

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМ. В.В. ДОКУЧАЄВА
ІНСТИТУТ БОТАНІКИ ІМ. М.Г. ХОЛОДНОГО НАН УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ГОРЄЛОВА ОЛЕНА ІВАНІВНА

УДК 581.1

ДИСЕРТАЦІЯ


**АНТИОКСИДАНТНА І ОСМОПРОТЕКТОРНА СИСТЕМИ ЗЛАКІВ ПРИ
АДАПТАЦІЇ ДО ГІПОТЕРМІЇ**

091. Біологія

09 Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

 О.І. Горелова

Науковий керівник:

Колупаєв Юрій Євгенович, доктор біологічних наук, професор

Київ – 2021

Всі примірники ідентичні 

АНОТАЦІЯ

Горєлова О.І. Антиоксидантна та осмопротекторна системи злаків при адаптації до гіпотермії. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія». – Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, Київ, 2021.

Дисертаційна робота присвячена вивченню участі компонентів антиоксидантної та осмопротекторної систем у жита, пшениці і тритикале в їх адаптації до низьких температур та дослідженню індукування цих систем дією газотрансмітерів оксиду азоту (NO) і сірководню (H₂S) та фітогормону саліцилової кислоти.

У роботі показано зміни у функціонуванні антиоксидантної та осмопротекторної систем при низькотемпературному загартуванні зернових злаків, що вказує на їх значення в адаптації до гіпотермії; встановлено видові та сортові особливості функціонування цих систем і показано можливість їх індукування та підвищення морозостійкості рослин шляхом застосування донорів NO і H₂S та фітогормону саліцилової кислоти.

Основними експериментальними об'єктами слугували етіюльовані проростки пшениці м'якої (*Triticum aestivum* L., сорт Досконала, озимий, морозостійкий), жита посівного (*Secale cereale* L., сорт Пам'ять Худоєрка, озимий, морозостійкий), тритикале (× *Triticosecale* Wittmack, озимі морозостійкі сорти Раритет, Букет та неморозостійкі сорти «дворучки» – Олександра і Підзимок харківський). Загартування проростків проводили протягом 6-7 діб за температури 2–4°C. Також загартовані та незагартовані проростки піддавали проморожуванню за температур діапазону від -5 до -9°C і визначали їх виживаність.

У серії експериментів з дослідження впливу донора сірководню на стійкість проростків до від'ємних температур гідросульфід натрію (NaHS) в концентраціях

діапазону 0,025–1 мМ додавали в середовище на початку пророщування насіння і на третю добу.

В експериментах з оцінки впливу NO на стійкість до від'ємних температур проводили праймування насіння донором NO шляхом занурення в розчин нітропрусида натрію ($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$, НПН) в концентраціях діапазону 50–200 мкМ. В серіях дослідів з комбінованого впливу саліцилової кислоти та НПН насіння досліджуваних варіантів занурювали в розчин, що містив 10 мкМ саліцилової кислоти та 100 мкМ НПН.

У незагартованих і загартованих проростках злаків визначали активність антиоксидантних ферментів супероксиддисмутази (СОД), каталази і пероксидази, активність фенілаланінамонійліази, вміст флавоноїдних сполук, цукрів і проліну. Рівень окиснювальних пошкоджень оцінювали за вмістом у проростках продукту пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) малонового діальдегіду (МДА).

В роботі проведено порівняння показників функціонування антиоксидантної та осмопротекторної систем етіюльованих проростків озимих жита, тритикале і пшениці у фізіологічно нормальних умовах і після холодового загартування. Активність СОД і каталази за нормальних умов у трьох видів злаків істотно не відрізнялася. Водночас активність пероксидази у жита була набагато вищою, ніж у пшениці й тритикале. Загартування спричиняло значне підвищення активності СОД у пшениці та менш істотне у проростків жита і тритикале. Активність пероксидази після загартування підвищувалася в усіх досліджуваних злаків. Вміст цукрів у незагартованих проростків жита і тритикале істотно перевищував такий у пшениці. Після загартування він пропорційно підвищувався у всіх трьох злаків. Базовий вміст проліну у жита був значно вищим, ніж у пшениці та тритикале. Загартування викликало істотне підвищення вмісту проліну у жита і менш помітне в інших видів злаків. Найбільший вміст антоціанів спостерігався у жита, а найменший у пшениці. Після загартування кількість антоціанів підвищувалася в усіх досліджуваних злаків. Вміст безбарвних флавоноїдів, що поглинають в області УФ В, за фізіологічно нормальних умов і після загартування у жита і тритикале був вищим, ніж у пшениці. Таким чином, в

адаптацію жита до гіпотермії більший внесок роблять високі активність пероксидази та вміст проліну, а тритикале – високий вміст флавоноїдів і цукрів. Водночас у пшениці після загартування більш істотно змінювалася активність антиоксидантних ферментів СОД і каталази.

В серіях експериментів з різними сортами тритикале встановлено зв'язок між морозостійкістю та станом антиоксидантної системи. Показано, що після холодого загартування проростків тритикале різних сортів в них відбувалося зниження вмісту малонового діальдегіду (МДА), що опосередковано вказує на активацію антиоксидантної системи. Водночас ефект зростання вмісту МДА після проморожування був характерним для проростків неморозостійких сортів тритикале, а у стійких сортів зміни вмісту МДА після кріостресу були незначними. Це свідчить про важливу роль окиснювального стресу у розвитку пошкоджень, спричинюваних дією холоду.

Після загартування проростків при 2–4°C протягом 6 діб у морозостійких сортів тритикале Букет і Раритет активності СОД і каталази підвищувалися, а у менш стійких – Олександра і Підзимок харківський – змінювалися менш істотно. Водночас у цих сортів більш помітно зростала активність пероксидази.

У загартованих проростків сортів Букет, Раритет і Олександра вміст цукрів був значно вищим, ніж у сорту Підзимок харківський. Вміст проліну у відповідь на загартування підвищувався в усіх сортів, при цьому абсолютні значення у сортів Букет, Раритет і Підзимок харківський були вищими, ніж у сорту Олександра. Шестидобове загартування спричиняло підвищення вмісту флавоноїдів у проростках усіх досліджуваних сортів у 1,7–1,9 раза, при цьому істотних сортових відмінностей не відзначалося. Водночас вміст антоціанів у незагартованих проростків різних сортів відрізнявся: найвищим він був у сорту Букет, а найнижчим – у сорту Підзимок харківський. В процесі холодого загартування він зростав і досягав приблизно однакових величин у сортів Букет, Раритет і Олександра, проте у найменш морозостійкого сорту Підзимок харківський цей показник був значно нижчим. Такі результати можуть свідчити

про помітний внесок антоціанів, але не вторинних метаболітів в цілому, в адаптацію проростків тритикале до низьких температур.

Встановлено, що між морозостійкістю проростків і дорослих рослин пшениці, жита і тритикале існує достатньо тісна кореляція ($r = 0,78$, $P \leq 0,07$). Виразного зв'язку між окремо взятими показниками функціонування антиоксидантної системи та морозостійкістю не виявлено. Однак тісна кореляція відзначалася між інтегральним нормованим показником, що складався з суми нормованих величин активності антиоксидантних ферментів та вмісту низькомолекулярних протекторів у загартованих проростків злаків і морозостійкістю проростків ($r = 0,94$, $P \leq 0,01$) та рослин у фазі кушіння ($r = 0,90$, $P \leq 0,05$). Цей інтегральний показник може бути використаний як маркер морозостійкості озимих злаків для виявлення стійких генотипів.

Проведено порівняльне дослідження впливу екзогенного H_2S на стійкість проростків озимих пшениці та жита до кріостресу. Обробка незагартованих проростків NaHS в концентраціях 0,1 і 0,5 мМ викликала підвищення їх виживаності після проморожування при температурі -5°C . Обробка NaHS в таких же концентраціях також збільшувала виживаність загартованих при $2-4^\circ\text{C}$ проростків обох видів після їх проморожування при -9°C . Під впливом NaHS в проростках обох видів за оптимальної температури ($20-22^\circ\text{C}$) і в умовах холодого загартування відзначалося підвищення вмісту цукрів і проліну. Також обробка NaHS спричиняла активацію вторинного метаболізму, що виявлялося в підвищенні активності фенілаланінамонійліази за фізіологічно нормальних умов і на фоні загартування в обох видів. Вміст антоціанів при обробці NaHS збільшувався тільки у проростків пшениці, але у проростків жита під впливом екзогенного сірководню зростав вміст безбарвних флавоноїдів, що поглинають в області УФ-В. Обробка NaHS також спричиняла підвищення активності каталази та пероксидази в проростках обох видів за звичайної температури та після загартування. Під впливом NaHS в обох видів зменшувалося спричинюване проморожуванням накопичення МДА.

Праймування зернівок озимих жита і пшениці донором оксиду азоту нітропрусидом натрію (НПН, 100–200 мкМ) підвищувало здатність проростків до холодого загартування. Обробка насіння НПН сприяла підвищенню в проростках вмісту цукрів, проліну, антоціанів і флавоноїдів, що поглинають в області УФ-В. У них також спостерігали збільшення активності СОД і пероксидази. Праймування насіння НПН запобігало значному накопиченню МДА у проростках після їх проморожування.

