. При розрахунку вмісту антоціанів враховували величину неспецифічного поглинання при 657 нм. Вміст флавоноїдів і антоціанів виражали в умовних одиницях як величини A300/г сухої маси і (A530 – 0,25 A657)/г сухої речовини, відповідно.

5.2. Вплив путресцину і сперміну на ріст рослин пшениці за умов посухи, стан пігментного апарату і вміст низькомолекулярних протекторів

Після 4-денного впливу посухи відзначалося істотне пригнічення росту надземної частини рослин (рис. 7, 8). Фоліарна обробка путресцином в усіх трьох досліджуваних концентраціях істотно зменшувала спричинюване посухою інгібування росту рослин. При цьому більш ефективними були концентрації 1 і 5 мМ. За обробки рослин сперміном також спостерігалось пом'якшення рiстiнгiбуючого впливу посухи, але його ефект був слабшим від дії путресцину (рис. 7, 8).

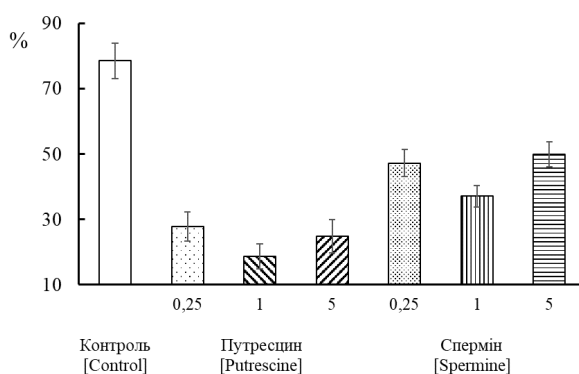


Рис. 7. Iнгiбування росту (%) надземної частини рослин пшениці за умов ґрунтової посухи і дії путресцину та сперміну.



Рис. 8. Стан рослин пшениці після 4-денної посухи. 1 – контроль; 2 – посуха; 3 – посуха + путресцин (Пут, 1 мМ); 4 – посуха + путресцин (Пут, 5 мМ); 5 – посуха + спермін (Спм, 1 мМ); 6 – посуха + спермін (Спм, 5 мМ).

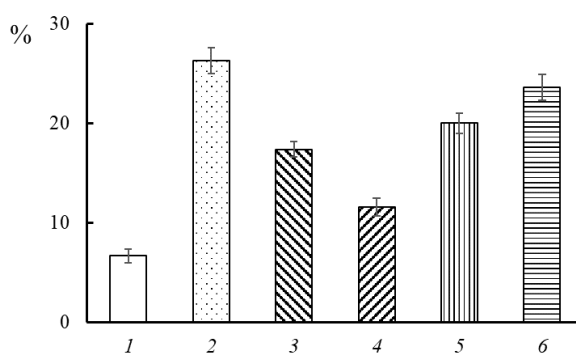


Рис. 9. Водний дефіцит (%) листків пшениці за умов ґрунтової посухи і дії путресцину (Пут) та сперміну (Спм). 1 – контроль; 2 – посуха; 3 – посуха + Пут (1 мМ); 4 – посуха + Пут (5 мМ); 5 – посуха + Спм (1 мМ); 6 – посуха + Спм (5 мМ).

Посуха спричинювала розвиток окиснювального стресу в клітинах листків, про що свідчить зростання вмісту МДА на третину від значень контролю (рис. 10). Обробка рослин путресцином перед посухою майже повністю усувала цей ефект. За дії сперміну також відзначалося помітне зменшення спричинюваної посухою зростання вмісту МДА у листках (рис. 10).

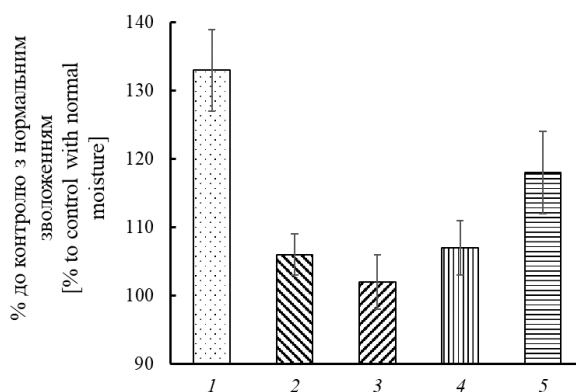


Рис. 10. Вміст МДА у листках пшениці (% до контролю з нормальним зволоженням) за умов ґрунтової посухи і дії путресцину (Пут) та сперміну (Спм). 1 – посуха; 2 – посуха + Пут (1 мМ); 3 – посуха + Пут (5 мМ); 4 – посуха + Спм (1 мМ); 5 – посуха + Спм (5 мМ).

Під впливом посухи спостерігалася істотне зменшення вмісту хлорофілів у листках (табл. 3). Обробка путресцином в обох концентраціях сприяла збереженню їх пулу після посухи. При цьому вона нівелювала порушення співвідношення між вмістом хлорофілів а і b, спричинене посухою. За дії 1 мМ сперміну так само відзначалося збереження близького до нормального сумарного вмісту хлорофілів та співвідношення а/б. Захисний ефект 5 мМ сперміну був менш істотним, але вірогідним при $P \leq 0,05$ (табл. 3).

Таблиця 3.

Вміст фотосинтетичних пігментів (мг/г сухої речовини) у листках рослин пшениці за умов ґрунтової посухи і дії путресцину

(Пут) та сперміну (Спм)

Варіант [Option]	Хл. a	Хл. b	Хл. a + b	Хл. a/b	Каротиноїди
Контроль	9,73 ± 0,29	4,29 ± 0,07	14,02 ± 0,36	2,27	2,23 ± 0,06
Посуха	5,30 ± 0,20	3,44 ± 0,11	8,64 ± 0,23	1,60	0,91 ± 0,03
Посуха + Пут (1 мМ)	7,15 ± 0,15	3,48 ± 0,08	10,63 ± 0,17	2,03	1,41 ± 0,09
Посуха + Пут (5 мМ)	7,79 ± 0,19	3,53 ± 0,11	11,32 ± 0,22	2,21	1,83 ± 0,11
Посуха + Спм (1 мМ)	7,29 ± 0,16	2,97 ± 0,09	10,26 ± 0,18	2,45	1,40 ± 0,08
Посуха + Спм (5 мМ)	6,67 ± 0,14	3,38 ± 0,12	10,05 ± 0,18	1,97	1,43 ± 0,13

За дії посухи спостерігалось зростання вмісту проліну у листках більш ніж в 1,6 раза (рис. 11, А). Обробка путресцином, особливо в концентрації 1 мМ, зменшувала прояв такого ефекту. Тенденцію до меншого накопичення проліну за умов посухи відзначали і у варіанті з обробкою 5 мМ сперміном.

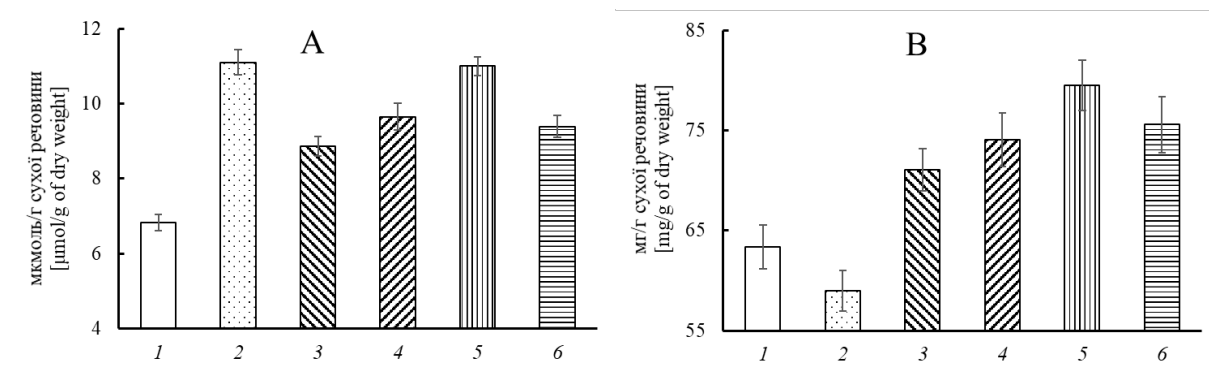


Рис. 11. Вміст проліну (А, мкмоль/г сухої речовини) і цукрів (В, мг/г сухої речовини) у листках рослин пшениці за умов ґрунтової посухи і дії путресцину (Пут) та сперміну (Спм). 1 – контроль; 2 – посуха; 3 – посуха + Пут (1 мМ); 4 – посуха + Пут (5 мМ); 5 – посуха + Спм (1 мМ); 6 – посуха + Спм (5 мМ).

Посуха спричиняла зменшення вмісту в листках антоціанів і флавоноїдів, що поглинають в області УФ-В (рис. 12). Обробка путресцином не впливала на вміст антоціанів, а спермін сприяв збереженню більшого їх пулу за умов посухи, хоча цей ефект був вірогідним лише за $P \leq 0,1$. Водночас обидва поліміни зменшували ефект падіння вмісту флавоноїдів, що поглинають в УФ-В (рис. 12, Б).

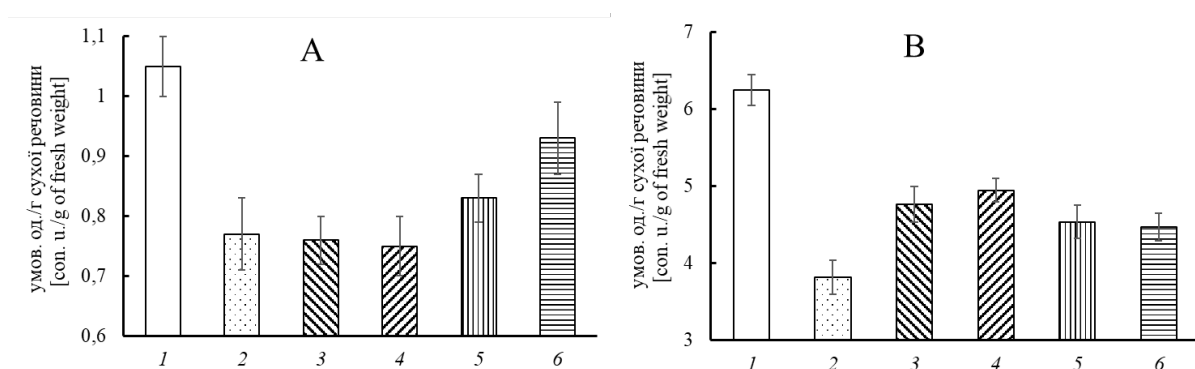


Рис. 12. Вміст антоціанів (А, умов. од./г сухої речовини) і флавоноїдів, що поглинають в УФ-В (В, умов. од./г сухої речовини), у листках рослин пшениці за умов ґрунтової посухи і дії путресцину (Пут) та сперміну (Спм). 1 – контроль; 2 – посуха; 3 – посуха + Пут (1 мМ); 4 – посуха + Пут (5 мМ); 5 – посуха + Спм (1 мМ); 6 – посуха + Спм (5 мМ).

Отже, обробка рослин поліамінами чинила виражений захисний вплив за умов посухи, ефекти путресцину в цілому були більш виразними порівняно з дією сперміну. Однією з істотних складових стрес-протекторної дії поліамінів напевно може бути їх участь у регуляції водного обміну. Так, у варіантах з обробкою путресцином відзначалося зменшення величини водного дефіциту в 1,5-2 рази (рис. 9). Ефект підвищення відносного вмісту води при посузі у рослин пшениці за обробки путресцином був показаний у роботі Gupta і співавт. [75]. Позитивний вплив поліамінів на вміст води у листках може бути зумовлений їх участю у регуляції стану прорихів. У роботі Fagooc і співавт. [64] показано зниження прорихової провідності за умов посухи у рослин рису, оброблених сперміном або путресцином. На прикладі епідермісу *Vicia faba* встановлено, що спермін, спермідин, путресцин і кадаверин здатні спричиняти закривання прорихів, впливаючи на потенціал-залежні калієві канали і перешкоджаючи надходженню калію у замикаючі клітини [119]. Схожі ефекти зареєстровані і на рослинах арабідопсису [23]. В умовах культури мандарину *in vitro* обробка сперміном зменшувала прорихову провідність і водний дефіцит на фоні сольового стресу [149]. Також встановлено, що діаміноксидаза, яка окислює поліаміни, є необхідною ланкою в процесі закривання прорихів, індукованого дією АБК [32].

Закривання прорихів за умов посухи може мати як позитивні, так і негативні наслідки. Зменшення прорихової провідності не лише скорочує втрати води при транспірації, а й збільшує ефективність її використання. При закриванні прорихів транспірація знижується швидше і більшою мірою, ніж фотосинтез, в результаті чого рослина фіксує більше вуглецю у розрахунку на одиницю поглинутої води [12]. Водночас зменшення прорихової провідності може бути причиною розвитку окиснювального стресу, зумовленого браком надходження в клітини мезофілу вуглекислого газу і створенням тим самим передумов для «перевідновлення» електрон-транспортного ланцюга хлоропластів [104]. Зважаючи на це, за умов зневоднення зростає значення механізмів знешкодження АФК. При цьому поліаміни можуть як посилювати ефект закривання прорихів, так і активувати антиоксидантну систему.

В умовах наших експериментів обробка рослин пшениці путресцином і сперміном попереджала спричинюваний посухою розвиток окиснювального стресу. Про це свідчить відсутність в умовах посухи підвищення вмісту МДА у листках рослин, оброблених путресцином і менше порівняно з необробленими рослинами зростання вмісту продукту ПОЛ у варіанті зі сперміном (рис. 10). Слід зауважити, що феномен більш ефективного попередження окиснювального стресу за дії путресцину порівняно зі сперміном показано і на рослинах рису в умовах сольового стресу [131].

На попередження путресцином і (меншою мірою) сперміном окиснювальних пошкоджень вказує і вищий вміст хлорофілів та більша величина співвідношення між хлорофілом а і b у листках рослин, оброблених поліамінами (табл. 3). Примітно, що посуха викликала більш ніж дворазове зменшення у листках вмісту каротиноїдів, які виконують функції ключових низькомолекулярних антиоксидантів у ліпідній фазі хлоропластів [8]. При цьому обробка 5 мМ путресцином сприяла збереженню їх вмісту, близького до величин контролю. Помітно більшим від варіанта без обробки поліамінами за умов посухи був вміст каротиноїдів і у разі

застосування 1 мМ путресцину та 1 і 5 мМ сперміну (табл. 3). Стабілізація під впливом сперміну вмісту каротиноїдів за умов сольового стресу показана у рослин вигни [30].

У даній роботі не оцінювався стан ферментативної антиоксидантної системи. Проте в ряді досліджень показані підвищення або стабілізація в стресових умовах активності антиоксидантних ферментів у рослин, попередньо оброблених поліамінами. Так, у рослин рису під впливом сперміну і спермідину підвищувалася активність супероксиддисмутази (СОД) і стабілізувалась активність каталази за умов посухи [64]. В експериментах з культурою *in vitro* показано підвищення активності СОД і пероксидази у мандарину за умов стресу зневоднення [149]. У ряді досліджень встановлено посилення експресії генів антиоксидантних ферментів у рослин різних видів за дії екзогенних поліамінів [11, 13].