Показано підвищення виживаності проростків після проморожування внаслідок праймування насіння саліциловою кислотою (10 мкМ) і посилення захисного ефекту при комбінованій обробці саліциловою кислотою зі 100 мкМ НПН. Обробка насіння саліциловою кислотою спричиняла підвищення активності СОД, каталази та пероксидази, вмісту проліну та цукрів у тканинах проростків. При комбінованому використанні саліцилової кислоти та НПН в проростках відзначалося додаткове підвищення активності СОД і вмісту цукрів. Отже, за сумісної дії саліцилової кислоти та НПН їх стрес-протекторні ефекти посилювалися.

Таким чином, донори газотрансмітерів сірководню та оксиду азоту, а також стресовий фітогормон саліцилова кислота, можуть чинити кріопротекторний вплив на злаки, активуючи сигнальну мережу і посилюючи функціонування антиоксидантної та осмопротекторної систем за умов адаптації рослин до холоду.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., *Secale cereale* L., × *Triticosecale* Wittmack, антиоксидантні ферменти, сірководень, оксид азоту, праймінг, пролін, розчинні вуглеводи, флавоноїди.

SUMMARY

Horielova E.I. Antioxidant and osmoprotective systems of cereals in adaptation to hypothermia. – Qualifying scientific work as manuscript.

Thesis for a scientific degree of Doctor of Philophy by field of study in specialty 091 “Biology”. – M.G. Kholodny Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021

The dissertation is devoted to the study of the participation of the components of antioxidant and osmoprotective systems in rye, wheat, and triticale in the adaptation to low temperatures, and to the study of these systems' induction by gasotransmitters nitrogen oxide NO and hydrogen sulfide H₂S, and phytohormone salicylic acid.

In the work, changes in the functioning of antioxidant and osmoprotective systems at low-temperature hardening of grain cereals were shown, which indicates their importance in adapting to hypothermia; species and varietal characteristics of these systems were identified and the possibility of their induction and increase of frost resistance of plants through the application of H₂S and NO donors, and phytohormone salicylic acid were shown.

The main experimental objects were etiolated seedlings of soft wheat (*Triticum aestivum* L., variety Doskonala, winter, frost-resistant), rye (*Secale cereale* L., variety Pamyat' Khudoerka, winter, frost-resistant), and triticale (\times *Triticosecale* Wittmack, frost-resistant winter varieties Raritet and Buket, and non-frost-resistant facultative ('dvuruchka') ones Alexandra and Pidzymok Kharkivskiy). Hardening of seedlings was performed for 6 days at a temperature of 2-4°C. Hardened and unhardened seedlings were subjected to freezing at temperatures of -6 or -9°C, and their survival was determined.

In a series of experiments to study the effect of H₂S on the resistance of seedlings to negative temperatures, sodium hydrosulfide (NaHS) in concentrations range of 0.025–1 mM was added to the medium at the beginning of seed germination and on the third day.

In the experiments to study the NO effect on frost resistance, seeds were primed with NO donor by immersion to the sodium nitroprusside ($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$, SNP) solution in concentrations range of 50-200 μM . In the series of experiments on the salicylic acid and SNP combined effects, seeds of the studied variants were immersed in a solution containing 10 μM salicylic acid and 100 μM SNP.

The activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase, and guaiacol peroxidase, the activity of phenylalanine ammonia-lyase, flavonoid compounds, sugars, and proline were determined in unhardened and hardened seedlings. The level of oxidative damage was assessed in the seedlings by the content of a lipid peroxidation (LPO) product malonic dialdehyde (MDA).

The paper compares the performance indicators of the antioxidant and osmoprotective systems of etiolated seedlings of winter rye, triticale, and wheat in physiologically normal conditions and after cold hardening. The activity of SOD and catalase under normal conditions in the three cereals did not differ significantly. At the same time, guaiacol peroxidase activity in the rye was much higher than in wheat and triticale. Hardening caused a significant increase in SOD activity in wheat and less significant in rye and triticale seedlings. Guaiacol peroxidase activity after hardening increased in all cereals. The content of sugars in unhardened seedlings of rye and triticale significantly exceeded that in wheat. After hardening, it increased proportionally in all three cereals. The basal content of proline in the rye was much higher than in wheat and triticale. Hardening caused a significant increase in proline content in the rye and less noticeable in other cereals. The highest content of anthocyanins was observed in rye, and the lowest was in wheat. After hardening, the anthocyanins' amount increased in all studied cereals. The content of UV-B absorbing colorless flavonoids under physiologically normal conditions and after hardening in the rye and triticale was higher than in wheat. Thus, high peroxidase activity and proline content make a greater contribution to the rye adaptation to hypothermia, and triticale has a high content of flavonoids and sugars. At the same time, in wheat the activity of the antioxidant enzymes SOD and catalase changed more significantly after hardening.

In a series of experiments with different varieties of triticale, a relationship was established between the frost resistance and the state of antioxidant system. It was found that after the hardening of seedlings of different triticale varieties there was a decrease in the content of MDA, which indirectly indicates the activation of the antioxidant system. At the same time, the effect of increased MDA content after freezing was characteristic of seedlings of non-frost-resistant triticale varieties, whereas in resistant varieties the changes in MDA content after cryostress were insignificant. This indicates the important role of oxidative stress in the development of damage caused by cold.

After hardening of seedlings of frost-resistant triticale varieties Buket and Raritet at 2-4°C for 6 days, the activities of SOD and catalase increased, and in less resistant Alexandra and Pidzymok Kharkivskiy changed less significantly. At the same time in this varieties the activity of guaiacol peroxidase increased more markedly.

The hardened seedlings of Buket, Raritet, and Alexandra varieties had a much higher sugar content than the Pidzymok Kharkivskiy variety. The content of proline in response to hardening increased in all varieties, while the absolute values in the varieties Buket, Raritet, and Pidzymok Kharkivskiy were higher than in the variety Alexandra. Hardening caused an increase in the content of flavonoids in the seedlings of all studied varieties by 1.7-1.9 times, with no significant varietal differences. At the same time, the content of anthocyanins in unhardened seedlings of different varieties was different: the highest in the variety Buket, and the lowest – in the variety Pidzymok Kharkivskiy. After hardening, it increased and reached approximately the same values in the varieties Buket, Raritet, and Alexandra, but in the least-frost-resistant variety Pidzymok Kharkivskiy it was much lower. These results can testify a significant contribution of anthocyanins, but not secondary metabolites in general, in the adaptation of triticale seedlings to low temperatures.

It was found that there is a fairly strong correlation between the frost resistance of seedlings and adult plants of wheat, rye and triticale ($r = 0.78$, $P \leq 0.07$). No clear relationship was found between the individual indicators of the antioxidant system and frost resistance. However, a strong correlation was observed between the integral normalized index, which consisted of the sum of normalized values of antioxidant

enzyme activity and the content of low-molecular-weight protectors in hardened seedlings, and frost resistance of seedlings ($r = 0.94$, $P \leq 0.01$) and plants in the tillering phase ($r = 0.90$, $P \leq 0.05$), and their frost resistance. This integral index can be used as a marker of frost resistance of winter cereals to identify resistant genotypes.

A comparative study of the exogenous H₂S effect on resistance of wheat and rye seedlings to cryostress was conducted. Treatment of unhardened seedlings with NaHS at concentrations of 0.1 and 0.5 mM caused an increase in their survival after freezing at -5°C. The effect of NaHS in the same concentrations increased the survival of hardened at 2-4°C seedlings of both species after freezing at -9°C. Under the NaHS action at optimal temperature (20-22°C) and after hardening there was an increase in the content of sugars and proline in the seedlings of both species. Also, NaHS caused the activation of secondary metabolism, which was manifested in increased phenylalanine ammonia-lyase activity under physiologically normal conditions and on hardening background in both species. The content of anthocyanins after the NaHS treatment increased only in wheat seedlings, and in rye seedlings the content of colorless flavonoids absorbing in UV-B increased. Treatment with NaHS also induced an increase in catalase and guaiacol peroxidase activity in seedlings of both species at normal temperature and after hardening. Under the influence of NaHS in both species the freezing-induced accumulation of MDA was decreased.

Priming of rye and wheat seeds by 0.1-0.2 mM SNP increased their hardening ability. Treatment with SNP resulted in an increase in seedlings of the contents of sugar, proline, anthocyanins, and UV-B absorbing flavonoids. The activities of SOD and guaiacol peroxidase also increased. Priming of seeds with SNP prevented significant accumulation of MDA in seedlings after freezing.

The increase in the seedlings' survival after freezing due to priming of seeds was shown as a result of priming seeds with 10 µM salicylic acid, and combined treatment with 10 µM salicylic acid and 100 µM SNP enhanced the protective effect. Treatment of seeds with salicylic acid caused an increase in activities of SOD, catalase, and guaiacol peroxidase, as well as the content of proline and sugars in the tissues of seedlings. With the combined use of salicylic acid and SNP in seedlings there was an additional increase

in SOD activity and sugar content. Thus, under the combined action of salicylic acid and SNP, their stress-protective effects were enhanced.

Thus, donors of gasotransmitters hydrogen sulfide and nitrogen oxide, as well as plant stress hormone salicylic acid, can have a cryoprotective effect on cereals, activating a signaling network and enhancing the functioning of antioxidant and osmoprotective systems when plants adapt to cold.

Key words: *Triticum aestivum* L., *Secale cereale* L., × *Triticosecale* Wittmack, antioxidant enzymes, hydrogen sulfide, nitric oxide, priming, proline, soluble carbohydrates, flavonoids.