Поряд зі змінами активності і експресії генів антиоксидантних ферментів під дією поліамінів може відбуватися і зміна вмісту низькомолекулярних антиоксидантів, а також поліфункціональних протекторних сполук, зокрема, проліну. На етіологованих проростках пшениці показано підвищення вмісту проліну за умов посухи при обробці путресцином, але не сперміном [7]. Водночас у дорослих рослин обробка путресцином не лише не посилювала накопичення проліну за умов посухи, а й послаблювала його, а обприскування сперміном майже не впливало на вміст проліну (рис. 11). Ці результати свідчать, що реакція протекторних систем етіологованих проростків і дорослих зелених рослин одного виду на обробку поліамінами може відрізнятися. При цьому відсутність помітного впливу поліамінів на вміст проліну не означає відсутності їх позитивних ефектів за умов посухи. Незважаючи на важливість проліну як поліфункціонального протектора, менш істотне підвищення його вмісту при нелетальному стресі може вказувати на вищу резистентність рослин [14]. Іншими словами, за більшої резистентності «поріг» активації накопичення проліну стресовим фактором може бути вищим. При цьому за відсутності істотного підвищення вмісту проліну осмопротекторні і антиоксидантні функції, властиві проліну, можуть виконувати інші низькомолекулярні сполуки. В наших експериментах, зокрема, відзначалося підвищення під впливом путресцину і більшою мірою сперміну вмісту цукрів у листках (рис. 11). Це узгоджується з даними, отриманими на рослинах кукурудзи, оброблених сперміном, за умов посухи [158].

Крім того, путресцин і спермін сприяли збереженню пулу флавоноїдних сполук, що поглинають в УФ В, хоча і слабо впливали на вміст антоціанів (рис. 12). Водночас на етіологованих проростках пшениці за умов осмотичного стресу показано помітне зростання вмісту антоціанів під впливом як путресцину, так і сперміну, останній також викликав підвищення вмісту флавоноїдів, що поглинають в області УФ-В [7]. Загалом підвищення вмісту вторинних метаболітів (фенольних сполук, різних флавоноїдів) або збереження їх пулу за дії екзогенних поліамінів зафіксовано на різних об'єктах: рослинах рису [64], сої [58], мандарину [127] за умов осмотичних стресів. Показано також підвищення під впливом поліамінів активності фенілаланінаммонійліази – ключового ферменту синтезу флавоноїдів [68, 124].

Таким чином, встановлений ефект підвищення посухостійкості рослин пшениці під впливом екзогенних поліамінів за умов, наближених до природних. Встановлено, що путресцин чинив більш істотний протекторний вплив на рослини порівняно зі

сперміном. Складовими захисної дії поліамінів є їх вплив на водний обмін (зменшення водного дефіциту, ймовірно, за рахунок зниження продигової провідності), стан антиоксидантної і до певної міри осмопротекторної систем. За наявності неспецифічних захисних ефектів поліамінів на рослини різних таксономічних груп і різного віку відзначається і прояв специфічності їх дії. Зокрема, складові протекторного впливу на етіоловані проростки пшениці при осмотичному стресі і дорослі рослини за посухи у ґрунтовій культурі мають помітні відмінності.

6. УЧАСТЬ АФК ТА ІОНІВ КАЛЬЦІЮ В ІНДУКОВАННІ ТЕПЛОСТІЙКОСТІ ПРОРОСТКІВ ПШЕНИЦІ ЕКЗОГЕННИМ МЕЛАТОНІНОМ

Однією з найважливіших складових стрес-протекторної дії мелатоніну 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 [168]. Водночас відомо, що мелатонін може спричиняти експресію генів антиоксидантних ферментів, зокрема, різних форм супероксиддисмутази, каталази і ферментів аскорбат-глутатіонового циклу [168]. Зрештою, є відомості про пригнічення мелатоніном стрес-індукованої експресії генів каталітичної субодиниці НАДФН-оксидази (*RbohD* і *RbohF*) [106].

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 [88]. 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 [71]. При цьому інгібітор НАДФН-оксидази дифеніленіодоніум усував ефект підвищення стійкості томатів до теплового, холодowego і осмотичного стресів, спричинюваний дією мелатоніну. На рослинах кавуна недавно показано роль пероксиду водню, генерованого з участю НАДФН-оксидази, у розвитку їх холодостійкості за обробки мелатоніном [46]. 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 дотепер залишаються майже не дослідженими. Це зокрема стосується і феномену індукування теплостійкості злаків за обробки мелатоніном, виявленого в ряді досліджень [25].

У зв'язку з викладеним, завданням досліджент, результати яких наведені у даному розділі, було встановлення участі АФК в індукуванні мелатоніном стійкості проростків пшениці до потенційно летального теплового стресу. Також з використанням інгібіторного методу у роботі досліджували можливе значення різних пулів кальцію в прояві впливу мелатоніну на генерацію АФК клітинами коренів і розвиток теплостійкості проростків.

6.1. Матеріали і методи

Для експериментів використовували етіюльовані проростки пшениці (*Triticum aestivum* L.) сорту Досконала. Насіння отримано з колекції Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України (репродукція 2020 року). Зернівки після поверхневого знезараження 6 % перексидом водню протягом 30 хв пророщували в темряві за температури 20–22°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 дослідів 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 дослідях.

Під час інкубації проростків на досліджуваних розчинах визначали вміст у корнях пероксиду водню феротіоціанатним методом [143].

Для визначення теплостійкості проростків їх прогрівали у водяному ультратермостаті за температури $45,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ протягом 10 хв. Після цього проростки усіх варіантів переносили на очищену воду. Через 3 доби оцінювали виживаність проростків [92].

Досліди проводили у 3-разовому повторенні, на рисунках наведені середні величини та їх похибки. Обговорюються відмінності, вірогідні при p

6.2. Вплив мелатоніну на теплостійкість проростків пшениці та участь АФК і кальцію в реалізації його стрес-протекторних ефектів

Обробка проростків розчинами мелатоніну у концентраціях діапазону від 0,1 до 10 мкМ спричинювала істотне підвищення їх виживаності після ушкоджувального прогріву (рис. 13). 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

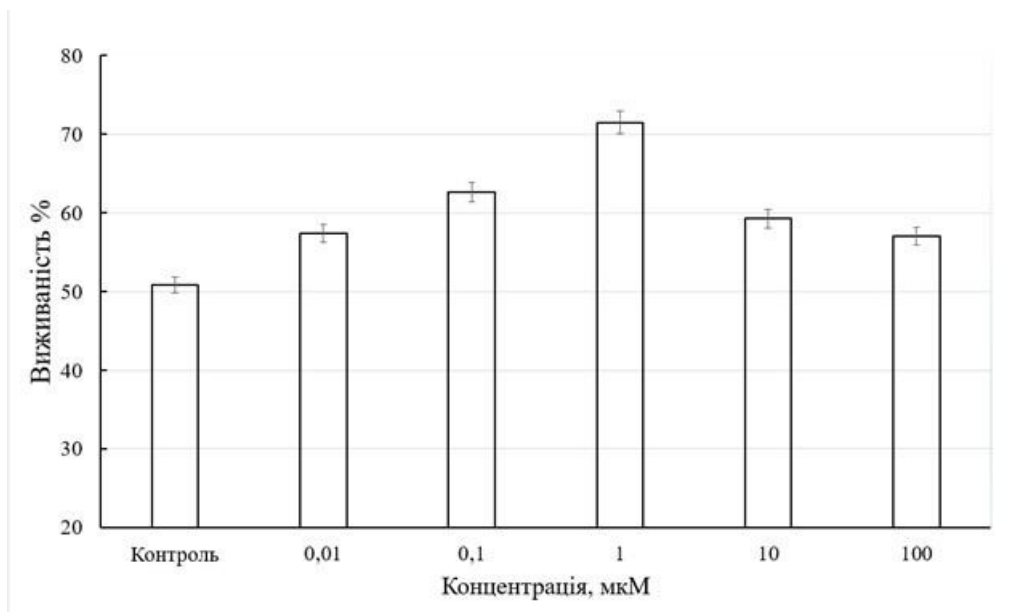


Рис. 13. Концентраційна залежність впливу мелатоніну на виживаність проростків пшениці після 10 хв прогріву за температури 45°C

Вміст пероксиду водню в корнях проростків контрольного варіанта впродовж доби експерименту істотно не змінювався (рис. 14). Додавання мелатоніну у середовище інкубації проростків спричиняло швидке підвищення в корнях вмісту пероксиду водню. Вірогідний ефект відзначався вже через 20 хв від початку його дії (рис. 14). Через 1 год вміст H_2O_2 у корнях 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 падав і його величини ставали меншими від контролю. Таким чином, підвищення вмісту пероксиду водню за дії мелатоніну було транзиторним і наприкінці інкубації змінювалося його зниженням.

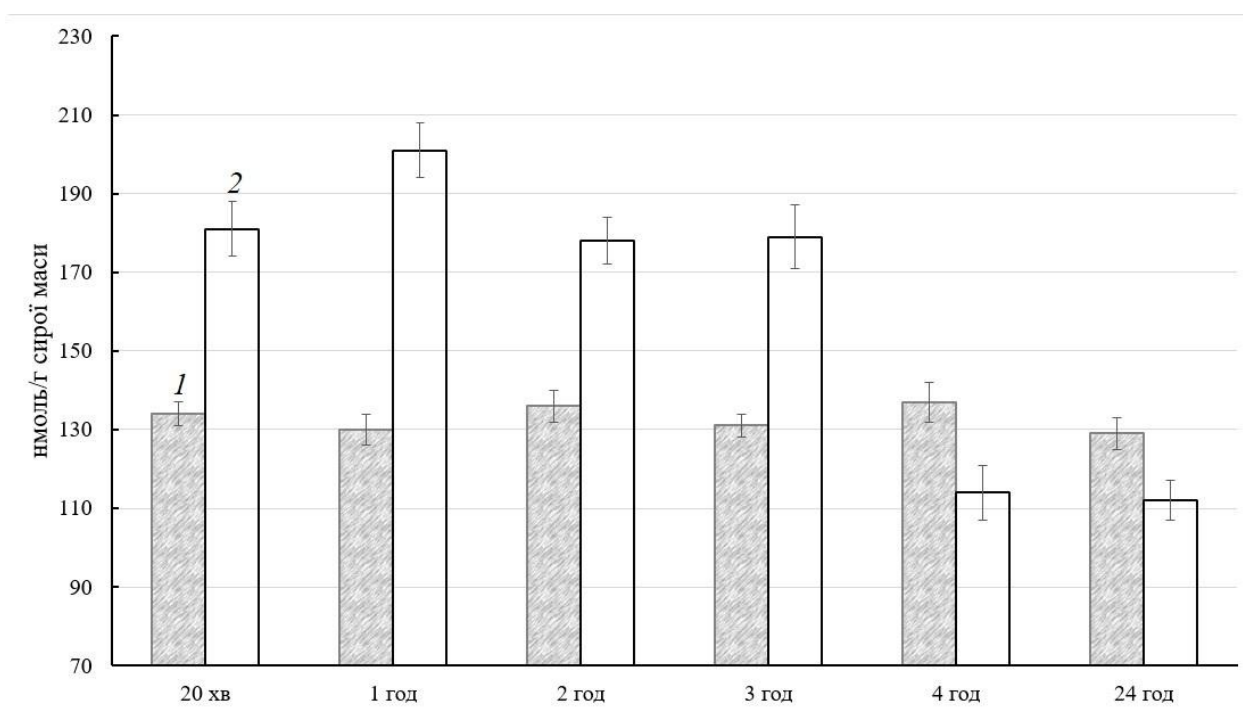


Рис. 14. Динаміка вмісту перексиду водню у коренях проростків пшениці за інкубації у середовищі з додаванням мелатоніну. 1 – контроль; 2 – мелатонін.

Обробка проростків скавенджером перексиду водню ДМТС знижувала його вміст у коренях та усувала підвищення кількості H_2O_2 , спричинюване дією мелатоніну (рис. 15, а). У варіанті з обробкою інгібітором НАДФН-оксидази імідазолом відзначалася тенденція до деякого зниження вмісту перексиду 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 перексиду водню в коренях під впливом мелатоніну.

Хелатор кальцію ЕГТА сам по собі практично не впливав на вміст H_2O_2 у коренях проростків пшениці (рис. 15, а). Однак передобробка коренів проростків цим антагоністом кальцію нівелювала його зростання, 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 H_2O_2 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.

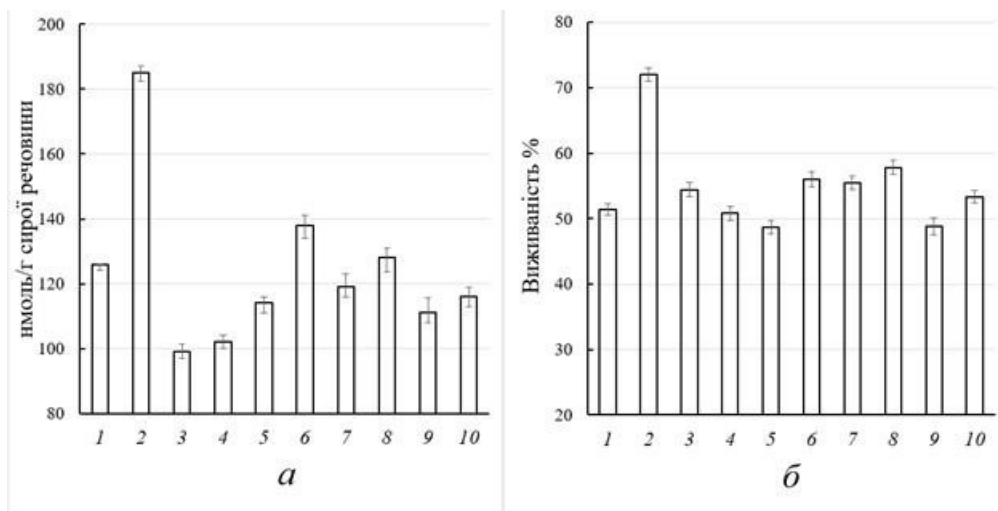


Рис. 15. Вміст перексиду водню у коренях (а) та виживаність проростків пшениці (б) після ушкоджувального прогріву (45°C, 10 хв) за їх обробки мелатоніном, ДМТС, імідазолом та антагоністами кальцію. 1 – контроль; 2 – мелатонін (1 мкМ); 3 – ДМТС (150 мкМ); 4 – мелатонін (1 мкМ) + ДМТС (150 мкМ); 5 – імідазол (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).

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. 15, 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.

Даних про вплив мелатоніну на кальцієвий гомеостаз рослинних клітин у літературі поки що дуже мало. Проте недавно у роботі Chang і співавторів [46] було показано, що обробка рослин кавуна мелатоніном, яка спричинювала підвищення їх холодостійкості, супроводжувалася зростанням у тканинах вмісту пероксиду водню, зумовленим посиленням експресії гена однієї з молекулярних форм НАДФН-оксидази (*RBOHD*). Цей ефект виявився кальційзалежним і усувався неспецифічним блокатором кальцієвих каналів лантаном. У наших експериментах з використанням відповідних інгібіторів також показано залежність посилення генерації АФК клітинами коренів від активності НАДФН-оксидази і надходження кальцію як з позаклітинного простору, так і з внутрішньоклітинних компартментів (рис. 3, а). Крім ймовірного впливу на експресію генів *RBOH*, кальцій може чинити й безпосередній вплив на активність цього ферменту, а також модулювати активність протеїнкінази, що активує НАДФН-оксидазу шляхом фосфорилування [95].