ПЕРЕЛІК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових виданнях, що індексовані у наукометричній базі даних Scopus:

1. Kolupaev Yu. E., Horielova E. I., Yastreb T. O., Popov Yu. V., & Rybchun N. I. (2018). Phenylalanine ammonia-lyase activity and content of flavonoid compounds in wheat seedlings at the action of hypothermia and hydrogen sulfide donor. *Ukr. Biochem. J.*, 90 (6), 12-20. <https://doi.org/10.15407/ubj90.06.012>

(Особистий внесок дисертанта: проведення експериментів, обробка та інтерпретація результатів)

2. Kolupaev Yu. E., Horielova E. I., Yastreb T. O., & Ryabchun N. I. (2020). State of antioxidant system in triticale seedlings at cold hardening of varieties of different frost resistance. *Cereal Res. Commun*, 48 (2), 165-171. <https://doi.org/10.1007/s42976-020-00022-3>

(Особистий внесок дисертанта: проведення експериментів, обробка та інтерпретація результатів)

Статті у наукових фахових виданнях України:

3. Колупаєв Ю. Е., Горелова Е. И., Ястреб Т. О. (2018). Механізми адаптації рослин к гіпотермії: роль антиоксидантної системи. *Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту Сер. Біологія*, 1 (43), 6-33. <https://doi.org/10.35550/vbio2018.01.006>

(Особистий внесок дисертанта: пошук та опрацювання джерел літератури)

4. Горелова Е. И., Колупаєв Ю. Е., Ястреб Т. О., Швиденко Н. В., Попов Ю. В., Шкляревский М. А., Рябчун Н. И. (2018). Конститутивная и индуцированная холодным закаливанием антиоксидантная активность проростков озимых злаков. *Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія*, 2 (44), 59-68. <https://doi.org/10.35550/vbio2018.02.059>

(Особистий внесок дисертанта: проведення експериментів, обробка та інтерпретація результатів, участь у написанні тексту статті)

5. Горелова Е. И., Швиденко Н. В., Рябчун Н. И., Колупаев Ю. Е. (2018). Вторичный метаболизм проростков *Secale cereale* при действии донора сероводорода и холодового закаливания. *Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія*, 3(45), 59 – 68. <https://doi.org/10.35550/vbio2018.03.094>

(Особистий внесок дисертанта: проведення експериментів, обробка та інтерпретація результатів, участь у написанні тексту статті)

6. Горелова Е. И., Шкляревский М. А., Рябчун Н. И., Кабашникова Л. Ф., Колупаев Ю. Е. (2020). Комбинированное влияние салициловой кислоты и донора оксида азота на развитие индуцированной закаливанием морозоустойчивости проростков пшеницы. *Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту Сер. Біологія*, 2 (50), 93-104. <https://doi.org/10.35550/vbio2020.02.093>

(Особистий внесок дисертанта: проведення експериментів, обробка та інтерпретація результатів, участь у написанні тексту статті)

7. Горелова О. І., Шкляревський М. А., Колупаєв Ю. Є. (2020). Вміст вторинних метаболітів у проростках тритикале різних генотипів за умов холодового загартування. *Фізіологія рослин і генетика*, 52, (5), 401-411. <https://doi.org/10.15407/frg2020.05.401>

(Особистий внесок дисертанта: проведення експериментів, обробка та інтерпретація результатів, участь у написанні тексту статті)

8. Горелова О. І., Рябчун Н. І., Шкляревський М. А., Резнік А. М., Колупаєв Ю. Є. (2020). Морозостійкість злаків корелює з інтегрованими показниками вмісту низькомолекулярних протекторних сполук і активності антиоксидантних ферментів. *Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту Сер. Біологія*, 3 (51), 71-86. <https://doi.org/10.35550/vbio2020.03.071>

(Особистий внесок дисертанта: проведення експериментів, участь в обробці та інтерпретації результатів та написанні тексту статті)

9. Горелова О. І., Колупаєв Ю. Є. (2021). Регуляція холодо- і морозостійкості рослин дією екзогенних газотрансмітерів і фітогормонів. *Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту Сер. Біологія*, 1 (52), 32-51. <https://doi.org/10.35550/vbio2021.01.032>

(Особистий внесок дисертанта: пошук та опрацювання джерел літератури, участь у написанні тексту)

Матеріали конференцій:

10. Горелова Е. И., Колупаев Ю. Е., Ястреб Т. О., Рябчун Н. И. (2018). Влияние донора сероводорода и холодового закаливания на активность фенилаланинаммонийлиазы и содержание флавоноидов в проростках озимых ржи и пшеницы. *Сучасна біологія рослин: теоретичні та прикладні аспекти: IV Міжнародна наукова конференція (м. Харків, Україна): Тези доповідей.* (С. 44-45). Харків.

11. Горелова О. І., Швиденко М. В., Рябчун Н. І., Колупаєв Ю. Є. (2020). Вплив донорів газотрансмітерів на холодове загартування проростків озимих злаків. *Сучасні проблеми генетики, біотехнології і біохімії сільськогосподарських рослин: Міжнародна наукова конференція (м. Одеса, Україна): Тези доповідей* (С. 86-87). Одеса.

12. Горелова О. І., Колупаєв Ю. Є., Шкляревский М. А., Рябчун Н. І. (2021). Пролін і стійкість злаків до агентів окиснювального стресу і гіпотермії. *Міжнародна наукова конференція «Стрес і адаптація рослин» (м. Харків, Україна): Матеріали конференції. Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. Спец. випуск* (С. 104–105).

13. Горелова О.І., Гавва К.М., Рябчун Н.І., Колупаєв Ю.Є. Індукування накопичення вторинних метаболітів *Triticum aestivum* і стійкості до зневоднення і кріостресу дією донора H₂S (2021). *Міжнародна наукова конференція «Стрес і адаптація рослин» (м. Харків, Україна): Матеріали конференції. Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. Спец. випуск.* (С. 102–103).

14. Горелова О. І., Резнік А. М., Рябчун Н. І., Колупаєв Ю. Є. (2021). Зв'язок морозостійкості озимих зернових культур зі станом антиоксидантної системи. *Селекція зернових та зернобобових культур в умовах змін клімату: напрями і пріоритети: тези доповідей Міжнародної наукової конференції (м. Одеса, Україна):* (С. 88–89). Одеса: СГІ–НЦНС.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	17
ВСТУП	18
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	25
1.1. Актуальність проблеми морозостійкості злаків в контексті сучасних змін клімату	25
1.2. Реакції рослин на дію низьких температур	27
1.3. Антиоксидантна система (АОС) та її роль в низькотемпературній адаптації	38
1.4. Підвищення стійкості рослин до гіпотермії дією екзогенних сигнальних сполук і фітогормонів	47
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛ, УМОВИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	58
2.1. Коротка характеристика об'єктів досліджень	58
2.2. Пророщування зернівок і умови холодого загартування та кріостресу рослин	59
2.3. ... Обробка рослинного матеріалу екзогенними індукторами стійкості (донорами H ₂ S, NO, саліциловою кислотою)	60
2.4. Біохімічні показники	61
2.5. Повторення і статистична обробка результатів експериментів	64
РОЗДІЛ 3. ОСОБЛИВОСТІ ФУНКЦІОНУВАННЯ АНТИОКСИДАНТНОЇ ТА ОСМОПРОТЕКТОРНОЇ СИСТЕМ ЖИТА, ТРИТИКАЛЕ І ПШЕНИЦІ	66
РОЗДІЛ 4. ЗВ'ЯЗОК МІЖ МОРОЗОСТІЙКІСТЮ СОРТІВ ТРИТИКАЛЕ І СТАНОМ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ	75
4.1. Морозостійкість проростків тритикале	75
4.2. Активність антиоксидантних ферментів	77

4.3. Вміст мультифункціональних протекторів	78
4.4. Вміст вторинних метаболітів	79
РОЗДІЛ 5. КОРЕЛЯЦІЯ МОРОЗОСТІЙКОСТІ ОЗИМИХ ЗЛАКІВ З ІНТЕГРАЛЬНИМИ НОРМОВАНИМИ ПОКАЗНИКАМИ ВМІСТУ НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНИХ ПРОТЕКТОРНИХ СПОЛУК І АКТИВНОСТІ АНТИОКСИДАНТНИХ ФЕРМЕНТІВ.....	85
РОЗДІЛ 6. ІНДУКУВАННЯ РОЗВИТКУ МОРОЗОСТІЙКОСТІ ЗЛАКІВ ЕКЗОГЕННИМИ СИГНАЛЬНИМИ СПОЛУКАМИ	98
6.1. Вплив донора сірководню NaHS на стан антиоксидантної і осмопротекторної систем проростків жита і пшениці	98
6.2. Вплив донора NO нітропрусиду натрію на стан антиоксидантної і осмопротекторної систем проростків.....	111
6.3. Комбінований вплив донора оксиду азоту і саліцилової кислоти на розвиток морозостійкості проростків пшениці	118
АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	127
ВИСНОВКИ.....	134
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	136

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АФК – активні форми кисню

АО – антиоксиданти

АОС – антиоксидантна система

КФ – класифікація ферментів

МДА – малоновий діальдегід

ПОЛ – пероксидне окиснення ліпідів

СК – саліцилова кислота

СОД – супероксиддисмутаза

ТБК – тіобарбітурова кислота

ТХО – трихлороцтова кислота

ФАЛ – фенілаланінамонійліаза

РТЮ – 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide

ВСТУП

Актуальність теми. Рослини зазнають негативного впливу низьких температур майже на двох третинах території суші Землі. У зв'язку з глобальними змінами клімату, у тому числі потеплінням, актуальність проблеми холодо- і морозостійкості рослин не лише не зменшується, а, навпаки, зростає. Адже загальне потепління супроводжується посиленням нестабільності погодних умов, зокрема, значними перепадами температур впродовж коротких відрізків часу. Саме температурні чинники стають причиною найбільших втрат урожаю сільськогосподарських культур (Титов и др., 2006). Зокрема, в Україні загибель посівів озимих зернових в окремі роки може сягати 35% (Моргун, Майор, 2009). Характерна особливість зим в Україні в останні десятиліття – наявність частих відлиг, які спричиняють втрату озимими злаками загартованого стану. Зважаючи на це, дослідження функціонування основних стрес-протекторних систем рослин за дії несприятливих температур, їх відмінностей у видів і сортів озимих зернових злаків, а також пошук способів індукування стійкості екзогенними чинниками (зокрема, сигнальними сполуками і фітогормонами) актуальні не лише для пізнання загальнобіологічних особливостей адаптації рослин, а й для вирішення практичних завдань рослинництва.

Основним експериментальним об'єктом для досліджень процесів холодового загартування в фізіології рослин впродовж багатьох десятиліть залишається озима м'яка пшениця, що зумовлено значними площами цієї культури у багатьох країнах світу і її відносною чутливістю до від'ємних температур. При цьому особливості адаптації інших видів, зокрема, жита, яке відрізняється від пшениці вищою морозостійкістю, досліджені недостатньо. Зовсім слабо дослідженими залишаються механізми формування морозостійкого стану у тритикале (*× Triticosecale* Wittm.) – вперше цілеспрямовано і успішно створеного людиною міжродового гібрида. Цінність цієї культури зумовлена тим,

що її сучасні сорти можуть перевершувати сорти пшениці не лише за морозостійкістю, а й за продуктивністю (Рибалка та ін., 2015).

Останніми роками як одну з причин низькотемпературних пошкоджень рослин розглядають окиснювальний стрес (Awasthi et al., 2015). Його виникнення може бути пов'язане з порушеннями метаболізму, зумовленим температурним фазовим переходом ліпідів біомембран (Лось, 2005). За дії на рослини від'ємних температур додатковою причиною посилення генерації активних форм кисню (АФК) може бути порушення функцій біомакромолекул і мембранних комплексів через зневоднення, зумовлене утворенням позаклітинного льоду.

Антиоксидантна система, що контролює вміст АФК, є важливою протекторною системою, необхідною для виживання рослин за дії низьких температур (Janmohammadi et al., 2012). У багатьох дослідженнях виявлена її активація при загартуванні і помірному холодоровому стресі (Baek, Skinner, 2003; Janda et al., 2003). На різних об'єктах показано зміни активності антиоксидантних ферментів і вмісту низькомолекулярних антиоксидантів за холодової адаптації. Однак у багатьох випадках не вдавалося встановити чіткого зв'язку між показниками стану антиоксидантної системи і морозостійкістю злаків (Apostolova et al., 2008). Особливістю функціонування антиоксидантної системи рослин за дії низьких температур, зокрема, адаптації до морозів, є накопичення рослинами низькомолекулярних сполук, що поряд з антиоксидантним проявляють осмопротекторний, мембранопротекторний і шаперонний ефекти (пролін, цукри, вторинні метаболіти та ін.). Ці сполуки можуть перебувати у складній функціональній взаємодії з ферментативними антиоксидантами (Sin'kevich et al., 2009; Radyukina et al., 2012; Kolupaev et al., 2019). Проте особливості такої взаємодії за умов холодової адаптації різних видів досліджені поки що дуже слабо. Зважаючи на це, актуальним є порівняльне комплексне дослідження стану антиоксидантної і осмопротекторної систем різних видів озимих зернових злаків за фізіологічно нормальних умов і дії загартувальних і ушкоджувальних низьких температур. Результати таких досліджень можуть стати основою для створення

нових підходів для оцінки морозостійкості і скринінгу джерел стійкості для потреб селекції.

Останнім часом значна увага приділяється пошуку ефективних способів праймування рослин і насіння – індукуванню стійкості дією сигнальних молекул або їх донорів. Цей прийом багато в чому схожий на природні явища загартування рослин і може ефективно посилювати адаптивні процеси (Savvides et al., 2016). Як перспективні праймувальні агенти нині розглядаються донори сигнальних молекул – газотрансмітерів – оксиду азоту (NO) і сірководню (H₂S), а також стресовий фітогормон саліцилова кислота (Saleem et al., 2020). Однак їх вплив на морозостійкість рослин і перебіг процесу холодowego загартування вивчався лише в поодиноких дослідженнях, що не передбачали порівняння реакцій різних видів рослин на ці чинники.

Отже, комплексних порівняльних досліджень антиоксидантної та осмопротекторних систем за низькотемпературної адаптації зернових злаків різних видів, а також можливостей індукування цих систем дією екзогенних сигнальних молекул (газотрансмітерів, фітогормонів) дотепер не проводилося.

Мета та завдання досліджень. Основною метою роботи була оцінка ролі компонентів антиоксидантної та осмопротекторної систем у жита, пшениці і тритикале в їх адаптації до низьких температур та дослідження індукування цих систем дією донорів газотрансмітерів (NO і H₂S) і саліцилової кислоти.

Для досягнення цієї мети було поставлено такі завдання:

- Оцінити конститутивну та індуковану холодом морозостійкість та стійкість до вторинного окиснювального стресу модельних об'єктів – проростків жита, пшениці і тритикале;
- Проаналізувати конститутивну активність антиоксидантних ферментів, вміст низькомолекулярних антиоксидантів і осмолітів та зміни цих показників у проростків досліджуваних видів злаків за умов холодowego загартування;
- Дослідити сортові особливості антиоксидантної та осмопротекторної систем сортів тритикале з різною морозостійкістю за нормальної і загартувальної температури та після холодowego загартування;

- Визначити кореляційні зв'язки між окремими та інтегральними показниками стану антиоксидантної системи різних видів і сортів озимих злаків та морозостійкістю проростків і дорослих рослин;
- Дослідити вплив донора сірководню гідросульфід натрію на базову та індуквану холодним загартуванням морозостійкість проростків жита і пшениці та стан їх антиоксидантної і осмопротекторної систем;
- Вивчити вплив холодного загартування і донора сірководню на активність фенілаланінамонійліази і вміст вторинних метаболітів у проростках озимих злаків;
- Оцінити вплив донора оксиду азоту нітропрусиду натрію на антиоксидантну і осмопротекторну системи і формування морозостійкості проростків жита і пшениці;
- Дослідити стрес-протекторні ефекти саліцилової кислоти та її комбінацій з донором оксиду азоту на проростки пшениці за умов гіпотермії.

Об'єкт дослідження – антиоксидантна і осмопротекторна системи злаків з різною морозостійкістю, індукування цих систем дією холоду або екзогенних сигнальних сполук.

Предмет дослідження – антиоксидантні ферменти і низькомолекулярні сполуки з антиоксидантною активністю у складі проростків озимих злаків за фізіологічно нормальних умов і холодного загартування.

Основні методи дослідження. Фізіологічні (загартування рослин в лабораторних і природних умовах та оцінка їх стану); біохімічні (аналіз активності антиоксидантних ферментів, фенілаланінамонійліази; вмісту сумісних осмолітів і вторинних метаболітів); статистичні (нормування показників антиоксидантної активності, дисперсійний і кореляційний аналізи).

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше проведено комплексне порівняльне дослідження антиоксидантної системи озимих жита, пшениці і тритикале у фізіологічно нормальних умовах і за холодного загартування. Показано, що в антиоксидантний захист жита більший внесок роблять високі рівні активності пероксидази та вмісту проліну і антоціанів, а тритикале – підвищений

вміст флавоноїдів і цукрів. У той же час у пшениці після холодової адаптації істотно змінюється активність антиоксидантних ферментів – супероксиддисмутази (СОД) і каталази.

Вперше досліджено особливості функціонування стрес-протекторних систем проростків сортів тритикале з різною морозостійкістю (високоморозостійкі, неморозостійкі, дворучки).

Вперше запропоновано використовувати для оцінки антиоксидантної системи злаків інтегральний нормований показник, що розраховується на основі нормованих величин активності антиоксидантних ферментів і вмісту низькомолекулярних захисних сполук. Доведено наявність високої кореляції між інтегральними показниками антиоксидантної активності і морозостійкістю як загартованих проростків, так і дорослих озимих злаків у фазі кущіння.

Вперше встановлено позитивний вплив донора сірководню NaHS на стійкість проростків зернових злаків – озимих пшениці і жита – до дії від'ємних температур і показано значення індукції окремих антиоксидантних ферментів, фенілаланінамонійліази, накопичення проліну і флавоноїдних сполук у реалізації стрес-протекторної дії екзогенного сірководню.

Показано підвищення морозостійкості озимих злаків внаслідок праймування насіння донором оксиду азоту нітропрусидом натрію, саліциловою кислотою та їх комбінацією. Встановлено, що посилення протекторних ефектів саліцилової кислоти за комбінування її дії з донором NO супроводжується значним підвищенням активності СОД і вмісту цукрів у проростках злаків.