Припускають, що послідовні зміни кальцієвого і редокс-гомеостазу є і необхідними складовими зареєстрованого впливу мелатоніну на утворення латеральних коренів. У роботі Віан і співавторів [42] запропоновано модель, згідно з якою після з'єднання мелатоніну з мембранним рецептором з участю α -субодиниці G-білка відбувається відкриття кальцієвих каналів плазматичної мембрани, внаслідок чого іони кальцію активують НАДФН-оксидазу і спричиняють посилення генерації АФК клітинами. У свою чергу АФК виступають як елемент сигналіngu, що зумовлює утворення бічних коренів.

Для з'ясування механізмів впливу кальцію на формування сигналу АФК, що опосередковує індуковане мелатоніном підвищення теплостійкості проростків пшениці, необхідні спеціальні дослідження. Однак, поведений нами 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. 16).

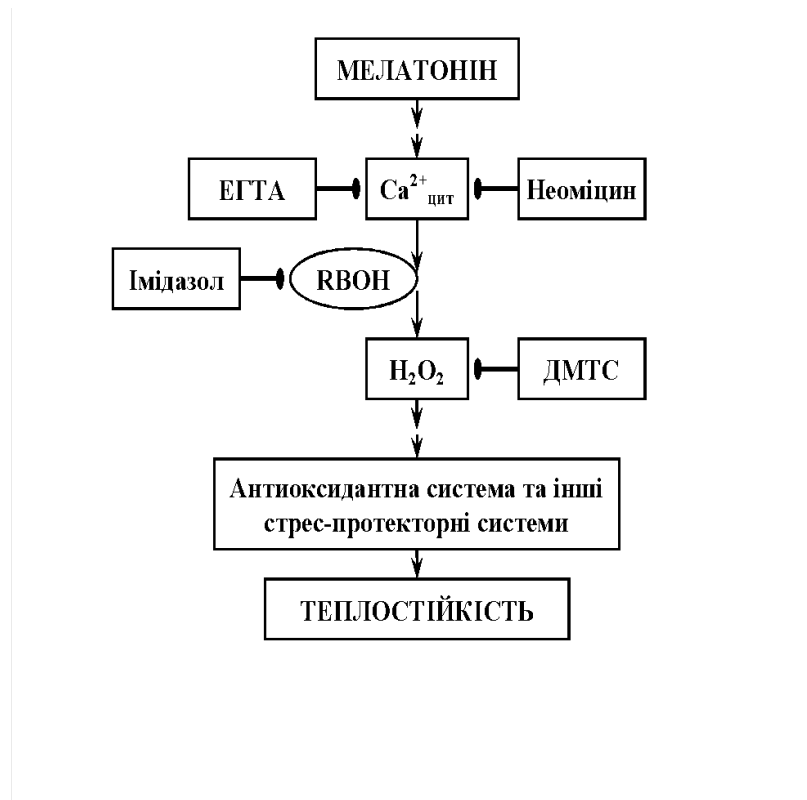


Рис. 16. Гіпотетична схема Ca^{2+} - і АФК-залежного впливу мелатоніну на теплостійкість проростків пшениці. RBOH – каталітична субодиниця НАДФН-оксидази. Пояснення в тексті.

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

7. СТАН ОСМОПРОТЕКТОРНОЇ І АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМ ПРОРОСТКІВ ОЗИМИХ ЖИТА, ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ І ТРИТИКАЛЕ ЗА АДАПТАЦІЇ ДО ОСМОТИЧНОГО СТРЕСУ

В останні десятиліття посуха у світі стає одним з найбільш шкочочинних абіотичних стресорів. Спричинювані нею втрати врожаю різних культур можуть становити від 30 до 90% [60]. Згідно з прогнозними кліматичними моделями, до 2050 року істотна посуха спостерігатиметься майже на половині орних земель світу [122]. Зважаючи на це, дослідження стратегій адаптації культурних рослин до посухи набуває особливої актуальності. Повною мірою це стосується і зернових озимих злаків. Ці рослини зазнають негативного впливу посухи на різних фазах розвитку. Нині помітно зростає частота осінніх посух, які негативно впливають на проростання насіння і розвиток злаків на ранніх стадіях [31, 122].

Поряд з прямим впливом нестачі вологи на перебіг фізіолого-біохімічних процесів у рослин за умов посухи зазвичай виникає ефект окиснювального стресу – порушення просторово-часового балансу між генерацією і видаленням активних форм кисню (АФК). У зв'язку з цим антиоксидантну систему розглядають як одну з ключових протекторних систем, задіяних в адаптації рослин до посухи [10]. Незважаючи на те, що її активація є універсальною адаптивною реакцією рослин, за умов посухи вона має відмінні риси, пов'язані, зокрема, із значним внеском в антиоксидантний захист великої кількості сполук, які не прийнято вважати канонічними антиоксидантами – проліну, цукрів, поліамінів та ін. Зазначені сполуки виступають не тільки у ролі сквенджерів АФК, а й перебувають у складній функціональній взаємодії з іншими антиоксидантами [115, 156]. Феноменологія і механізми таких ефектів активно досліджуються лише останніми роками [44, 157]. Водночас такі низькомолекулярні сполуки, як пролін і цукри, є не лише сумісними осмолітами, а й здатні утворювати водневі зв'язки з біомакромолекулами і мембранними структурами, що сприяє їх стабілізації за умов дегідратації [172]. Отже, функціонально пов'язані осмопротекторна і антиоксидантна системи розглядаються як ключові захисні системи при адаптації рослин до дії стресових чинників, що зумовлюють зневоднення клітин: посухи, засолення і від'ємних температур [122, 139].

Відомо, що жито, тритикале і пшениця досить істотно відрізняються особливостями функціонування осмопротекторної і антиоксидантної систем. Зокрема, особливістю жита є високий вміст низькомолекулярних сполук з антиоксидантною активністю – антоціанів та інших флавоноїдних сполук, а також проліну [37, 91]. Принаймні частково цим пояснюють феномен вищої порівняно з пшеницею стійкості жита до прямих агентів окиснювального стресу [91]. Серед недостатньо досліджених злаків певний інтерес становить і тритикале – вперше цілеспрямовано і успішно створений людиною міжродовий гібрид. Його сучасні озимі сорти перевершують сорти пшениці не тільки за морозостійкістю, а й за посухостійкістю [141] та продуктивністю [17]. В окремих роботах відносно високу стійкість тритикале до дії стресорів пов'язують з високою активністю супероксиддисмутази (СОД) та вмістом окремих вторинних метаболітів [135, 139].

Отже, з особливостями функціонування антиоксидантної і осмопротекторної систем можуть бути пов'язані відмінності у стійкості різних видів злаків до стресових чинників, у тому числі посухи. Варто зауважити, що попри наявність видової і сортової специфіки антиоксидантної системи, окремі її інгредієнти можуть не відображати зв'язків зі стійкістю виду або сорту злаків до дії стресорів [4, 94]. У зв'язку з цим, доцільні комплексні дослідження змін стану ферментативної антиоксидантної системи та вмісту низькомолекулярних протекторів (у тому числі антиоксидантів) при адаптації злаків до посухи. Незважаючи на активне вивчення механізмів посухостійкості жита, тритикале і пшениці, порівняльних досліджень стану цих систем у вказаних видів за дії посухи на ранніх фазах розвитку дотепер не проводилося. Це і визначило мету даного розділу – порівняння стану осмопротекторної і антиоксидантної систем етіюльованих проростків озимих жита, тритикале і пшениці за нормального зволоження та дії непронижного агента осмотичного стресу – ПЕГ 6000.

7.1. Матеріали і методи

Для досліджень використовували 4-добові етіюльовані проростки озимих жита (*Secale cereale* L., сорт Пам'ять Худосерка – посухостійкий (<https://yuriev.com.ua/ua/katalog-produkcii/katalog/zhito-ozime/pamyat-hudoerka/>), тритикале (\times *Triticosecale* Wittm., сорт Раритет – посухостійкий (<http://www.semagro.com.ua/info/ozime-tritikale-raritet-338.html>) і пшениці (*Triticum aestivum* L., сорт Досконала, лісостепоного екотипу, помірно посухостійкий [6]. Всі сорти селекції Інституту рослинництва імені В.Я. Юр'єва НААН України.

Зернівки знезаражували протягом 40 хв 6% розчином перексиду водню та ретельно промивали дистильованою водою. Насіння контрольного варіанта пророщували на водопровідній воді, очищеній з використанням системи водопідготовки, що включає в себе фільтр механічного очищення, вугільний фільтр та напівпронижну зворотноосмотичну мембрану з розміром комірок 1 нм. Осмотичний стрес створювали додаванням в середовище непронижного осмотика ПЕГ (PEG) 6000 у кінцевій концентрації 12% [89].

Через 4 доби пророщування насіння при 22°C вимірювали масу пагонів і коренів. Також визначали оводненість проростків. Вміст сухої речовини визначали, висушуючи зразки до сталої маси за температури 103°C.

Біохімічні показники аналізували в пагонах.

Для визначення вмісту продуктів перексидного окиснення ліпідів (ПОЛ) рослинний матеріал гомогенізували в реакційному середовищі, що містило 0,25% 2-тіобарбітурову кислоту в 10% трихлороцтовій кислоті [65]. Після цього проби кип'ятили протягом 30 хв, різко охолоджували і центрифугували 15 хв при 10000 g. У супернатанті визначали продукти ПОЛ, що реагують з 2-тіобарбітуровою кислотою (переважно малоновий діальдегід – МДА), вимірюючи оптичну густину при довжині хвилі 532 нм (максимум світлопоглинання МДА) і 600 нм (для поправки на неспецифічне поглинання).

Активність антиоксидантних ферментів визначали за методиками, докладно описаними раніше [91]. Наважки пагонів гомогенізували за температури 2-4°C в 0,15 М К, Na-фосфатному буфері (рН 7,6) з додаванням ЕДТА (0,1 мМ) і дитіотрейтолу (1 мМ). Для аналізу використовували супернатант після центрифугування гомогенату при 8000 g протягом 15 хв за температури 2-4°C.

Загальну активність СОД (КФ 1.15.1.1) визначали при рН реакційної суміші 7,6, використовуючи метод, в основі якого здатність ферменту конкурувати з нітросинім тетразолієм за супероксидні аніони, що утворюються внаслідок аеробної взаємодії НАДН і феназинметосульфату. Активність каталази (КФ 1.11.1.6) аналізували при рН реакційної суміші 7,0 за кількістю H₂O₂, розкладеного за одиницю часу. Активність гваяколпероксидази (КФ 1.11.1.7) визначали, використовуючи як донор водню гваякол, а як субстрат – пероксид водню. За допомогою К, Na-фосфатного буферу рН реакційної суміші доводили до 6,2. Активність СОД і гваяколпероксидази виражали в умов. од./г сухої маси • хв), активність каталази – в ммоль H₂O₂/г сухої маси • хв).

Вміст проліну аналізували з використанням нінгідринового реактиву і виражали в мкмоль/г сухої маси [40]. Сумарний вміст цукрів в проростках визначали методом Морріса-Рое з використанням антронового реактиву [170] з модифікаціями, описаними нами раніше [90].

Для визначення вмісту антоціанів і флавоноїдів, що поглинають в області УФ-В, наважки пагонів гомогенізували в 1% розчині НСІ в метанолі. Після центрифугування гомогенату при 8000 g протягом 15 хв визначали оптичну густина супернатанту при довжинах хвиль 530 нм і 300 нм [133].

Визначення біохімічних показників проводили не менше ніж в трьох біологічних і трьох аналітичних повтореннях. При визначенні маси органів проростків кожне повторення складалося з 30 проростків. На рисунках і в таблиці наведено середні величини та їх стандартні похибки. Обговорюються відмінності, вірогідні при P

7.2. Стрес-протекторні системи пшениці, жита і тритикале за умов адаптації до осмотичного стресу

Під впливом осмотичного стресу істотно знижувалася маса пагонів проростків усіх трьох видів злаків, найбільше пригнічення їх росту спостерігали у пшениці (табл. 4). Істотне інгібування росту коренів відзначали у проростків тритикале і пшениці. Загальна маса проростків під впливом інкубації у присутності ПЕГ 6000 істотно зменшувалася у пшениці і тритикале і менш помітно у жита. Посуха також спричинювала зміни співвідношення між масою пагонів і коренів у проростків трьох видів. Найменшим цей показник був у проростків пшениці (табл. 4).

Таблиця 4.

Варіант	Маса пагона		Маса кореня		Маса проростка		Співвідношення маса пагона/маса кореня
	мг [% до контролю	мг	% до контролю	мг	% до контролю	
<i>Secale cereale</i>							
Контроль	42,4±1,6	100	53,7±2,3	100	96,1±2,8	100	0,79
PEG 6000, 12%	25,8±1,2	60,8	45,8±2,2	85,2	71,6±2,5	74,5	0,56
× <i>Triticosecale</i>							
Контроль	63,2±2,4	100	56,6±2,2	100	119±3,3	100	1,12

PEG 6000, 12%	37,7±1,9	59,7	38,7±2,3	68,4	76,4±3,0	63,8	0,97
			<i>Triticum aestivum</i>				
Контроль	39,1±2,1	100	45,0±2,0	100	84,1±2,9	100	0,87
PEG 6000, 12%	18,7±1,3	47,8	34,9±2,6	77,6	53,6±2,9	63,7	0,54

За умов осмотичного стресу знижувалася і оводненість тканин проростків злаків трьох видів (рис. 17). При цьому зниження вмісту води у проростках жита за стресових умов було менш істотним порівняно з проростками тритикале та пшениці.

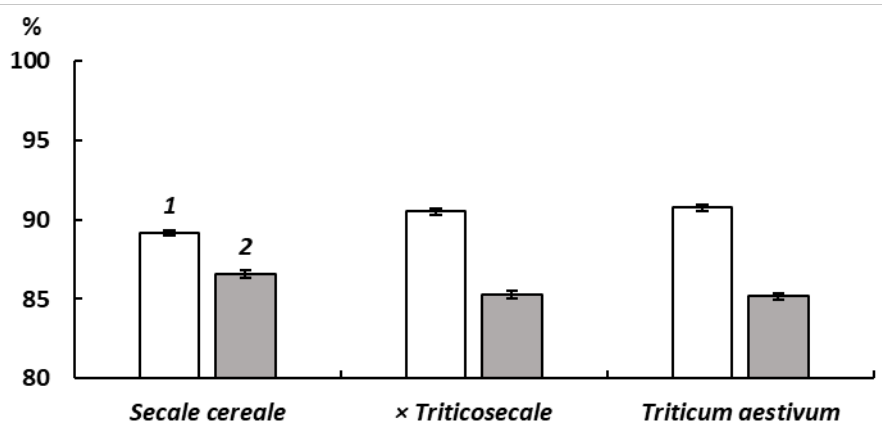


Рис. 17. Оводненість (%) пагонів проростків злаків

Зневоднення проростків спричинювало виникнення у них ефекту окиснювального стресу. Так, у пагонах пшениці вміст продукту ПОЛ МДА зростав більш ніж у 1,5 рази (рис. 18). Водночас у проростків тритикале і особливо жита такий ефект був значно менш помітним.