Практичне значення отриманих результатів. Дані щодо відмінностей у функціонуванні стрес-протекторних систем пшениці, жита та їх міжродового гібрида тритикале при адаптації до холоду мають значення для розуміння фундаментальних механізмів адаптації рослин з різною таксономічною належністю. Визначення інтегральних показників стану антиоксидантної системи та розрахунок кореляцій між цими показниками і морозостійкістю сортів озимих злаків можуть використовуватися для розробки нових методів оцінки матеріалу при селекції на морозостійкість. Ефект індукування стрес-протекторних систем

злаків шляхом праймування донорами газотрансмітерів і саліциловою кислотою може стати основою для створення нових технологій підвищення стійкості рослин до гіпотермії та інших несприятливих чинників.

Результати досліджень використовуються в наукових дослідженнях Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України, у навчальному процесі в ХНАУ ім. В.В. Докучаєва і ХНУ ім. В.Н. Каразіна при викладанні загальних і спеціальних курсів. Вони можуть бути використані у навчальному процесі та при проведенні фундаментальних і прикладних досліджень в інших закладах вищої освіти і наукових установах.

Особистий внесок здобувача. Робота є самостійним дослідженням здобувача. Дисертантом проведено пошук і аналіз джерел літератури, освоєно відповідні методи, сплановано і проведено основну частину експериментів. Обґрунтування мети і завдань досліджень, інтерпретація та узагальнення результатів, підготовка матеріалів до публікації здійснювалися за участю наукового керівника. Дослідження морозостійкості злаків проводилося спільно з доктором сільськогосподарських наук Н.І. Рябчун (Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України). У проведенні окремих експериментів брали участь співробітники кафедри ботаніки і фізіології рослин ХНАУ ім. В.В. Докучаєва. Матеріали, опубліковані у співавторстві, мають пропорційний внесок здобувача. Права співавторів не порушені.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертаційної роботи доповідалися та обговорювалися на наукових семінарах кафедри ботаніки і фізіології рослин, підсумкових звітних конференціях професорсько-викладацького складу і здобувачів ХНАУ ім. В.В. Докучаєва (2017–2020 рр.); IV Міжнародній науковій конференції «Сучасна біологія рослин: теоретичні та прикладні аспекти» (м. Харків, 2018 р.); Міжнародній науковій конференції «Сучасні проблеми генетики, біотехнології і біохімії сільськогосподарських рослин» (м. Одеса, 2020 р.), Міжнародній науковій конференції «Стрес і адаптація рослин» (м. Харків, 2021 р.), Міжнародній науковій конференції «Селекція

зернових та зернобобових культур в умовах змін клімату: напрями і пріоритети» (м. Одеса, 2021 р.).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 14 наукових праць, у тому числі 9 статей у провідних фахових виданнях України та інших країн, з них дві у журналах, що входять до наукометричної бази Scopus.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалася в рамках проєкту «Роль сигнальних посередників і сполук з гормональною активністю у формуванні адаптивних реакцій рослин на абіотичні стресори» (2017-2019 рр., номер державної реєстрації 0117U002427), що фінансувався за рахунок коштів державного бюджету відповідно до тематичного плану наукових досліджень ХНАУ ім. В.В. Докучаєва та науково-дослідної теми кафедри ботаніки і фізіології рослин Харківського національного аграрного університету ім. В.В. Докучаєва «Механізми індукування компонентів стрес-протекторної системи рослин» (2016-2020 рр., номер державної реєстрації 0117U002514).

Структура і обсяг роботи. Дисертація складається зі вступу, шести розділів (огляд літератури, опис об'єктів і методів досліджень, чотири експериментальні розділи), узагальнення результатів досліджень, висновків. Робота викладена на 165 сторінках, ілюстрована 24 рисунками, містить 14 таблиць. Список цитованої літератури налічує 295 джерел.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Актуальність проблеми морозостійкості злаків в контексті сучасних змін клімату

Температура навколишнього середовища є одним з найважливіших чинників, що зумовлюють ріст, розвиток рослин та їх поширення в конкретних кліматичних зонах (Моргун, Майор, 2009). Велика частина рослин на Землі протягом року зазнає дії низьких позитивних і від'ємних температур та інших несприятливих супутніх чинників. У субтропіках температура часто опускається нижче 0°C, в помірних зонах до -20-40°C. На північ від цих районів розташована зона вічної мерзлоти, де температура ще нижча (Трунова, 2007). Дії низьких температур зазнають як культурні, так і дикорослі рослини, життєвий цикл яких охоплює зимовий період.

В Україні за останні 100 років загибель озимих злаків відбувалася внаслідок прямого впливу низьких температур (35% випадків), чергування морозів і відлиги (26%), в результаті ушкоджувального впливу крижаної кірки (22%); іншими причинами загибелі озимих є механічні пошкодження внаслідок випинання (підйому ґрунту і рослин, спричиненого утворенням льоду в верхньому шарі ґрунту) та інфікування патогенними грибами (Моргун, Майор, 2009).

Незважаючи на те, що в останні десятиліття спостерігається підвищення середньорічної температури, для більшості країн Європи проблема холодо- і морозостійкості рослин залишається актуальною. Останніми роками в Україні відзначається велика амплітуда температур в зимовий і весняний періоди від високих до низьких, а в найближчому майбутньому прогноуються аномально холодні зими з різкими перепадами температур і відсутністю снігового покриву (Іващенко, Іващенко, 2008).

Сніговий покрив рідко зберігається протягом всієї зими або не утворюється взагалі. Так, вимерзання в Україні озимих культур на значних площах у 1994 і

2003 рр. відбувалося при більш високих температурах на рівні вузла кушіння, абсолютні мінімуми при цьому не перекривалися (Моргун, Майор, 2009). Також кліматологи припускають небезпеку несподіваного глобального похолодання (Engvild, 2003). Зимові відлиги, які чергуються з раптовими морозами, завдають реальної шкоди і спричиняють зниження врожайності озимих злаків. Більш раннє настання метеорологічної весни збільшує ймовірність пошкодження рослин внаслідок весняних заморозків. Моделювання онтогенезу пшениці в умовах підвищення температури продемонструвало більш раннє настання цвітіння (на 1 тиждень при підвищенні температури на 1°C) (Sadras, Monzon, 2006), що може посилити ризик потрапляння рослин під заморозки у фазі цвітіння – на дуже уразливому етапі онтогенезу (Кошкин и др., 2019).

В останні десятиліття сформувалися уявлення, згідно з якими пошкодження рослин внаслідок дії низьких позитивних і негативних температур починаються з порушень структури і функцій мембран, а властивості холодо- і морозостійкості рослин розвиваються в процесі низькотемпературного загартування (Трунова, 2007). Отримано відомості про ключову роль у формуванні стійкості до гіпотермії підвищення ненасиченості жирних кислот у складі ліпідів мембран (Theocharis et al., 2012), накопичення кріопротекторів (Trischuk et al., 2006), синтезу різних стресових білків (Колесниченко, Войников, 2003; Косаковская, 2008; Козеко, 2010), активації антиоксидантної системи (Foyer, Noctor, 2009).

До початку XXI століття розуміння властивостей холодо- і морозостійкості рослин базувалося переважно на фізіологічній і біохімічній основі. В останні десятиліття вдалося ідентифікувати гени і кодовані ними специфічні білки з певною роллю у резистентності рослин до низьких температур (Трунова, 2007), досягнуто прогресу в розумінні механізмів сприйняття рослинною клітиною холодого впливу і трансдукції низькотемпературного сигналу в генетичний апарат (Markovskaya, Shibaeva, 2017).

Деяко змінилися і уявлення про причини низькотемпературних пошкоджень рослинних клітин, зокрема, накопичено експериментальні дані, що свідчать про

про роль вторинного окислювального стресу в розвитку негативних наслідків охолодження (Лукаткин, 2002; Войников, 2013).

Зрештою, змінилися і уявлення про внесок окремих стрес-протекторних систем в конститутивну та індуквану стійкість рослин до гіпотермії. Зокрема, в останні роки значно розширилися відомості про роль таких класичних протекторів, як цукри (Ramel et al., 2009) і пролін (Liang et al., 2013), про спектр різноманітних антиоксидантів, що беруть участь в холодовій адаптації, та про їх функціональну взаємодію.

Однак, формування уявлень про функціонування протекторних систем рослин при низькотемпературному стресі і адаптації ускладнюється, з одного боку, множинністю ефектів, спричинюваних екстремальними температурами і залежних від інтенсивності та тривалості впливу, фізіологічного стану рослин в момент впливу, а з іншого – значною залежністю характеру захисних реакцій від видових особливостей.

1.2. Реакції рослин на дію низьких температур

1.2.1. Ефекти низьких температур на субклітинному і клітинному рівнях. Знижені температури спричиняють численні порушення ультраструктури мембран клітин теплолюбних рослин. Так, зменшується електронна щільність цитоплазми, відбуваються конденсація хроматину в ядрі, набухання мітохондрій та структурні зміни у хлоропластах (дезінтеграція гран, накопичення ліпідних крапель, зникнення крохмальних зерен) (Колесниченко, Войников, 2003; Белявская и др., 2020). Зміни у мембранах, напевно, є найбільш ранньою реакцією рослин на дію гіпотермії (рис. 1.1).