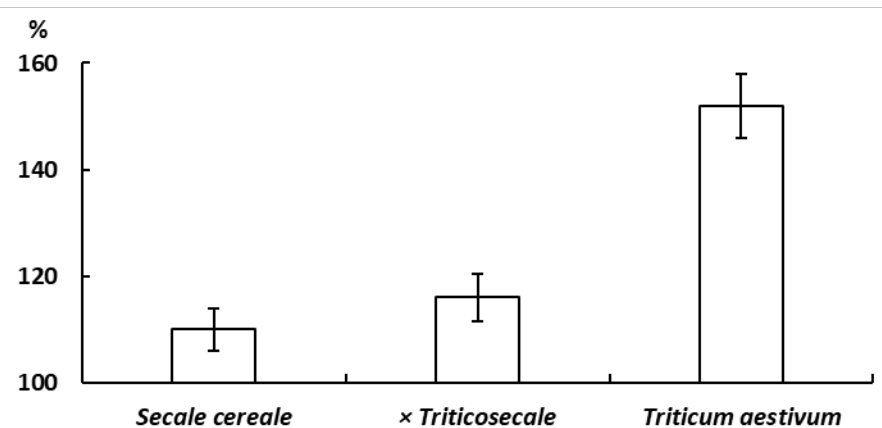


Рис. 18. Вміст МДА (% до контролю) в пагонах проростків злаків за дії осмотичного стресу (12% ПЕГ 6000).

Таким чином, в цілому можна констатувати, що під впливом осмотичного стресу показники росту, вмісту води і розвитку ПОЛ найменшою мірою змінювалися у жита, що свідчить про вищу порівняно з тритикале і пшеницею їх стійкість до зневоднення. Проростки тритикале, у свою чергу, мали дещо вищу стійкість порівняно з проростками пшениці, що виявлялося у менш істотному інгібуванні росту пагонів та меншому накопиченні продукту ПОЛ МДА за умов осмотичного стресу (рис. 18).

Базова активність СОД у проростках трьох видів злаків істотно не відрізнялася (рис. 19, А). Осмотичний стрес спричиняв тенденцію до зниження активності ферменту у пагонах проростків жита і пшениці, у тритикале, навпаки, спостерігалось вірогідне підвищення активності СОД за стресових умов.

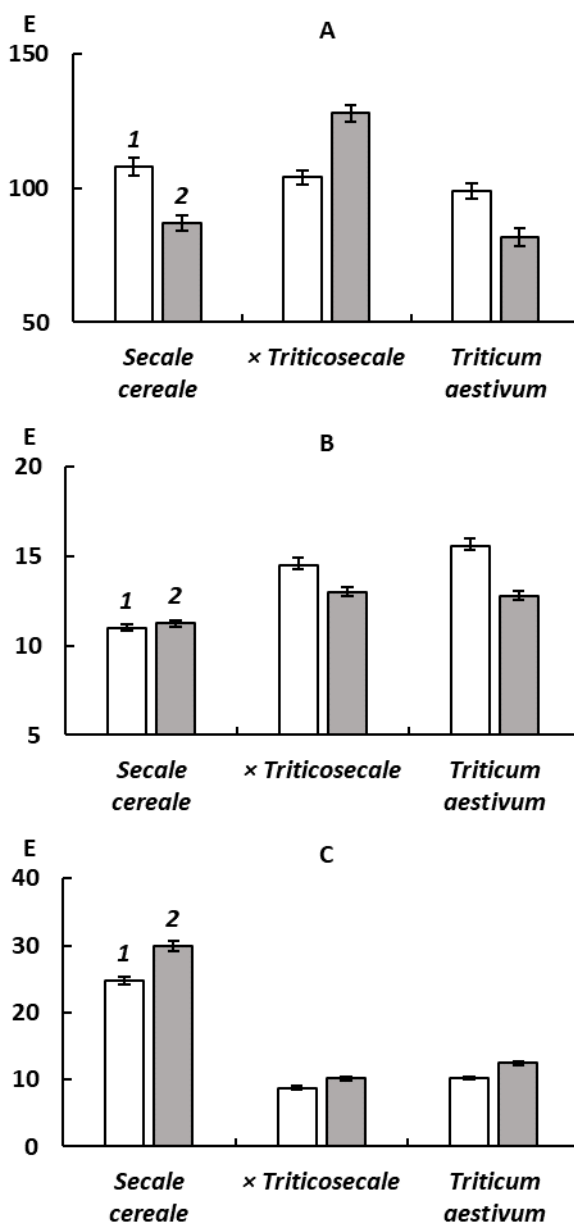


Рис. 19. Активність СОД (А – умов. од./г сухої маси хв), каталази (Б – мкмоль Н₂О₂/г сухої маси хв) і гваяколпероксидази (В – умов. од./г сухої маси хв) у пагонах проростків злаків. 1 – контроль; 2 – ПЕГ 6000, 12%.

Активність каталази за звичайних умов найвищою була у пагонах проростків пшениці, дещо нижчою у тритикале і ще нижчою у жита (рис. 19, В). За дії осмотичного стресу активність ферменту у пшениці і тритикале знижувалася, а у жита зберігалася на рівні контролю.

Активність гваяколпероксидази у пагонах проростків жита за фізіологічно нормальних умов в 2,5-3 рази перевищувала відповідні показники тритикале і пшениці (рис. 19, С). За дії ПЕГ 6000 в пагонах проростків усіх трьох видів відзначалося підвищення активності ферменту, проте найбільш помітним воно було у жита.

Конститутивний вміст проліну у проростків жита істотно перевищував такий у тритикале і пшениці (рис. 20, А). У відповідь на осмотичний стрес цей показник у пагонах жита зростав майже у 2,5 раза.

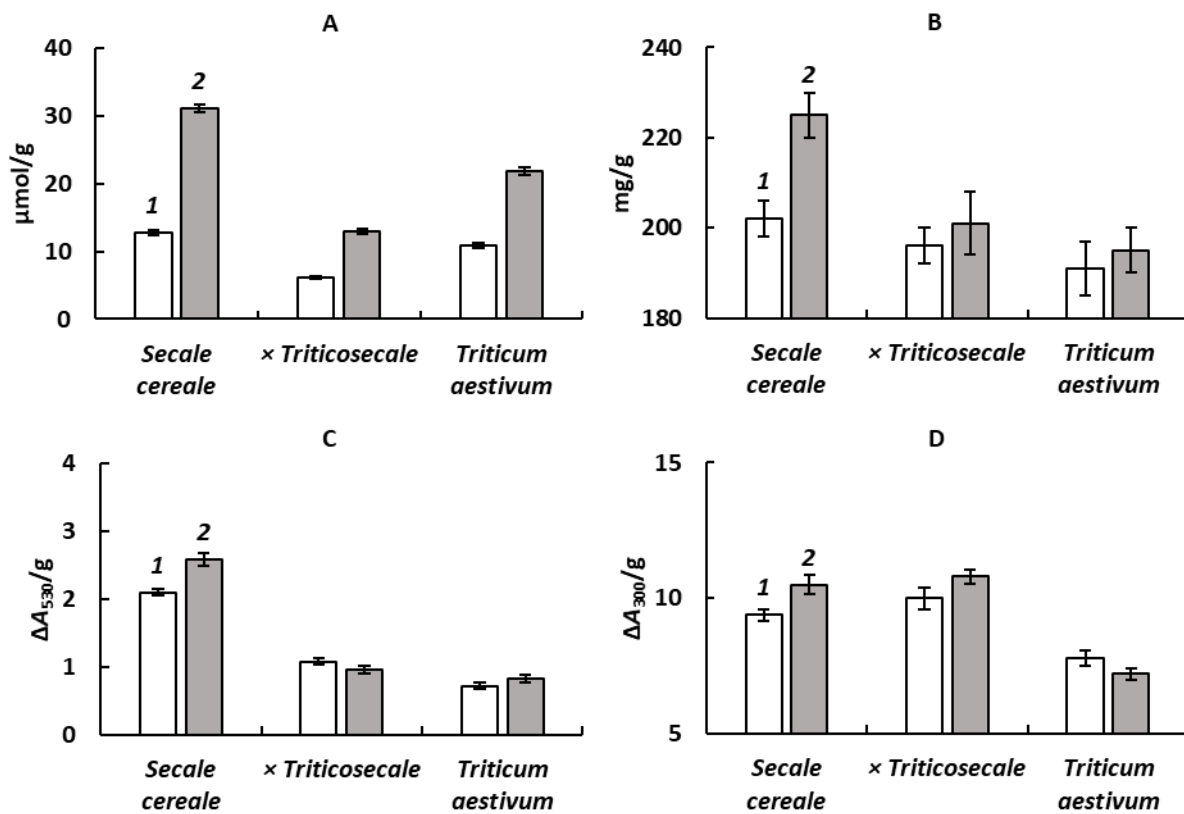


Рис. 20. Вміст проліну (А – мкмоль/г сухої маси), цукрів (В – мг/г сухої маси), антоціанів (С – ΔA₅₃₀/г сухої маси) і флавоноїдів (D – ΔA₃₀₀/г сухої маси) у пагонах проростків злаків. 1 – контроль; 2 – ПЕГ 6000, 12%

У тритикале і пшениці відзначалося приблизно дворазове підвищення вмісту проліну за дії агента осмотичного стресу. При цьому абсолютні значення вмісту проліну за стресових умов найбільшими були у пагонах проростків жита, а найменшими – у тритикале.

Вміст цукрів за звичайних умов у проростків досліджуваних видів злаків відрізнявся неістотно (рис. 20, В). Осмотичний стрес спричиняв відносно невелике підвищення вмісту цукрів лише у проростків жита, у інших видів злаків вірогідних змін цього показника не спостерігали.

Конститутивний вміст антоціанів у пагонах проростків жита втричі перевищував відповідний показник пшениці і вдвічі тритикале (рис. 20, С). У відповідь на дію осмотичного стресу у жита кількість антоціанів зростала, а у інших злаків її зміни були незначними.

Базовий вміст флавоноїдів, що поглинають в УФ-В, був високим у тритикале і жита і помітно нижчим у пшениці (рис. 20, D). Істотних його змін за дії осмотичного стресу у досліджуваних злаків не спостерігалось.

Отримані результати свідчать, що негативний вплив осмотичного стресу найменшою мірою виявлявся у проростків жита. Інгібування накопичення біомаси під впливом ПЕГ 6000 у жита було менш істотним порівняно з тритикале і пшеницею (таблиця). Також проростки жита за стресових умов зберігали більшу оводненість тканин порівняно з проростками двох інших видів злаків (рис. 17). Нарешті, у проростків жита зафіксовано найменш помітні прояви активації ПОЛ за дії осмотичного стресу (рис. 18).

Проростки тритикале мали меншу стійкість до зневоднення, ніж жито, що виявлялося у помітних ефектах інгібування росту (таблиця) і зменшення вмісту води в присутності ПЕГ 6000 (рис. 17). Водночас у проростків тритикале ріст пагонів за стресових умов пригнічувався менше, ніж у проростків пшениці. Також для тритикале було характерним менше зростання інтенсивності ПОЛ за умов зневоднення порівняно з пшеницею. Це дозволяє говорити про вищу стійкість до зневоднення проростків тритикале сорту Раритет порівняно з проростками пшениці сорту Досконала.

Проведені порівняльні дослідження дають підстави констатувати відмінності у функціонуванні протекторних систем за умов зневоднення у трьох видів злаків. Так, проростки жита вирізнялися значно вищим вмістом проліну і антоціанів, а також активністю гваяколпероксидази порівняно з проростками двох інших видів злаків (рис. 19, 20). Причому, ці відмінності проявлялися і за відсутності дії стресового чинника, а на фоні зневоднення ставали більш помітними. Подібні відмінності жита відзначалися у ряді досліджень за дії інших стресових чинників. Проростки жита, на відміну від інших озимих злаків, виявляють певний рівень конститутивної морозостійкості, тобто здатні виживати після впливу помірних від'ємних температур за відсутності попереднього загартування [3, 90]. Як уже зазначалося, для жита, на відміну від пшениці, також була характерною висока стійкість до прямих агентів окиснювального стресу – пероксиду водню і сульфату заліза (II) [91]. У недавньому дослідженні Skrupnik і співавт. [154] показана вища стійкість жита порівняно з пшеницею і тритикале до абіотичних стресорів, зокрема до дії нафти.

Підвищена стресостійкість жита у вказаних роботах пояснюється саме значно вищим, ніж в інших злаків, вмістом в його органах проліну, антоціанів та інших вторинних метаболітів. Сорт жита, який виявляв високу стійкість до токсичної дії алюмінію, відрізнявся від нестійкого сорту цього ж виду значно вищими активністю піролін-5-карбоксилатредуктази і вмістом проліну. У дослідженні Bahrani і співавт. [37], виконаному з використанням 96 генотипів жита, показаний зв'язок кількісного вмісту і якісного різноманіття антоціанів з морозостійкістю.

Висока активність гваяколпероксидази, характерна для проростків жита (рис. 19), також, ймовірно, має внесок в їх стійкість до зневоднення. Показано, що для алоцитоплазматичних гібридів пшениці з цитоплазмою жита була характерною висока посухостійкість і висока активність різних форм гваяколпероксидази за дії посухи [87]. Примітно, що у загартованих проростків жита, на відміну від пшениці, було характерним значне підвищення активності цього ферменту після проморожування, яке спричинювало осмотичний стрес [90].

Певні особливості функціонування протекторних систем виявлені у нашому дослідженні і у проростків тритикале. Цей вид виявився єдиним з досліджуваних, що відповідав на дію осмотичного стресу підвищенням активності СОД (рис. 19). СОД вважається «першим рубежем» в антиоксидантній захисті, оскільки є єдиним ферментом, що знешкоджує супероксидний аніон-радикал, який дає початок утворенню інших АФК [99]. У кількох роботах показаний зв'язок між експресією генів Cu/Zn-СОД і Mn-СОД, активністю цих форм ферменту і посухостійкістю тритикале [141, 142]. В інших дослідженнях повідомляється про зв'язок між показниками інтенсивності вторинного метаболізму і посухостійкістю сортів тритикале [135]. В умовах наших експериментів у проростках тритикале відзначався високий вміст флавоноїдів, які поглинають в УФ-В (рис. 20, D), що також може бути внеском у функціонування антиоксидантної та інших протекторних систем.

Проростки пшениці сорту Досконала, що виявляли найнижчу серед досліджуваних злаків стійкість до зневоднення, мали високу базову активність каталази (рис. 19, B). Ймовірно, це до певної міри компенсувало нижчу порівняно з житом активність гваяколпероксидази і менший вміст низькомолекулярних протекторів.