Порушення функціональної активності компонентів мембран в результаті їх переходу від рідинно-кристалічного до стану гелю вважається основною причиною пошкоджень теплолюбних рослин при дії низьких позитивних температур (Лукаткин, 2002; Войников, 2013). Так, ще на початку 70-х років минулого століття на прикладі мембран мітохондрій теплолюбних рослин був

показаний ефект фізичного фазового переходу від гнучкої рідкокристалічної до твердо-гелевої структури за температури близько 10°C. Натомість у стійких до охолодження видів ефекту фазових переходів мембран в таких умовах не спостерігалось (Lyons, 1973). Наслідком пошкоджень мембран може бути порушення роботи мембранних АТФаз, а отже, активного транспорту іонів через мембрани, дезінтеграція електрон-транспортних ланцюгів мітохондрій і хлоропластів, що призводить до порушень енергетичного обміну (Лукаткин, 2002; Войников, 2013). При цьому збільшується ймовірність стохастичного утворення активних форм кисню (АФК), що може викликати вторинний окиснювальний стрес і додаткові пошкодження, пов'язані з активацією пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), що характерно насамперед для теплолюбних рослин (Лукаткин, 2002) (рис. 1.1).

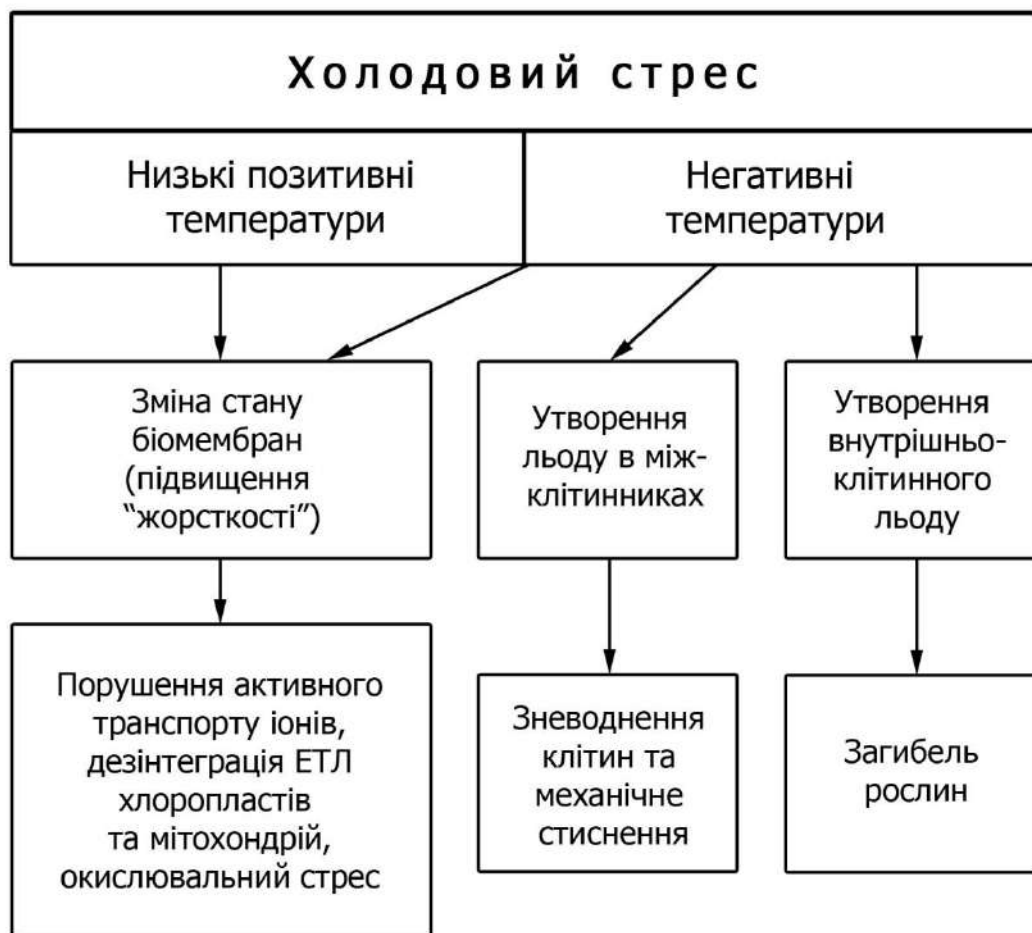


Рис 1.1. Основні причини пошкоджень рослин при холодівому стресі.

Давно відомо, що кристалічний лід може утворюватися всередині клітин і в міжклітинниках. Внутрішньоклітинне льодоутворення завжди летальне не тільки для теплолюбних і холодостійких, а й для морозостійких рослин. Миттєве і необоротне пошкодження клітин при утворенні внутрішньоклітинного льоду свідчить про фізичну природу процесу: відбувається руйнування клітинних мембран кристалами льоду, які формуються в протоплазмі (Levitt, 1980). У той же час в природних умовах дуже рідко має місце внутрішньоклітинне льодоутворення, оскільки воно можливе лише при дуже різкому зниженні температури (10-12 град./год). Зазвичай температура знижується зі швидкістю 1-2 град./год, або ще повільніше (Самыгин, 1974).

У природі найбільш поширеним є позаклітинне утворення льоду, яке відбувається в умовах відносно повільного зниження температури. Незважаючи на його негативні наслідки, позаклітинне льодоутворення є фактично єдиним можливим шляхом виживання рослин в умовах тривалого зимового періоду.

Нуклеація льоду в міжклітинниках хоча і є шляхом уникнення летального внутрішньоклітинного льодоутворення, небезпечна для рослин і також може викликати пошкодження. Виділяють дві основні їх причини: зневоднення протопластів і механічні пошкодження.

Показано, що морозостійка береза у зимовий період втрачає до 80% води. При такому зневодненні в умовах позитивних температур не може вижити жодна рослина. Осимі злаки менш стійкі до зневоднення порівняно з деревними рослинами і при заморожуванні витримують тільки 50%-ну втрату води (Трунова, 2007).

Зневоднення протоплазми є переважною причиною загибелі незагартованих рослин, загартовані найчастіше гинуть через механічні пошкодження (Колесниченко, Войников, 2003).

1.2.2. Посилення утворення АФК (вторинний окислювальний стрес) у рослин за умов гіпотермії. У рослинних клітинах, як і в тваринних і прокаріотичних, відбувається постійне утворення АФК та їх взаємодія з антиоксидантами (АО) різної природи (Szollosi, 2014; Paciolla et al., 2016). Як

відомо, до АФК належить сукупність взаємно перетворюваних реакційно здатних форм кисню, більшість з яких існує протягом короткого часу. Серед них виділяють вільнорадикальні частки – супероксидний аніон-радикал ($O_2^{\cdot-}$), гідроксильний радикал (OH^{\cdot}), пероксидні радикали (RO_2^{\cdot} та ін.) і нейтральні молекули, такі як пероксид водню (H_2O_2), синглетний кисень (1O_2) тощо (Scandalios, 2002). Залежно від кількості, хімічної природи, компартментації, часу утворення АФК результат їх фізіологічної дії може бути різним. Короткочасне і відносно невелике збільшення вмісту АФК в окремих компартментах клітини, яке відбувається у відповідь на дію стресора, може виконувати функції сигналу, що забезпечує подальше індукування захисних реакцій, в тому числі активацію антиоксидантної системи (Mehla et al., 2017). Більш сильна генерація АФК може викликати програмовану клітинну загибель. Нарешті, масштабне стохастичне утворення АФК може призвести до неконтрольованих клітиною деструктивних змін (Petrov et al., 2015).

Ще в 80-90 рр. ХХ століття були отримані експериментальні дані, що побічно вказують на роль окислювального стресу в розвитку холодових ушкоджень рослин. Так, було показано, що низькотемпературний стрес, як і висока концентрація кисню і озону в атмосфері, а також обробка рослин індуктором окисного стресу паракватом, спричиняють в клітинних мембранах пошкодження з подібними симптомами: підвищення в'язкості мембран, формування зон гелевої фази, деградацію фосфоліпідів і накопичення вільних жирних кислот (McKersie et al., 1988). Встановлено збільшення вмісту пероксиду водню і продукту ПОЛ малонового діальдегіду (МДА) у рослин різних видів під час низькотемпературного стресу, особливо при дії негативних температур (Войников, 2013).

Нині відомо, що за умов гіпотермії посилюється утворення АФК в ряді компарментів, пов'язане з різними механізмами (рис. 1.2).



Рис 1.2. Шляхи утворення АФК в рослинних клітинах при холодovому стресі.

АФК, що утворюються в результаті збоїв у роботі електрон-транспортних ланцюгів, в подальшому можуть ініціювати неферментативні реакції, що призводять до додаткового збільшення їх кількості.

Мітохондрії, як і хлоропласти, містять електрон-транспортні ланцюги. При їх порушенні випадкова взаємодія електронів з молекулярним киснем може призвести до одноелектронного відновлення O_2 до $O_2^{\cdot-}$ (Rhoads et al., 2006). Природно, що при спричинюваних гіпотермією порушеннях структури і

властивостей мембран та сповільненні дифузії акцепторів електронів ймовірність таких подій значно зростає. В цілому вважається, що дихальний ланцюг мітохондрій менш потужне джерело АФК порівняно з електрон-транспортним ланцюгом хлоропластів. Однак в темряві або в незелених тканинах внесок мітохондрій в генерацію АФК може бути істотним (Rhoads et al., 2006).

АФК можуть виникати і в тому випадку, коли в результаті температурного стресу роз'єднуються процеси переносу електронів, відщеплюваних від молекул-донорів, які беруть участь в окиснювальних реакціях катаболізму, на молекули-акцептори в реакціях анаболізму за допомогою коферментів, що виконують роль переносників електронів, зокрема, НАДФН (Войников, 2013).

Вплив низьких пошкоджуючих температур на рослини викликає як стохастичне посилення генерації АФК, так і ферментативне, пов'язане з активацією НАДФН-оксидази (Piotrovskii et al., 2011; Awasthi et al., 2015). Цей ефект може бути складовою тпередачі холодового сигналу в генетичний апарат та індукувати адаптивні реакції.