Отже, в цілому отримані результати вказують на зв'язок між функціонуванням антиоксидантної і осмопротекторної систем і стійкістю проростків злаків. Напевно більший внесок у стійкість мають низькомолекулярні компоненти протекторних систем. Зокрема, лише для проростків найбільш стійкого жита характерне значне накопичення проліну, антоціанів та інших стресових метаболітів. Показово, що з морозостійкістю проростків і дорослих рослин злаків найтісніше корелював інтегральний показник вмісту низькомолекулярних протекторів (проліну, цукрів, вторинних метаболітів), а не відповідний показник активності антиоксидантних ферментів [4].

Таким чином, можна констатувати відмінності у стратегіях адаптації до стресів, пов'язаних зі зневодненням, у злаків різних видів, принаймні на ранніх фазах розвитку. Адаптація жита до окиснювального стресу і частково зневоднення пов'язана з накопиченням проліну і антоціанів, а також з активацією пероксидази, у той час як для тритикале характерна висока активність СОД. Це узгоджується з уявленням, згідно з яким між активністю СОД і вмістом низькомолекулярних протекторних існують зворотні реципрокні зв'язки [99, 156]. Урахування відмінностей в стратегіях адаптації злаків різних видів до зневоднення може бути цінним для удосконалення біохімічних методів оцінки селекційного матеріалу при створенні сортів, стійких до впливу несприятливих абіотичних чинників.

8. ВМІСТ ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ У ПРОРОСТКАХ ТРИТИКАЛЕ РІЗНИХ СОРТІВ ЗА АДАПТАЦІЇ ДО НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР

Відомо, що вторинні метаболіти, зокрема, поліфенольні сполуки, відрізняються високою антиоксидантною активністю [134]. Особливо активними антиоксидантами вважаються флавоноїди, фенольний каркас яких складається з 15 атомів вуглецю, що утворюють два ароматичні кільця, з'єднані через три вуглецевих атоми. Належність флавоноїдів до конкретних класів і до певної міри їх антиоксидантна активність визначаються особливостями структури молекул в області атомів вуглецю 2, 3 і 4 в межах гетероциклічного кільця C [19].

Незважаючи на інтерес до вторинних метаболітів як сполук з антиоксидантною і мембранопротекторною активністю, їх роль у стійкості рослин до гіпотермії досліджена недостатньо. Показано, що при зниженні температури у рослин сорго індукувався синтез антоціанів [150]. У листках рослин кукурудзи вміст антоціанів також підвищувався не тільки за стресових температур, а й при відносно невеликому відхиленні температури від оптимуму [51, 137]. За таких умов відзначалося посилення експресії генів фенілаланінаммонійліази та інших ферментів, залучених до синтезу флавоноїдів [51]. Холодове загартування проростків пшениці спричиняло транзиторне підвищення активності фенілаланінаммонійліази, що передувало зростанню загального вмісту флавоноїдів і кількості антоціанів [93]. Порівняння вмісту антоціанів і безбарвних флавоноїдних сполук в етіюльованих проростках жита, тритикале і пшениці показало, що для тритикале як за звичайних умов, так і при загартуванні, характерний значно вищий порівняно з пшеницею, проте нижчий від жита вміст флавоноїдних сполук [2]. Водночас значення флавоноїдних сполук у прояві властивості морозостійкості тритикале різних генотипів досі залишалося не дослідженим.

Завданням даного розділу досліджень було визначення загального вмісту фенольних сполук, флавоноїдів і окремо кількості антоціанів за умов холодного загартування проростків сортів тритикале з різною морозостійкістю.

8.1. Матеріали і методи

Відомо, що морозостійкість етіюльованих проростків значно нижча від морозостійкості дорослих злаків. Однак видові і сортові відмінності добре виявляються і у проростків, що дозволяє використовувати їх у порівняльних дослідженнях [95]. Для досліджень використовували сорти тритикале селекції Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України з різною морозостійкістю: Букет і Раритет (озимі високоморозостійкі) та Олександра і Підзимок харківський (менш стійкі, що належать до так званих «дворучок»). Насіння поверхнево знезаражували протягом 40 хв. у 6%-ному розчині перексиду водню і пророщували при 20–22°C в темряві в чашках Петрі на фільтрувальному папері, змоченому очищеною водопровідною водою.

Для холодного загартовування 3-добові проростки поміщали на 6 діб в холодильну камеру Danfoss (Нідерланди) з температурою 2–4°C (без освітлення). Оптимальний режим загартування був встановлений раніше [91, 95]. Для порівняння використовували 4-добові

етіольовані проростки, що не піддавалися загартуванню. Оскільки при низькій температурі розвиток проростків уповільнювався, 9-денні загартовані рослини були такими ж, як 4-денні контрольні, вирощені при 20–22°C.

Проростки піддавали проморожуванню за відсутності світла при заданих температурах (див. нижче) протягом 6 год, знижуючи температуру зі швидкістю 1°C/год. Для відтавання проростків температуру в камері підвищували до 2°C зі швидкістю 1°C/год. Після цього проростки відрощували протягом 3 днів при 20–22°C і освітленості 6 клк та оцінювали їх виживаність.

Через 2 та 6 днів від початку впливу загартовувальної температури у проростках визначали вміст вторинних метаболітів.

Загальну кількість фенольних сполук у проростках визначали за допомогою реактиву Фоліна [5]. Наважку рослинного матеріалу розтирали в 6 мл 70%-ного етанолу, залишали для екстракції на 20 хв при кімнатній температурі, після чого фільтрували. В пробірку вносили 0,5 мл фільтрату, 7 мл дистильованої води і 0,5 мл реактиву Фоліна, перемішували і через 3 хв додавали 1 мл 10% карбонату натрію, потім доводили водою до 10 мл. Через 1 год вимірювали оптичну густину розчину при 725 нм. Вміст фенольних сполук виражали в мкмоль хлорогенової кислоти на г сухої речовини.

Загальний вміст флавоноїдів, як і фенольних сполук, аналізували в спиртових екстрактах за утворенням комплексу з іонами алюмінію [56]. Екстракт змішували з 1%-ним розчином AlCl₃ в 95%-ному етанолі в пропорції 1 : 1 і через 40 хв. визначали його оптичну густину при 414 нм. Як стандарт використовували рутин. Вміст флавоноїдів виражали в мкмоль рутину на г сухої речовини.

Для визначення вмісту антоціанів наважки пагонів гомогенізували в 1%-ному розчині HCl в метанолі. Після центрифугування гомогенату при 8000 g протягом 15 хв визначали оптичну густину супернатанту за довжини хвилі 530 нм [78]. Вміст антоціанів виражали в мкмоль ціанідин-3-глюкозиду на г сухої речовини.

Досліди проводили у 4-разовому біологічному повторенні і відтворювали незалежно тричі. На рисунках і в таблиці наведені середні величини та їх стандартні похибки. Крім окремо відзначених випадків обговорюються відмінності, вірогідні при *P*

8.2. Морозостійкість проростків тритикале і вміст в них вторинних метаболітів

Проростки досліджуваних сортів тритикале практично не виявляли конститутивної морозостійкості. Виживаність зразків сортів Букет і Раритет після 6-годинного проморожування за температури –7°C становила близько 2%, а проростки сортів Олександра і Підзимок харківський гинули повністю (табл. 5).

Таблиця 5.

Виживаність проростків тритикале після проморожування

Сорт	Температура проморожування	
	– 7°C	– 9°C
	Без загартування	
Букет	2,1 ± 1,1	-
Раритет	1,5 ± 0,8	-
Олександра	0,0	-
Підзимок Харківський	0,0	-

	Після загартування	
Букет	54,3 ± 2,1	5,2 ± 0,4
Раритет	52,3 ± 1,7	4,0 ± 0,4
Олександра	26,6 ± 2,2	2,3 ± 0,3
Підзимок Харківський	14,8 ± 1,7	2,2 ± 0,4

Примітка. Прочерк означає відсутність визначень.

Після проморожування загартованих проростків при -7°C виживало понад 50% зразків високоморозостійких сортів Букет і Раритет. Сорт Олександра виявляв меншу стійкість, а найнижчою (до 15%) була виживаність проростків сорту Підзимок харківський. Після впливу температури -9°C виживаність загартованих проростків була дуже низькою, хоча сортові відмінності зберігалися (див. табл. 5).

Базовий сумарний вміст фенольних сполук у проростках різних генотипів тритикале не відрізнявся (рис. 21). Дещо нижчим він був у найменш стійкого сорту Підзимок харківський, проте ця відмінність від інших сортів не була вірогідною при P

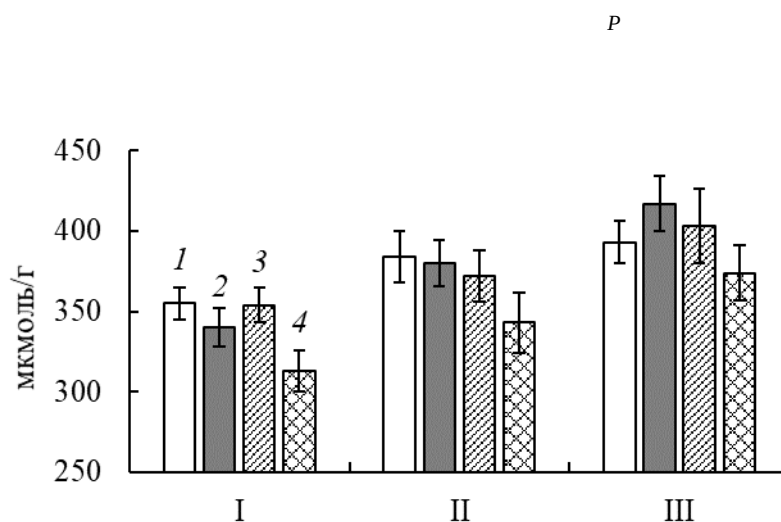


Рис. 21. Вміст фенольних сполук (мкмоль хлорогенової кислоти/г сухої речовини) у проростках тритикале в процесі холодого загартування. Тут і на рис. 22, 23: I – без загартування; II і III – відповідно через 2 і 6 діб загартування за температури $2-4^{\circ}\text{C}$. 1 – Букет; 2 – Раритет; 3 – Олександра; 4 – Підзимок Харківський.

Сумарний вміст флавоноїдів у незагартованих проростках різних генотипів істотно не відрізнявся (рис. 22). Через 2 доби впливу загартувальної температури їх кількість змінювалася слабо. Проте через 6 діб загартування загальний вміст флавоноїдів у проростках усіх досліджуваних сортів зростав в 1,7–1,9 раза. При цьому однак вірогідних сортових відмінностей не відзначалося.

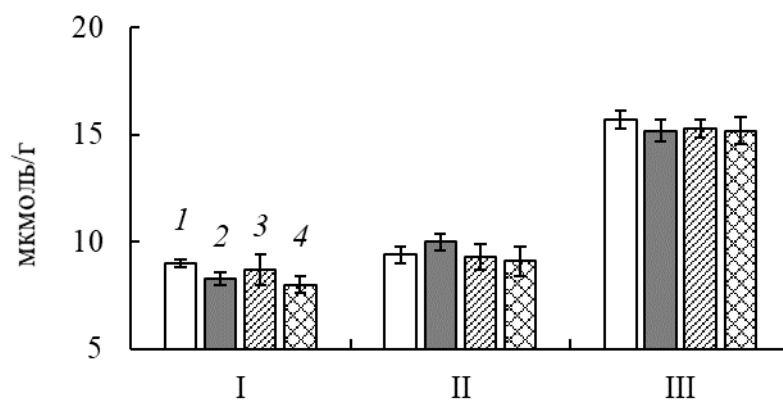


Рис. 22. Вміст флавоноїдів (мкмоль рутину/г сухої речовини) у проростках тритикале в процесі холодного загартування. Позначення, як на рис. 21.

Вміст антоціанів у проростках різних генотипів за звичайних умов відрізнявся, найвищим він був у сорту Букет (рис. 23). Через 2 доби загартування він вірогідно зростав в усіх чотирьох сортах. При цьому морозостійкі сорти Букет і Раритет відрізнялися істотно вищим вмістом антоціанів порівняно з нестійкими сортами Олександра і Підзимок харківський. Більш тривале загартування призводило до подальшого зростання вмісту антоціанів у проростках усіх досліджуваних сортів. У той же час абсолютні величини у найменш стійкого сорту Підзимок харківський були помітно нижчими порівняно з трьома іншими сортами (рис. 23).

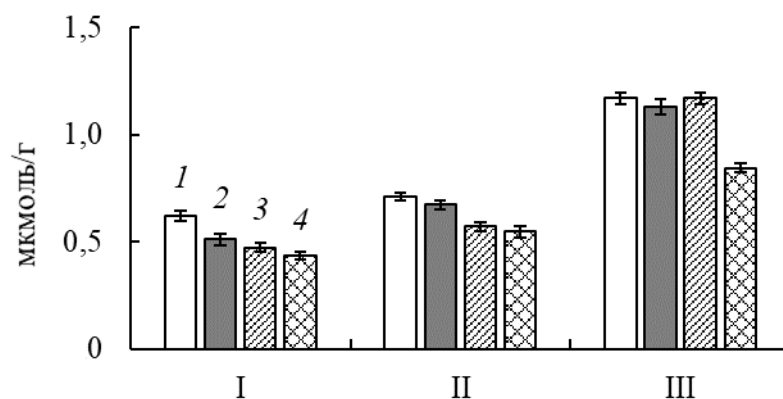


Рис. 23. Вміст антоціанів (мкмоль ціанідину/г сухої речовини) у проростках тритикале в процесі холодного загартування. Позначення, як на рис. 21.

Таким чином, в цілому вторинний метаболізм задіяний у формуванні морозостійкості проростків тритикале. При цьому, однак, сумарний вміст фенольних сполук, що визначається за їх взаємодією з реактивом Фоліна, в процесі загартування збільшувався слабо, сортових відмінностей за цим показником також не відзначалося (див. рис. 21). Значно помітнішими були в процесі загартування проростків зміни загального вмісту флавоноїдів (рис. 22). Але зростання цього показника під час загартування майже не залежало від морозостійкості сортів. При цьому однак можна вважати, що флавоноїди причетні до формування стійкості проростків тритикале до кріостресу. Раніше на ідентичному модельному об'єкті (етіологованих проростках) було встановлено зростання сумарного вмісту флавоноїдів у пшениці [93] і жита [2]. Слід зауважити, що у тритикале виявлено значне зростання вмісту

флавоноїдів за дії УФ-В [155]. Також у рослин цього виду встановлено збільшення вмісту окремих флавоноїдів у відповідь на атаку *Sitobion avenae* і *Oulema melanopus*[55]. Припускають, що ці сполуки можуть бути важливими для попередження надмірного окиснюваного стресу за дії не лише абіотичних, а й біотичних чинників. Ймовірно, накопичення флавоноїдів є процесом, характерним для різних груп злаків, особливо при адаптації до дії стресорів різної природи [55].

Водночас, оцінюючи зміни вмісту флавоноїдних сполук у злаків різних видів і сортів, слід враховувати надзвичайну різноманітність флавоноїдних сполук, які відрізняються за антиоксидантною активністю. Не виключено, що сортові відмінності у тритикале можуть бути виявлені при визначенні лише певних флавоноїдних сполук, а не сумарного їх вмісту. Зокрема, в наших експериментах виявлено накопичення проростками тритикале антоціанів (рис. 23). При цьому навіть у незагартованих проростків тритикале відзначалися сортові відмінності. Найбільш помітно вони виявлялися через 2 доби від початку загартування, коли вміст антоціанів у морозостійких сортів Букет і Раритет істотно перевищував такий у нестійких Олександра і Підзимок харківський. При більш тривалому загартуванні ці відмінності частково нівелювалися, хоча для найменш стійкого сорту був характерний найнижчий вміст антоціанів. Отже, ймовірно, антоціани є одними з найбільш важливих вторинних метаболітів для процесу холодого загартування тритикале, а можливо, й інших злаків. Примітно, що саме антоціани мають надзвичайно високу антиоксидантну активність і здатні ефективно деактивувати супероксидні аніон-радикали [132]. За різними способами оцінки, вважається, що антиоксидантна активність антоціанів у кілька разів перевершує ефекти аскорбінової кислоти [86].

Таким чином, є підстави для висновку про певний внесок антоціанів і, можливо, інших флавоноїдів, але не вторинних метаболітів загалом, у процеси холодової адаптації тритикале. Водночас слід наголосити, що між поодинокими показниками функціонування антиоксидантної системи і морозостійкістю навряд чи можливий тісний зв'язок. Антиоксидантна система рослин складається з великої кількості ферментативних і низькомолекулярних компонентів. Антиоксидантні властивості має і низка речовин, які не вважаються класичними антиоксидантами, але також задіяні у попередженні окиснювальних пошкоджень і накопичуються при холодовому загартуванні злаків у великих кількостях, передусім, пролін і цукри [16, 95]. При цьому всі перелічені компоненти антиоксидантної системи перебувають у функціональній взаємодії з прооксидантами і між собою [88]. Зауважимо, що раніше нам вдалося встановити тісний зв'язок між середніми нормованими величинами антиоксидантної активності, які вираховувалися за показниками семи ферментативних і низькомолекулярних складових антиоксидантної системи, і морозостійкістю досліджуваних сортів тритикале [94]. Практичний інтерес для скринінгу морозостійких генотипів може мати встановлення певного мінімуму ферментативних і неферментативних складових антиоксидантної системи, які у вигляді інтегрального показника можуть бути тісно пов'язані з властивістю морозостійкості. Вміст антоціанів, ймовірно, може бути однією зі складових такого показника.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що донори оксиду азоту спричиняють модифікацію активності антиоксидантних ферментів. Помірні концентрації нітропрусиду натрію (НПН) викликають у рослин підвищення активності супероксиддисмутази (СОД), каталази, гваяколпероксидази і аскорбатпероксидази, у той час як високі інгібують ці ферменти. Індукування їх активності екзогенним NO опосередковано кальцієм і АФК як сигнальними посередниками.
2. Показано, що обробка донором оксиду азоту НПН підвищувала посухостійкість рослин ячменю в умовах ґрунтової культури, що виявлялося у зменшенні спричинюваного посухою пригнічення росту, збереженні пулу фотосинтетичних пігментів, підтриманні водного балансу та підвищенні антиоксидантної активності. Встановлено сортоспецифічні особливості дії НПН за умов посухи.
3. Встановлено ефект підвищення теплостійкості інтактних проростків пшениці під впливом донора монооксиду вуглецю (СО) геміну. Він супроводжувався зростанням активності антиоксидантних ферментів (СОД, каталази, гваяколпероксидази) та зменшенням окиснювальних пошкоджень біомембран.
4. Виявлено транзиторне підвищення вмісту сірководню у коренях проростків пшениці після дії загартовального прогріву. Скавенджер сірководню гіпотаурин та інгібітор синтезу сірководню піруват усували ефекти розвитку теплостійкості проростків і підвищення в них активності антиоксидантних ферментів. Це засвідчує роль сірководню як сигнального посередника у регуляції антиоксидантної системи і розвитку теплостійкості проростків за дії загартовальної температури.
5. Показано, що обприскування рослин пшениці путресцином і сперміном в концентраціях діапазону 0,25-5 мМ істотно зменшувало рістінгібуючий вплив ґрунтової посухи, дія сперміну була менш ефективною. Путресцин помітно знижував прояв водного дефіциту, спричинюваний посухою. Обробка поліамінами також модифікувала зміни вмісту низькомолекулярних протекторів (проліну, цукрів) у листках рослин за умов ґрунтової посухи.
6. Обробка проростків пшениці мелатоніном спричиняла підвищення їх теплостійкості. Методом інгібіторного аналізу показано участь АФК та кальцію як сигнальних посередників у реалізації такого ефекту мелатоніну.
7. Встановлено відмінності стратегій адаптації до осмотичного стресу у проростків зернових злаків різних видів (жито, м'яка пшениця, тритикале). У жита найбільший внесок в захисну систему мають пролін, флавоноїдні сполуки і пероксидаза. Водночас особливістю тритикале за стресових умов є підвищені активність СОД і вміст безбарвних флавоноїдів. Вищі показники функціонування антиоксидантної і осмопротекторної систем у проростків жита і тритикале, ймовірно, зумовлюють їх вищу порівняно з пшеницею стійкість до дегідратації.

8. Досліджено зміни вмісту вторинних метаболітів під час холодого загартування проростків тритикале. Показано внесок антоціанів, але не вторинних метаболітів в цілому, у формування морозостійкості проростків тритикале та систему антиоксидантного захисту при низьких температурах.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Гончарова Э.А. Водный статус культурных растений и его диагностика. С.-Петербург, 2005. 112 с.
2. Горелова Е.И., Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О., Швиденко Н.В., Попов Ю.В., Шкляревский М.А., Рябчун Н.И. Конститутивная и индуцированная холодом закаливанию антиоксидантная активность проростков озимых злаков. Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. 2018. 2 (44): 59-68.
3. Горелова Е.И., Швиденко Н.В., Рябчун Н.И., Колупаев Ю.Е. Вторичный метаболизм проростков *Secale cereale* при действии донора сероводорода и холодом закаливанию. Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. 2018. Вип. 3 (45). С. 94—100.
4. Горелова О.І., Рябчун Н.І., Шкляревський М.А., Резнік А.М., Колупасв Ю.Є. Морозостійкість злаків корелюс з інтегральними показниками вмісту низькомолекулярних протекторних сполук і активності антиоксидантних ферментів. Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. 2020. 3 (51): 71-86.
5. Запрометов М.Н. Фенольные соединения и методы их исследования. Биохимические методы в физиологии растений. О.А. Павлинова (ред.). Москва: Наука, 1971. С. 185 – 207.
6. Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О., Луговая А.А., Заярная Е.Ю. Влияние фунгицида седаксан на устойчивость растений пшеницы (*Triticum aestivum* L.) различных экотипов к почвенной засухе. Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. 2016. 3 (39): 39-47.
7. Кокорев А.И., Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О., Горелова Е.И. Влияние экзогенных полиаминов на состояние антиоксидантной и осмопротекторной систем проростков пшеницы при обезвоживании. Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. 2019. 3 (48): 52-65.
8. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Активные формы кислорода, антиоксиданты и устойчивость растений к действию стрессоров. Киев, 2019. 277 с.
9. Колупаев Ю.Е., Кокорев А.И. Участие полиаминов в регуляции редокс-гомеостаза у растений. Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. 2019. 1 (46): 6-22.
10. Колупаев Ю.Е., Кокорев А.И. Антиоксидантная система и устойчивость растений к недостатку влаги. Физиология растений и генетика. 2019. 51 (1): 28-54.
11. Королькова Д.В., Радюкина Н.Л., Сошинкова Т.Н., Мапелли С., Кузнецов Вл.В. Влияние экзогенного спермина на функционирование антиоксидантной системы растений *Thellungiella salsuginea*. Физиология растений. 2014. 61 (1): 69–76.
12. Кудоярова Г.Р., Холодова В.П., Веселов Д.С. Современное состояние проблемы водного баланса растений при дефиците воды. Физиология растений. 2013. 60 (2): 155–165.
13. Кузнецов Вл.В., Радюкина Н.Л., Шевякова Н.И. Полиамины при стрессе: биологическая роль, метаболизм и регуляция. Физиология

- растений. 2006. 53 (5): 658–683.
14. Кузнецов В.В., Шевякова Н.И. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция. *Физиология растений*. 1999. 46 (2): 321-336.
 15. Лакин, Г. Ф. Биометрия. М., 1980. 293.
 16. Моргун В.В., Майор П.С. Зимо- і морозостійкість озимих злакових культур. *Фізіологія рослин: проблеми та перспективи розвитку*. Київ: Логос, 2009. Т. 2. С. 105–165.
 17. Рибалка О.І., Моргун В.В., Моргун Б.В., Починок В.М. Агрономічний потенціал і перспективи тритикале. *Физиология растений и генетика*. 2015. 47 (2): 95–111.
 18. Соловьян, В. Т. Приспособление клеток к неблагоприятным факторам. Характеристика адаптивных ответов. *Биополимеры и клетка*, 1990. 6 (4), 32–42.
 19. Тараховский Ю.С., Ким Ю.А., Абдрашилов Б.С., Музафаров Е.Н. (). Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина. Пушино: Synchronobook. 2013. 312 с.
 20. Филиппович Ю.В., Егорова Т.А., Севастьянова Г.А. Практикум по общей биохимии. Москва: Просвещение. 1982. 312 с.
 21. Чевари С., Чаба И., Секей Й. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах. *Лаб. дело*. 1985. № 11. С. 678-681.
 22. Шлык А.А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев. *Биохимические методы в физиологии растений / Под ред. О.А. Павлиновой*. Москва: Наука, 1971. С. 154-170.
 23. Agurla S., Gayatri G., Raghavendra A.S. Polyamines increase nitric oxide and reactive oxygen species in guard cells of *Arabidopsis thaliana* during stomatal closure. *Protoplasma*. 2018. 255 (1): 153-162.
 24. Ahuja, I., de Vos, R.C.H., Bones, A. M., Hall, R.D. Plant molecular stress responses face climate change. *Trends in Plant Science*, 2010. 15(12), 665–683.
 25. Alam M.N., Zhang L., Yang L., Islam M.R., Liu Y., Luo H., Yang P., Wang Q., Chan Z. Transcriptomic profiling of tall fescue in response to heat stress and improved thermotolerance by melatonin and 24-epibrassinolide. *BMC Genomics*. 2018. 19. Art. 224.
 26. Alcazar R., Altabella T., Marco F., Bortolotti C., Reymond M., Koncz, C., Carrasco P., Tiburcio A.F. Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta*. 2010. 231 (6): 1237-1249.
 27. Alcázar, R., Cuevas, J. C., Patron, M., Altabella, T., Tiburcio, A. F. Abscisic acid modulates polyamine metabolism under water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.*, 2006. 128, 448–455.
 28. Aleksandrov VYa, Kislyuk IM Cell response to heat shock. Physiological aspect. *Tsitologiya*. 1994. 36(1):5–59.
 29. Ali S, Anjum MA, Nawaz A, Naz S, Sardar H, Hasa MU Hydrogen sulfide regulates temperature stress in plants. In: Singh S, Singh VP, Tripathi DK (eds), *Hydrogen Sulfide in Plant Biology*. Elsevier Inc, 2021. pp. 1-24.

30. Alsokari S.S. Synergistic effect of kinetin and spermine on some physiological aspects of seawater stressed *Vigna sinensis* plants. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2011. 18: 37-44.
31. Al-Tawaha A.R., Turk M.A., Abu-Zaitoon Y.M., Aladaileh H.S., Al-Rawashdeh I.M., Alnaimat S., Razzaq A., Al-Tawaha M., Alu'datt M.H., Wedyan M. Plants adaptation to drought environment. *Bulg. J. Agricult. Sci.* 2017. 23 (3): 381-388.
32. An Z., Jing W., Liu Y., Zhang W. Hydrogen peroxide generated by copper amine oxidase is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *J. Exp. Bot.* 2008. 59 (4): 815-825.
33. Andronis E.A., Moschou P.N., Toumi I., Roubelakis-Angelakis K.A. Roubelakis-angelakis, peroxisomal polyamine oxidase and NADPH-oxidase cross-talk for ROS homeostasis which affects respiration rate in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* 2014. 5: 132.
34. Arnao, M.B. & Hernandez-Ruiz, J. Functions of melatonin in plants: a review. *J. Pineal Res.*, 2015. 59, pp. 133-150.
35. Aroca A, Gotor C, Bassham DC, Romero LC () Hydrogen sulfide: from a toxic molecule to a key molecule of cell life. *Antioxidants (Basel)*. 2020. 9(7):621.
36. Ashraf, M. A., Akbar, A., Askari, S.H., Iqbal, M., Rasheed, R., & Hussain, I. Recent advances in abiotic stress tolerance of plants through chemical priming: an overview. In *Advances in Seed Priming* . Singapore: Springer, 2018. pp 51–79.
37. Bahrani H., Thoms K., Baga M., Larsen J., Graf R., Laroche A., Sammynaiken R., Chibbar R.N. Preferential accumulation of glycosylated cyanidins in winter-hardy rye (*Secale cereale* L.) genotypes during cold acclimation. *Environ. Exp. Bot.* 2019. 164: 203-212.
38. Bai, X., Chen, J., Kong, X., Todd, C. D., Yang, Y., Hu, X., & Li, D.Z. Carbon monoxide enhances the chilling tolerance of recalcitrant *Baccaurea ramiflora* seeds via nitric oxide-mediated glutathione homeostasis. *Free Radical Biol. Med.*, 2012. 53, 710–720.
39. Bartoli, C. G., Casalongueb, C. A., Simontacchia, M., Marquez-Garcia, B., & Foyer, C. H. Interactions between hormone and redox signalling pathways in the control of growth and cross tolerance to stress. *Environ. Exp. Bot.*, 2013. 94, 73–88.
40. Bates L.S., Walden R.P., Tear G.D. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil.*, 1973. 39: 205-210.
41. Bhuyan MHMB, Hasanuzzaman M, Parvin K, Mohsin SM, Mahmud JA, Nahar K, Fujita M Nitric oxide and hydrogen sulfide: two intimate collaborators regulating plant defense against abiotic stress. *Plant Growth Regul.* 2020. 90:409–424.
42. Bian L., Wang Y., Bai H., Li H., Zhang C., Chen J., Xu W. Melatonin-ROS signal module regulates plant lateral root development. *Plant Signal. Behav.* 2021. 16, № 5. Art. 1901447.
43. Bouchereau A., Aziz A., Larher F., Martin-Tanguy J. Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci.*, 1999. 140 (2): 103-125.
44. Carvalho K., Campos M.K., Domingues D.S., Pereira L.F., Vieira L.G. The accumulation of endogenous proline induces changes in gene expression of several antioxidant enzymes in leaves of transgenic Swingle citrumelo. *Mol. Biol. Rep.* 2013. 40: 3269-3279.
45. Chaki M., Valderrama R., Fernandez-Ocana A.M. et al. Protein targets of tyrosine nitration in sunflower (*Helianthus annuus* L.) hypocotyls. *Ibid.* 2009. 60. P. 4221–4236.