У деяких роботах показаний зворотній зв'язок між збільшенням вмісту АФК і стійкістю рослин до низьких температур. Так, у холодостійких сортів полуниці збільшення генерації супероксидного аніон-радикала і пероксиду водню за дії нульової температури було менш істотним, ніж у чутливого сорту (Luo et al., 2011).

1.2.3. Сприйняття і передача холодового сигналу. Питання про холодіві сенсори рослинної клітини поки що далекі від свого рішення. Температура – фізичний фактор, що впливає на молекули (білки, нуклеїнові кислоти, ліпіди) і надмолекулярні комплекси шляхом звичайних термодинамічних ефектів. У зв'язку з цим кожна зі згаданих молекул (структур) може «відчувати» температуру (Markovskaya, Shibaeva, 2017). Однак для можливості розгляду молекули або структури як потенційного термосенсора необхідно, щоб її зміни залежно від температури викликали каскад реакцій, що забезпечують передачу сигналу в генетичний апарат і формування фізіологічної відповіді на флуктуації температури (Ruelland, Zachowska, 2010).

У даний час як кандидати на роль термосенсора розглядаються біомембрани, елементи цитоскелету, хроматин, фітохроми, нуклеїнові кислоти і певні білки (Markovskaya, Shibaeva, 2017). Припускається, що залежно від характеру впливу (його інтенсивності, швидкості зниження температури, тривалості) провідну роль можуть відігравати різні структури або сполуки, що дозволяє рослині гнучко і адекватно реагувати на холод.

Сприйняття температурних змін вищими рослинами на молекулярному рівні вивчено поки слабо. Значні успіхи в цьому напрямі досягнуто у дослідженні сенсорів ціанобактерій (Лось, 2010). Вважається, що первинним сигналом при сприйнятті температурного стресу ціанобактеріями і, можливо, вищими рослинами є зміни плинності біологічних мембран. Цілком ймовірно, що ущільнення мембранних ліпідів при зниженні температури запускає відповідні стресові реакції.

Припускають, що первинним сенсором цих сигналів, сполученим з сигнальною мережею, у ціанобактерій є гістидинкіназа Нік33. Сенсорна гістидинкіназа мембранної локалізації Нік33 сприймає зниження температури (ймовірно, через фізичне стискання цитоплазматичної мембрани) і автофосфорилується. Вона переносить фосфат на регуляторний елемент Pre26, здатний зв'язуватися з промоторними ділянками генів і активувати їх транскрипцію (Лось, 2010). У той же час припускають, що у ціанобактерій крім Нік33 існує додатковий низькотемпературний сенсор (а можливо декілька сенсорів), оскільки не всі гени, які індукуються холодом, перебувають під контролем Нік33.

Сприйняття і трансдукція холодових сигналів у вищих рослин, ще складніша. Вважається, що реакція сенсорних білків спочатку пов'язана зі зміною властивостей ліпідів (їх в'язкості), яка миттєво підвищується за зниження температури (Трунова, 2007) (рис. 1.3).



Рис 1.3. Можливі асоційовані з мембранами механізми сприйняття і передачі сигналу холодного стресу.

Пояснення до схеми. Дія холоду викликає підвищення в'язкості мембран, що може призводити до активації стартових ферментів сигнальних систем, зокрема НАДФН-оксидази, що генерує супероксидний аніон-радикал, фосфоліпази D, що каталізує утворення фосфатидної кислоти, МАР-кіназ, а також індукувати відкриття механочутливих кальцієвих каналів. Сигнали, зумовлені дією зазначених посередників передаються в генетичний апарат.

Дію температурного стресу може бути імітовано обробкою рослин, сполуками, що впливають на стан мембран. Так, жорсткість плазматичної мембрани підвищується обробкою диметилсульфоксидом, яка може індукувати експресію генів *COR* (холодочутливих) навіть за нормальної температури, в той час як обробка мембранним флюїдизатором, бензиловим спиртом, запобігає

індукції експресії генів *COR* при низьких температурах (Orvar et al., 2000; Sangwan et al., 2001).

Жорсткість мембран впливає на іонні (кальцієві) канали (рис. 1.3). Оскільки експресія гена *COR* порушувалася при обробці клітин арабидопсису блокатором механочутливих Ca^{2+} -каналів гадолінієм, вважають, що ці кальцієві канали можуть бути задіяні в сприйнятті мембранної жорсткості за дії низьких температур (Knight et al., 1991).

Стан цих кальцієвих каналів також може змінюватися в залежності від осмотичних характеристик цитоплазми, яка зневоднюється при утворенні позаклітинного льоду. Зазначені уявлення добре узгоджуються з даними про швидке підвищення вмісту кальцію в цитозолі у відповідь на дію низької температури (Jian et al., 1997; 1999).

Крім зміни кальцієвого гомеостазу, однією з ранніх реакцій, зумовлених підвищенням жорсткості мембран при дії холоду, може бути активація чутливої до кальцію фосфоліпази D (Тарчевский, 2002) і підвищення вмісту фосфатидної кислоти, яка бере участь в ліпідному сигналінгу (Thakur, Naayyar, 2013), а також здатна впливати на вміст багатьох інших сигнальних посередників. Припускають, що АФК, в т.ч., утворені НАДФН-оксидазою, можуть бути задіяні в передачі холодового сигналу (Awasthi et al., 2015). Підвищення активності НАДФН-оксидази і посилення утворення пероксиду водню зареєстровано як відповідь рослин кукурудзи на дію низьких позитивних температур (Piotrovskii et al., 2011). АФК, які генеруються на плазматичній мембрані, можуть впливати на стан кальцієвих каналів, гомеостаз оксиду азоту, а також на активність MAP-кіназ (Thakur, Naayyar, 2013).

Одночасно з плазматичною мембраною, де локалізована НАДФН-оксидаза (основний ферментативний генератор АФК), хлоропласти також можуть відігравати роль в сприйнятті температури навколишнього середовища. При низькій температурі дисбаланс між потужністю для збору світлової енергії і здатністю розсіювати цю енергію шляхом метаболічної активності викликає перезбудження фотосистеми II (ФС II) (ефект фотоінгібування), що призводить до

утворення АФК (Miura, Furumoto, 2013), які можуть виступати в ролі активаторів сигнальних шляхів.

Припускають, що у вищих рослин в сприйнятті холодого сигналу можуть брати участь і MAP-кінази. MAP-кіназний каскад є позитивним регулятором холодого сигналінгу у арабідопсису. Так, рослини з надекспресією МКК2 (MAP кіназа кінази 2), задіяної в активації МРК4 і МРК6, відрізняються конститутивною холодстійкістю, зумовленою активністю комплексу CBF/DREB1s, що регулює експресію генів відповіді на дегідратацію (Teige et al., 2004; Miura, Furumoto, 2013).

Таким чином, в передачі в генетичний апарат температурних сигналів задіяні біомембрани, різні протеїнкінази, кальцієві канали, АФК і ферментативні системи, що їх генерують (рис. 1.3). Цим список учасників трансдукції температурних сигналів, безумовно, не вичерпується (Markovskaya, Shibaeva, 2017).

Трансдукція холодого сигналу в генетичний апарат клітини викликає активацію комплексу протекторних систем, серед яких антиоксидантна посідає особливе місце (рис. 1.4). Поряд з антиоксидантними ферментами, низькомолекулярними антиоксидантами та сумісними осмолітами в запобіганні окислювальних пошкоджень беруть участь альтернативна оксидаза, дегідрини і, ймовірно, інші компоненти протекторних систем.



Рис 1.4. Холододоіндукована активація протекторних систем у рослин.

Пояснення до схеми. Спричинювані холододовим стресом зміни стану мембран і посилення стохастичного утворення АФК призводять до формування сигналу, що індукує експресію генів, які беруть участь у формуванні захисних відповідей (гени антиоксидантних ферментів, альтернативної оксидази, дегідринів, ферментів регенерації аскорбату і глутатіону, а також ферментів синтезу проліну та інших поліфункціональних захисних сполук).

1.3. Антиоксидантна система (АОС) та її роль в низькотемпературній адаптації

1.3.1. Ферментативні антиоксиданти. Ферментативні системи каталізують переважно детоксикацію супероксидного аніон-радикала і пероксидів. У вищих рослин, водоростей і ціанобактерій ці АФК видаляються індивідуально або кооперативно такими ферментами, як СОД, аскорбатпероксидаза, глутатіонпероксидаза, неспецифічні пероксидази (пероксидази класу III), каталаза (Alscher et al., 2002; Mittler, 2002; Tognolli et al., 2003; Kolupaev et al., 2019). Практично всі відомі ферментативні антиоксиданти (АО) беруть участь в холодовій адаптації рослин.

СОД є єдиним ферментативним АО, що знешкоджує радикальні АФК (Alscher, 2002). У багатьох роботах показано підвищення активності та посилення експресії генів різних форм СОД за холодової адаптації. Такий ефект, наприклад, виявлений у рослин різних таксономічних груп: пшениці (Дьяченко и др., 2007; Майор та ін., 2011; Kolupaev et al., 2015), вівса голого (Awasthi et al., 2015; Liu, 2013), сосни шотландської (Wlugsle et al., 1999), полуниці (Luo et al., 2011), хризантеми (Chen et al., 2014 року), огірка (Игнатенко и др., 2016).