46. Chang J., Guo Y., Li J., Su Z., Wang C., Zhang R., Wei C., Ma J., Zhang X., Li H. Positive interaction between H₂O₂ and Ca²⁺ mediates melatonin-induced CBF pathway and cold tolerance in watermelon (*Citrullus lanatus* L.). *Antioxidants*. 2021. 10. № 9. Art. 1457.
47. Chen X, Chen Q, Zhang X, Li R, Jia Y, Ef AA, Jia A, Hu L, Hu X. Hydrogen sulfide mediates nicotine biosynthesis in tobacco (*Nicotiana tabacum*) under high temperature conditions. *Plant Physiol Biochem*. 2016. 104:174–179.
48. Chen, Q., Gong, C., Ju, X., Zhu, Z., Shen, W., Shen, Z., & Cui, J. Hemin through the heme oxygenase 1/ferrous iron, carbon monoxide system involved in zinc tolerance in *Oryza Sativa* L. *J. Plant Growth Regul.*, 2018. 37, 947–957.
49. Cheng D.-G., Kao C.-H. Effects of exogenous spermine on polyethylene glycol-induced responses in rice leaves. *Crop Environ. Bioinform.* 2010. 7: 233- 242.
50. Cheng, T., Hu, L., Wang, P., Yang, X., Peng, Y., Lu, Y., ... Shi, J. Carbon monoxide potentiates high temperature-induced nicotine biosynthesis in tobacco. *Int J Mol Sci.*, 2018. 19, 188.
51. Christie P.J., Alfenito M.R., Walbot V. Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta*. 1994. 194. P. 541—549.
52. Christou A., Filippou P., Manganaris G., Fotopoulos V. Sodium hydrosulfide induces systemic thermotolerance to strawberry plants through transcriptional regulation of heat shock proteins and aquaporin. *BMC Plant Biol*. 2014. 14:42.
53. Corpas FJ, Barroso JB, González-Gordo S, Muñoz-Vargas MA, Palma JM. Hydrogen sulfide (H₂S): a novel component in Arabidopsis peroxisomes which triggers catalase inhibition. *J Integr Plant Biol*. 2019. 61:871–883.
54. Corpas FJ, Palma JM. H₂S signaling in plants and applications in agriculture. *J Adv Res*. 2020. 24:131–137.
55. Czerniewicz P., Sytykiewicz H., Durak R., Borowiak-Sobkowiak B., Chrzanowski G. Role of phenolic compounds during antioxidative responses of winter ritalce to aphid and beetle attack. *Plant Physiol. Biochem*. 2017. 118. P. 529—540.
56. da Silva L.A.L., Pezzini B.R., Soares L. Spectrophotometric determination of the total flavonoid content in *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) leaves. *Pharmacogn. Mag*. 2015. 11 (41). P. 96—101.
57. Dar OI, Singh K, Aslam J, Sharma S, Kaur A, Bhardwaj R, Sharma A. Regulation of salinity stress by hydrogen sulfide in plants. In: Singh S, Singh VP, Tripathi DK (eds), *Hydrogen Sulfide in Plant Biology*. Elsevier Inc, 2021. pp. 213–227.
58. Dawood M.F.A., Abeed A.H.A. Sperminepriming restrained water relations and biochemical deteriorations prompted by water deficit on two soybean cultivars. *Heliyon*. 2020. 6: e04038.
59. de Carvalho M.H.C. Drought stress and reactive oxygen species. Production, scavenging and signaling. *Plant Signal. Behav*. 2008. 3: 156-165.
60. Dietz K.-J., Zorb C., Geilfus C.-M. Drought and crop yield. *Plant Biol*. 2021.
61. Dubbels, R., Reiter, R.J., Klenke, E., Goebel, A., Schnakenberg, E., Ehlers, C., Schiwara, H.W. & Schloot, W. Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Pineal Res.*, 1995. 18, pp. 28-31.
62. Fan, J., Xie, Y., Zhang, Z. & Chen, L. (2018). Melatonin: a multifunctional factor in plants. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018. 19, pp. 1528.

63. Fares A., Rossignol M., Peltier J.B. Proteomics investigation of endogenous S-nitrosylation in Arabidopsis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011. V. 416 P. 331–338.
64. Farooq M., Wahid A., Lee D.-J. Exogenously applied polyamines increase drought tolerance of rice by improving leaf water status, photosynthesis and membrane properties. *Acta Physiol. Plant.* 2009. 31: 937- 945.
65. Fazlieva, E. R., Kiseleva, I. S., & Zhuikova, T. V. Antioxidant activity in the leaves of *Melilotus albus* and *Trifolium medium* from man-made disturbed habitats in the Middle Urals under the influence of copper. *Russ J Plant Physiol*, 2012. 59, 333–338.
66. Filipovic MR, Zivanovic J, Alvarez B, Banerjee R Chemical biology of H₂S signaling through persulfidation. *Chem Rev.* 2018. 118(3):1253–1337.
67. Folli-Pereira, M. S., Ramos, A. C., Bertolazi, A. A., Passamani, L. Z., Eutrópio, F. J., Conceição, J. M., Rasool, N. . Water stress and higher plants: An overview. In: *Water Stress and Crop Plants: A Sustainable Approach, First Edition*. Ed. Parvaiz Ahmad., 2016. 422 – 451.
68. Ghosh N., Das S.P., Mandal C., Gupta S., Das K., Dey N., Adak M.K. Variations of antioxidative responses in two rice cultivars with polyamine treatment under salinity stress. *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 2012. 18 (4): 301-313.
69. Gill S.S., Tuteja N. Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signal. Behav.* 2010. 5: 26-33.
70. Gill, S. S., & Tuteja, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.*, 2010. 48, 909–930.
71. Gong B., Yan Y., Wen D., Shi Q. Hydrogen peroxide produced by NADPH oxidase: a novel downstream signaling pathway in melatonin-induced stress tolerance in *Solanum lycopersicum*. *Physiol. Plant.* 2017. 160. № 4. P. 396–409.
72. Groppa, M. D., Benavides, M. P. Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids.*, 2008. 34(1), 35–45.
73. Gruhlke MC. Reactive sulfur species a new player in plant physiology? In: Hasanuzzaman M, Fotopoulos V, Nahar K, Fujita M (eds), *Reactive Oxygen, Nitrogen and Sulfur Species in Plants: Production, Metabolism, Signaling and Defense Mechanisms*, vol 2. John Wiley & Sons Ltd. 2019. pp. 715–728.
74. Gupta K., Dey A., Gupta B. Plant polyamines in abiotic stress responses. *Acta Physiol. Plant*, 2013. 35: 2015-2036.
75. Gupta S., Agarwal V.P., Gupta N.K. Efficacy of putrescine and benzyladenine on photosynthesis and productivity in relation to drought tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 2012. 18: 331-336.
76. Gupta, K., Dey, A., Gupta, B. Plant polyamines in abiotic stress responses. *Acta Physiol. Plant.* 2013. 35, 2015–2036.
77. Hancock JT, Neill SJ (2019) Nitric oxide: its generation and interactions with other reactive signaling compounds. *Plants.* 2019. 8:41.
78. Havaux M., Kloppstech K. The protective functions of carotenoid and flavonoids pigments against excess visible radiation at chilling temperature investigated in *Arabidopsis npq* and *tt* mutants. *Planta.* 2001. 213. P. 953–966.
79. He, H., & He, L. The role of carbon monoxide signaling in the responses of plants to abiotic stresses. *Nitric Oxide*, 2014. 42, 40–43.
80. Iqbal N, Fatma M, Gautam H, Umar S, Sofo A, D'ippolito I, Khan NA The crosstalk of melatonin and hydrogen sulfide determines

photosynthetic performance by regulation of carbohydrate metabolism in wheat under heat stress. *Plants*. 2021. 10:1778.

81. Karpets YuV, Kolupaev YuE, Shkliarevskiy MA Functional interaction of hydrogen sulfide with nitric oxide, calcium, and reactive oxygen species under abiotic stress in plants. In: Khan MN, Siddiqui MH, Alamri S, Corpas FJ. (eds) *Hydrogen Sulfide and Plant Acclimation to Abiotic Stresses*. *Plant in Challenging Environments*, vol 1. Springer, Cham, 2021. pp. 31–57.
82. Karpets YuV, Kolupaev YuE, Yastreb T.O, Oboznyi A.I. Effects of NO-status modification, heat hardening, and hydrogen peroxide on the activity of antioxidant enzymes in wheat seedlings. *Russ J Plant Physiol*. 2015. 62(3):292–298.
83. Karpets YuV, Shkliarevskiy MA, Horielova EI, Kolupaev YuE. Participation of hydrogen sulfide in induction of antioxidant system in roots of wheat plantlets and their heat resistance by salicylic acid. *Appl Biochem Microbiol*. 2020. 56(4):467–472.
84. Kaur-Sawhney R., Tiburcio A. F., Altabella T., Galston A.W. Polyamines in plants: An overview. *J. Cell Mol. Biol.*, 2003. 2: 1-12.
85. Khan MN, Mobin M, Abbas ZK. Nitric oxide and high temperature stress: a physiological perspective. In: Khan MN, Mobin M, Mohammad F, Corpas FJ (eds) *Nitric oxide action in abiotic stress responses in plants*. Heidelberg, New York, Dordrecht, London, 2015. pp 77–94.
86. Khlestkina E.K. The adaptive role of flavonoids: emphasis on cereals. *Cereal Res. Commun*. 2013. 41. P. 185—198.
87. Kholodova V.P., Bormotova T.S., Semenov O.G., Dmitrieva G.A., Kuznetsov I.V. Physiological mechanisms of adaptation of alloplasmic wheat hybrids to soil drought. *Russ. J. Plant Physiol*. 2007. 54: 480-486.
88. Kolupaev Y.E., Karpets Y.V., Kabashnikova L.F. Antioxidative system of plants: cellular compartmentalization, protective and signaling functions, mechanisms of regulation (Review). *Appl. Biochem. Microbiol*. 2019. 55 (5): 441-459.
89. Kolupaev Y.E., Karpets Y.V., Yastreb T.O., Firsova E.N. Protective effect of inhibitors of succinate dehydrogenase on wheat seedlings during osmotic stress. *Appl. Biochem. Microbiol*. 2017. 53 (5): 353-358.
90. Kolupaev Y.E., Ryabchun N.I., Vayner A.A., Yastreb T.O. Oboznyi A.I. Antioxidant enzyme activity and osmolyte content in winter cereal seedlings under hardening and cryostress. *Russ. J. Plant Physiol*. 2015. 62 (4): 499-506.
91. Kolupaev Y.E., Yastreb T.O., Oboznyi A.I. Ryabchun N.I., Kirichenko V.V. Constitutive and cold-induced resistance of rye and wheat seedlings to oxidative stress. *Russ. J. Plant Physiol*. 2016. 63 (4): 326-337.
92. Kolupaev YE, Oboznyi AI, Shvidenko NV Role of hydrogen peroxide in generation of a signal inducing heat tolerance of wheat seedlings. *Russ J Plant Physiol*. 2013. 60(2):227–234.
93. Kolupaev Yu.E., Horielova E.I., Yastreb T.O., Popov Yu.V., Ryabchun N.I. Phenylalanine ammonia-lyase activity and content of flavonoid compounds in wheat seedlings at the action of hypothermia and hydrogen sulfide donor. *Ukr. Biochem. J*. 2018. 90 (6). P. 12—20.
94. Kolupaev Yu.E., Horielova E.I., Yastreb T.O., Ryabchun N.I. State of antioxidant system in triticale seedlings at cold hardening of varieties of different frost resistance. *Cereal Res. Commun*. 2020. 48 (2). P. 165—171.
95. Kolupaev Yu.E., Karpets Yu.V., Dmitriev A.P. Signal mediators in plants in response to abiotic stress: Calcium, reactive oxygen and nitrogen species. *Cytol. Genet*. 2015. 49. P. 338—348.

96. Kolupaev Yu.E., Karpets Yu.V., Kabashnikova L.F. Antioxidative system of plants: cellular compartmentation, protective and signaling functions, mechanisms of regulation (Review). *Appl. Biochem. Microbiol.* 2019. 55 (5). P. 441—459.
97. Kolupaev Yu.E., Kokorev A.I., Yastreb T.O., Horielova E.I. Hydrogen peroxide as a signal mediator at inducing heat resistance in wheat seedlings by putrescine. *Ukr. Biochem. J.* 2019. 91 (6): 103- 111.
98. Kolupaev YuE, Firsova EN, Yastreb TO, Lugovaya AA. The participation of calcium ions and reactive oxygen species in the induction of antioxidant enzymes and heat resistance in plant cells by hydrogen sulfide donor. *Appl Biochem Microbiol.* 2017. 53(5):573–579.
99. Kolupaev YuE, Firsova EN, Yastreb TO, Ryabchun NI, Kirichenko VV Effect of hydrogen sulfide donor on antioxidant state of wheat plants and their resistance to soil drought. *Russ J Plant Physiol.* 2019. 66(1):59–66.
100. Kolupaev YuE, Firsova EN, Yastreb TO Induction of plant cells heat resistance by hydrogen sulfide donor is mediated by H₂O₂ generation with participation of NADPH oxidase and superoxide dismutase. *Ukr Biochem J.* 2017. 89(4):34–42.
101. Kolupaev, Yu. E., Karpets, Yu. V., Beschasniy, S. P., & Dmitriev, A. P. Gasotransmitters and their role in adaptive reactions of plant cells. *Cytol. Genet.*, 2019. 53(5), 392–406.
102. Kuznetsov, Vl. V., Shevyakova, N. I. Polyamines and plant adaptation to saline environment. In: K.B. Ramawat (Eds.), *Desert Plants. Biology and Biotechnology*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2011. pp. 261-297.
103. Kwak, J. M., Nguyen, V., & Schroeder, J. I. The role of reactive oxygen species in hormonal responses. *Plant Physiol.*, 2006. 141, 323–329.
104. Lawlor D.W., Tezara W. Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. *Ann. Bot.* 2009. 103: 561-579.
105. Legocka S-N.E. Plastid-associated polyamines: their role in differentiation, structure, functioning, stress response and senescence. *Plant Biol (Stuttg)*. 2014. Vol. 16: 297-305.
106. Lei K., Sun S., Zhong K., Li S., Hu H., Sun C., Zheng Q., Tian Z., Dai T., Sun J. (). Seed soaking with melatonin promotes seed germination under chromium stress via enhancing reserve mobilization and antioxidant metabolism in wheat. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2021. 220. Art. 112241.
107. Li B, Gao K, Ren H, Tang W. Molecular mechanisms governing plant responses to high temperatures. *J Integr Plant Biol.* 2018. 60:757–779.
108. Li H, Li M, Wei X, Zhang X, Xue R, Zhao Y, Zhao H Transcriptome analysis of drought-responsive genes regulated by hydrogen sulfide in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Mol Genet Genom.* 2017. 292(5):1091–1110.
109. Li Z., Zhang Y., Zhang X., Peng Y., Merewitz E., Ma X., Linkai H., Yanhong Y. The alterations of endogenous polyamines and phytohormones induced by exogenous application of spermidine regulate antioxidant metabolism, metallothionein and relevant genes conferring drought tolerance in white clover. *Environ. Exp. Bot.* 2016. 124: 22-38.
110. Li ZG, Gong M, Liu P. Hydrogen sulfide is a mediator in H₂O₂-induced seed germination in *Jatropha curcas*. *Acta Physiol Plant.* 2012. 34(6):2207–2213.

111. Li ZG, Long WB, Yang SZ, Wang YC, Tang JH, Chen T. Involvement of sulfhydryl compounds and antioxidant enzymes in H₂S-induced heat tolerance in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) suspension-cultured cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*. 2015. 51:428–437.
112. Li ZG, Luo LJ, Zhu LP. Involvement of trehalose in hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide-induced the acquisition of heat tolerance in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Botanical Studies*. 2014. 55:20.
113. Li ZG, Yang SZ, Long WB, Yang GX, Shen ZZ. Hydrogen sulfide may be a novel downstream signal molecule in nitric oxide-induced heat tolerance of maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Plant Cell Environ*. 2013. 36 (8):1564–1572.
114. Li, Z.-G., & Gu, S.-P. Hydrogen sulfide as a signal molecule in hematin-induced heat tolerance of tobacco cell suspension. *Biol. Plant.*, 2016. 60, 595–600.
115. Liang X., Zhang L., Natarajan S.K., Becker D.F. Proline mechanisms of stress survival. *Antioxid. Redox Signal*. 2013. 19. 998-1011.
116. Lin C.C., Jih P.J., Lin H.H., Lin J.S., Chang L.L., Shen Y.H., Jeng S.T. Nitric oxide activates superoxide dismutase and ascorbate peroxidase to repress the cell death induced by wounding. *Plant Mol. Biol*. 2011. V. 77. P. 235–249.
117. Ling, T., Zhang, B., Cui, W., Wu, M., Lin, J., Zhou, W., ... Shen, W. Carbon monoxide mitigates salt-induced inhibition of root growth and suppresses programmed cell death in wheat primary roots by inhibiting superoxide anion overproduction. *Plant Sci.*, 2009. 177(4), 331–340.
118. Liu H, Wang J, Liu J, Liu T, Xue S. (). Hydrogen sulfide (H₂S) signaling in plant development and stress responses. *aBIOTECH* 2021. 2:32–63.
119. Liu K., Fu H., Bei Q., Luan S. Inward potassium channel in guard cells as a target for polyamine regulation of stomatal movements. *Plant Physiol*. 2000. 124 (3): 1315-1326.
120. Liu, Y., Xu, S., Ling, T., Xu, L., & Shen, W. Heme oxygenase/carbon monoxide system participates in regulating wheat seed germination under osmotic stress involving the nitric oxide pathway. *J. Plant Physiol.*, 2010. 167(16), 1371–1379.
121. Lozano-Juste J., Leon J. Nitric oxide regulates DELLA content and PIF expression to promote photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 2011. 156. P. 1410–1423.
122. Marthandan V., Geetha R., Kumutha K., Renganathan V. G., Karthikeyan A., Ramalingam J. Seed priming: A feasible strategy to enhance drought tolerance in crop plants. *Int. J. Mol. Sci*. 2020. 21 (21): 8258.
123. Melekhov, E. I., & Efremova, L. K. Effect of phytohormones on plant cell stability to heating and to 2,4-D treatments. *Fiziologiya Rastenii*, 1990. 37(3), 561–568.
124. Mellidou I., Karamanoli K., Beris D., Haralampidis K., Constantinidou H.A., Roubelakis-Angelakis K.A. Underexpression of apoplastic polyamine oxidase improves thermotolerance in *Nicotiana tabacum*. *J. Plant Physiol*. 2017. 218: 171-174.
125. Meng, D. K., Chen, J., & Yang, Z. M. Enhancement of tolerance of Indian mustard (*Brassica juncea*) to mercury by carbon monoxide. *J. Hazardous Materials.*, 2011. 186(2-3), 1823–1829.

126. Minibayeva, E. V., Gordon, L. K., Kolesnikov, O. P., & Chasov, A. V. Role of extracellular peroxidase in the superoxide production by wheat root cells. *Protoplasma*, 2001. 217, 125–128.
127. Mohamed S.A., Ahmed H.S., El-Baowab A.A. Effect of chitosan, putrescine and irrigation levels on the drought tolerance of sour orange seedlings. *Egypt. J. Hort.* 2018. 45 (2): 257-273.
128. Monteiro J.G., Cruz F.J.R., Nardin M.B., Santos D.M.M. Growth and proline content in pigeon pea seedlings subjected to osmotic stress and to exogenous putrescine. *Pesq. Agropec. Bras., Brasilia*. 2014. 49 (1): 18-25.
129. Mostofa M.G., Yoshida N., Fujita M. Spermidine pretreatment enhances heat tolerance in rice seedlings through modulating antioxidative and glyoxalase systems. *Plant Growth Regul.* 2014. 73 (1): 31-44.
130. Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 1981. 22. P. 867–880.
131. Ndayiragije A., Lutts S. Long term exogenous putrescine application improves grain yield of a saltsensitive rice cultivar exposed to NaCl. *Plant Soil*. 2007. 291: 225-238.
132. Neill S.O., Gould K.S. Anthocyanins in leaves: light attenuators or antioxidants? *Functional Plant Biol.* 2003. 30. P. 865—873.
133. Nogues S., Baker N.R. Effects of drought on photosynthesis in Mediterranean plants grown under UV-B radiation. *J. Exp. Bot.* 2000. 51: 1309-1317.
134. Olenichenko N.A., Zagorskina N.V., Astakhova N.V., Trunova T.I., Kuznetsov Yu.V. Primary and secondary metabolism of winter wheat under cold hardening and treatment with antioxidants. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2008. 44 (5). P. 535—540.
135. Ostrowska A., Tyrka M., Dziurka M., Hura K., Hura T. Participation of wheat and rye genome in drought induced senescence in winter triticale (X *Triticosecale* Wittm.). *Agronomy*. 2019. 9: 195.
136. Pal M., Szalai G., Janda T. Speculation: Polyamines are important in abiotic stress signaling. *Plant Sci.* 2015. 237: 16-23.
137. Pietrini F., Massacci A. Leaf anthocyanin content changes in *Zea mays* L. grown at low temperature: significance for the relationship between the quantum yield of PS II and the apparent quantum yield of CO₂ assimilation. *Photosynthesis Res.* 1998. 58. P. 213—219.
138. Prabhavathi V.R., Rajam V.R. Polyamine accumulation in transgenic eggplant enhances tolerance to multiple abiotic stresses and fungal resistance. *Plant Biotechnol.* 2007. 24 (3): 273-282.
139. Riasat M., Kiani S., Saed-Moucheshi A., Pesarakli M. Oxidant related biochemical traits are significant indices in triticale grain yield under drought stress condition. *J. Plant Nutr.* 2019. 42 (2): 111-126.
140. Roychoudhury A., Basu S., Sengupta D.N. Amelioration of salinity stress by exogenously applied spermidine or spermine in three varieties of Indica rice differing in their level of salt tolerance. *J. Plant Physiol.* 2011. 168: 317-328.
141. Saed-Moucheshi A., Razi H., Dadkhodaie A., Ghodsi M., Dastfal M. Association of biochemical traits with grain yield in triticale genotypes under normal irrigation and drought stress conditions. *Austral. J. Crop Sci.* 2019. 13 (2): 272-281.

142. Saed-Moucheshi A., Sohrabi F., Fasihfar E., Baniasadi F., Riasat M., Mozafari A.A. Superoxide dismutase (SOD) as a selection criterion for triticale grain yield under drought stress: a comprehensive study on genomics and expression profiling, bioinformatics, heritability, and phenotypic variability. *BMC Plant Biol.* 2021. 21 (1): 148.
143. Sagisaka S. The occurrence of peroxide in a perennial plant, *Populus gelrica*. *Plant Physiol.* 1976. 57, № 2. P. 308–309.
144. Saha J., Brauer E.K., Sengupta A., Popescu S.C., Gupta K., Gupta B. Polyamines as redox homeostasis regulators during salt stress in plants. *Front. Environ. Sci.* 2015. 3: 21.
145. Scaramagli S., Biondi S., LeoneAntonella, GrilloS., Torrigiani P. Acclimation to low water potential in potato cell suspension cultures leads to changes in putrescine metabolism. *Plant Physiol. Biochem.* 2000. 38 (4): 345-351.
146. Shekhawat, G. S., & Verma, K. Haem oxygenase (HO): an overlooked enzyme of plant metabolism and defence. *J. Exp. Bot.*, 2010. 61(9), 2255–2270.
147. Shi H, Ye T, Chan Z. Exogenous application of hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide enhanced multiple abiotic stress tolerance in bermudagrass (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.). *Plant Physiol Biochem.* 2013. 71:226–234.
148. Shi H, Ye T, Han N, Bian H, Liu X, Chan Z. (2015). Hydrogen sulfide regulates abiotic stress tolerance and biotic stress resistance in *Arabidopsis*. *J Integr Plant Biol.* 2015. 57(7):628–640.
149. Shi J., Fu X.-Z., Peng T., Huang X.-S., Fan Q.-J., Liu J.- H. Spermine pretreatment confers dehydration tolerance of citrus in vitro plants via modulation of antioxidative capacity and stomatal response. *Tree Physiol.* 2010. 30 (7): 914-922.
150. Shichijo C., Hamada T., Hiraoka M., Johnson C.B., Hashimoto T. Enhancement of redlight-induced anthocyanin synthesis in sorghum first internodes by moderate low temperature given in the pre-irradiation culture period. *Planta.* 1993. 191. P. 238—245.
151. Shivaraj SM, Vats S, Bhat JA, Dhakte P, Goyal V, Khatri P, Kumawat S, Singh A, Prasad M, Sonah H, Sharma TR, Deshmukh R. Nitric oxide and hydrogen sulfide crosstalk during heavy metal stress in plants. *Physiol Plant.* 2020. 168(2):437–455.
152. Singh A., Roychoudhury A. Hydrogen sulfide and redox homeostasis for alleviation of heavy metal stress. In: Khan MN, Siddiqui MH, Alamri S, Corpas FJ. (eds), *Hydrogen Sulfide and Plant Acclimation to Abiotic Stresses, Plant in Challenging Environments*, vol 1. Springer, Cham, 2021. pp. 59–72.
153. Singh S, Kumar V, Kapoor D, Kumar S, Singh S, Dhanjal DS, Datta S, Samuel J, Dey P, Wang S, Prasad R, Singh J. Revealing on hydrogen sulfide and nitric oxide signals co-ordination for plant growth under stress conditions. *Physiol Plant.* 2020. 168(2):301–317.
154. Skrypnik L., Maslennikov P., Novikova A., Kozhikin M. Effect of crude oil on growth, oxidative stress and response of antioxidative system of two rye (*Secale cereale* L.) varieties. *Plants.* 2021. 10: 157.
155. Skyrka E., Szwarc W. Influence of UV-B radiation on young triticale plants with different wax cover. *Biol. Plant.* 2007. 51 (1). P. 189—192.
156. Soshinkova T.N., Radyukina N.L., Korolkova D.V., Nosov, A.V. Proline and functioning of the antioxidant system in *Thellungiella salsuginea* plants and cultured cells subjected to oxidative stress. *Russ. J. Plant Physiol.* 2013. 60 (1): 41-54.

157. Szalai G., Janda K., Darkó E., Janda T., Peeva V., Pál M. Comparative analysis of polyamine metabolism in wheat and maize plants. *Plant Physiol. Biochem.* 2017. 112: 239-250.
158. Talaat N.B. 24-Epibrassinolide and spermine combined treatment sustains maize (*Zea mays* L.) drought tolerance by improving photosynthetic efficiency and altering phytohormones profile. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition.* 2020. 20: 516-529.
159. Tun N.N., Santa-Catarina C., Begum T., Silveira V., Handro W., Floh E.I., Scherer G.F. Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell Physiol.* 2006. 47 (3): 346-354.
160. Verma, K., Dixit, S., Shekhawat, G. S., & Alam, A. Antioxidant activity of heme oxygenase 1 in *Brassica juncea* (L.) Czern. (Indian mustard) under salt stress. *Turk. J. Biol.*, 2015. 39, 540–549.
161. Vital S.A., Fowler R.W., Virgen A., Gossett D.R., Banks S.W., Rodriguez J. Opposing roles for superoxide and nitric oxide in the NaCl stress-induced upregulation of antioxidant enzyme activity in cotton callus tissue. *Environ. Exp. Bot.* 2008. V. 62. P. 60–68.
162. Wang, M., & Liao, W. Carbon monoxide as a signaling molecule in plants. *Front. Plant Sci.*, 2016. 7, 572.
163. Wang, W., Wang, X., Huang, M., Cai, J., Zhou, Q., Dai, T., ... Jiang D. Hydrogen peroxide and abscisic acid mediate salicylic acid-induced freezing tolerance in wheat. *Front. Plant Sci.*, 2018. 3(9), 1137.
164. Wimalasekera R., Tebartz F., Scherer G.F. Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses. *Plant Sci.* 2011. 181 (5): 593-603.
165. Xuan, W., Huang, L., Li, M., Huang, B., Xu, S., Liu, H., ... Shen, W. Induction of growth elongation in wheat root segments by heme molecules: a regulatory role of carbon monoxide in plants? *Plant Growth Regul.*, 2007. 52(1), 41–51.
166. Yang B., Wu J., Gao F., Wang J., Su G. Polyamine-induced nitric oxide generation and its potential requirement for peroxide in suspension cells of soybean cotyledon node callus. *Plant Physiol. Biochem.* 2014. 79: 41-47.
167. Yao, Y., Yang, Y., Li, C., Huang, D., Zhang, J., Wang, C., ... Liao, W. . Research progress on the functions of gasotransmitters in plant responses to abiotic stresses. *Plants (Basel)*, 2019. 8(12), 605.
168. Yu, Y., Lv, Y., Shi, Y., Li, T., Chen, Y., Zhao, D. & Zhao, Z. The role of phyto-melatonin and related metabolites in response to stress. *Molecules*, 2018. 23, No. 8, p. 1887.
169. Zhang, C., Li, Y., Yuan, F., Hu, S., & He, P. Effects of hematin and carbon monoxide on the salinity stress responses of *Cassia obtusifolia* L. seeds and seedlings. *Plant Soil*, 2012. 359, 85–105.
170. Zhao K., Fan H., Zhou S., Song J. Study on the salt and drought tolerance of *Suaeda salsa* and *Kalanchoe clairgremontiana* under isoosmotic salt and water stress. *Plant Sci.*, 2003. 165 (4): 837-844.
171. Ziogas V, Molassiotis A, Fotopoulos V, Tanou G. (). Hydrogen sulfide: A potent tool in postharvest fruit biology and possible mechanism of action. *Front Plant Sci.*, 2018. 9:1375.
172. Zouari M., Hassena A.B., Trabelsi L., Rouina B.B., Decou R., Labrousse P. (). Exogenous prolinemediated abiotic stress tolerance

in plants: possible mechanisms. In: *Osmoprotectant-Mediated Abiotic Stress Tolerance in Plants*. Springer. Eds.: Hossain M., Kumar V., Burritt D., Fujita M., Mäkelä P. Cham., 2019. pp. 99-121.