У рослин ехінацеї активність СОД збільшувалася при помірному охолодженні і знижувалася за дії пошкоджувальних температур (Asadi-Sanam, 2015). У ячменю після охолодження до 2°C найбільш помітне підвищення активності СОД відбувалося в постстресовий період (Radyuk, 2009). Трансформанти тютюну з надекспресією гена Mn-SOD відрізнялися підвищеною холодостійкістю (Gupta et al., 1993). Встановлено більш високу експресію гена Mn-SOD у загартованої озимої пшениці порівняно з ярою (Baek, Skinne, 2003).

Вважається, що в тісній функціональній взаємодії з СОД перебуває каталаза, яка бере участь в розкладанні великих кількостей пероксиду водню (Guan, Scandalios, 2000). Показано підвищення активності ферменту при проморожуванні вівса голого (Liu et al., 2013). Холодове загартування також може викликати посилення експресії генів і підвищення активності каталази. Такий

ефект, зокрема, виявлено у рослин хризантеми. При тривалій холодовій адаптації (21 день) у цих рослин посилювалася експресія генів каталази (Chen et al., 2014).

У рослин пшениці в листках при загартуванні підвищувалася активність каталази, такий же ефект викликало і надмірне освітлення, яке індукувало розвиток морозостійкості (Janda et al., 2007). У пагонах етіюльованих проростків м'якої і твердої пшениці, жита і ячменю активність каталази в процесі холодого загартування помітно підвищувалася (Kolupaev et al., 2015). Загартувальне охолодження викликало підвищення активності ферменту і розвиток морозостійкості ехінацеї (Asadi-Sanam, 2015).

Рослини рису, трансформовані геном каталази пшениці, відрізнялися ефективною детоксикації пероксиду водню і вищою холодостійкістю порівняно з нетрансформованими рослинами (Matsumura et al., 2002).

У багатьох видів рослин у відповідь на дію холоду зареєстровано підвищення активності неспецифічної пероксидази. Такий ефект виявлений у рослин вівса за дії помірних морозів (Liu et al., 2013). За впливу загартувальної низької температури електрофоретичний спектр пероксидази розширювався у рослин пшениці (Дяченко и др., 2007). Холодове загартування викликало істотне (2-3-разове) підвищення активності пероксидази у зелених рослин і етіюльованих проростків жита (Streb et al., 1999; Kolupaev et al., 2015). Крім того, рослини жита відрізнялися вищою конститутивною активністю ферменту порівняно з менш стійкими злаками (м'якою і твердою пшеницями та ячменем) (Kolupaev et al., 2015).

При цьому істотне підвищення активності пероксидази при холодовому загартуванні відбувалося в усіх зазначених видів. Слід відзначити, що активність пероксидази, на відміну від інших антиоксидантних ферментів, підвищувалася у проростків різних видів злаків не тільки при їх загартуванні, а й після проморожування (Kolupaev et al., 2015). Схожий феномен підвищення активності пероксидази виявлений і на інших об'єктах (Sin'kevich et al., 2009).

При холодовому загартуванні рослин різних видів відбувається підвищення активності аскорбатпероксидази. Такі ефекти характерні для озимої пшениці та

інших злаків (Janda, 2003; Janda et al., 2007; Major et al., 2011), ехінацеї (Asadi-Sanam, 2015). У холодочутливих рослин ячменю при дії температури 2°C, яка ініціює підвищення вмісту АФК, відзначалося підвищення активності аскорбатпероксидази і каталази (Radyuk et al., 2009). Показано зв'язок між активністю аскорбатпероксидази і пероксидази і морозостійкістю злаків різних генотипів за умов холодого загартування (Janda, 2003; Janmohammadi et al., 2012).

Незважаючи на позитивний зв'язок між ефектами холодого загартовування і підвищенням активності аскорбатпероксидази, а також між активністю ферменту і холодостійкістю виду (сорту), в окремих дослідженнях відзначається нижча активність цього ферменту у стійких рослин порівняно з нестійкими. Так, при порівнянні реакції двох сортів полуниці на дію температури близько нуля були встановлені нижчі значення активності аскорбатпероксидази у стійкого сорту (Luo et al., 2011). Ймовірно, у цих рослин активно функціонують інші захисні системи.

У реакції рослин на гіпотермію беруть участь і ферменти метаболізму глутатіону. Так, у відповідь на дію помірних низьких температур підвищення активності глутатіонредуктази зареєстровано у рослин пшениці (Janda et al., 2007), ячменю (Radyuk et al., 2009), сосни шотландської (Wlmgsl et al., 1999). Відзначається, що у ячменю активність глутатіонредуктази особливо важлива для відновлення пулу глутатіону в постстресовий період (Radyuk et al., 2009).

1.3.2. Альтернативна оксидаза каталізує окиснення убіхіноле і відновлення молекулярного кисню до води. При цьому запобігається ймовірність утворення $O_2^{\bullet-}$ внаслідок витоку електрона від комплексу III. Поряд з цим транспорт електронів в обхід комплексу III, цитохрому *c* і комплексу IV зменшує як перевдновлення електрон-транспортного ланцюга мітохондрій, так і їх мембранний потенціал і, як наслідок, ймовірність утворення АФК (Rogov, Zvyagil'skaya, 2015; Kolupaev et al., 2019). Таким чином, альтернативну оксидазу мітохондрій можна розглядати як компонент АОС. Альтернативну оксидазу містять філогенетично різні організми: вищі рослини, водорості, більшість грибів

і деякі найпростіші (Rogov, Zvyagilskaya, 2015). Цей білок кодується ядерним геномом, має молекулярну масу 32–36 кДа і локалізується на внутрішньому боці мітохондріальної мембрани. Показано підвищення рівня експресії гена альтернативної оксидази у рослин за дії несприятливих чинників різної природи: екстремальних температур (Searle et al., 2011; Wang et al., 2011), осмотичного стресу (Smith et al., 2009; Wang, Vanlerberghe, 2013), безпосередніх агентів окиснювального стресу (Costa et al., 2010). Встановлено, що промотор гена *AOX1a* є чутливим до дії пероксиду водню (Ho et al., 2008).

Досліджено участь альтернативної оксидази у формуванні стійкості до гіпотермії. Показано підвищення рівня транскриптів, вмісту білка і активності альтернативної оксидази за дії низьких позитивних температур у рослин різних видів (Kurimoto et al., 2004; Matos et al., 2007; Grabelnych et al., 2011; Wang et al., 2011; Shi et al., 2011; Chen et al., 2014). Однак в окремих дослідженнях вказується на відсутність позитивного зв'язку між активністю ферменту і холодостійкістю рослин (Ribas-Carbo et al., 2000).

У рослин пшениці ідентифіковано два гени, що кодують альтернативну оксидазу – *WAOX1a* і *WAOX1c*, кількість транскриптів яких зростає при холодовому загартуванні (Takumi et al., 2002; Mizuno et al., 2008). Разом з накопиченням транскриптів збільшується здатність ферменту до транспорту електронів, причому більшою мірою у морозостійкої озимої пшениці порівняно з ярою (Mizuno et al., 2008).

Результати трансформації рослин арабидопсису геном пшениці *WAOX1a* свідчать на користь гіпотези про антиоксидантні функції альтернативної оксидази за низької температури (Sugie et al., 2006). Рослини арабидопсису з посиленою експресією гена *AOX1a* відрізнялися від звичайних рослин підвищеною конститутивною морозостійкістю. Однак після холодового загартування ці відмінності нівелювалися (Grabelnych et al., 2016).

З використанням етиольованих проростків пшениці показано, що загартування низькими позитивними температурами викликає індукцію синтезу альтернативної оксидази і роз'єднувальних білків, пов'язану з підвищенням

здатності альтернативної оксидази до транспорту електронів в дихальному ланцюгу мітохондрій (Grabelnych et al., 2014). В цілому компоненти енергорозсіювальної системи мітохондрій беруть участь в антиоксидантному захисті та адаптації озимих злаків до холоду і морозу (Grabelnych et al., 2014; 2016).

1.3.3. Низькомолекулярні антиоксиданти. *Аскорбат* у рослин є найпоширенішим низькомолекулярним антиоксидантом. У тканинах вищих рослин (*Arabidopsis thaliana*) його вміст становить 5 мкмоль/г сирої речовини (Kaur, Nayyar, 2014). Аскорбат має здатність безпосередньо взаємодіяти з радикальними АФК, синглетним киснем і пероксидом водню, виступати в ролі відновника при знешкодженні пероксиду водню пероксидазами і брати участь у відновленні інших низькомолекулярних антиоксидантів (Gill, Tuteja, 2010).

Є відомості про підвищення його вмісту у рослин за умов холодової адаптації. Так, відзначено збільшення кількості відновленого аскорбату у сосни шотландської (Wlugsle et al., 1999), жита (Galiba, 2013) і ячменю (Radyuk et al., 2009).

Однак позитивний зв'язок між вмістом аскорбату і стійкістю рослин до холоду проявляється не завжди. Наприклад, у більш холодостійких сортів полуниці вміст аскорбату був нижчим, ніж у слабостійких (Luo et al., 2011). Ймовірно, незважаючи на універсальність аскорбату як найбільш поширеного антиоксиданту, можливі видові і сортові особливості його участі в адаптаційних процесах. Слід відзначити, що пул аскорбату має значення не тільки для захисту рослинних клітин від окиснювальних пошкоджень в момент дії стресора, а й для відновних процесів в постстресовий період (Radyuk et al., 2009).

Глутатіон (L-γ-глутаміл-L-цістеїнілгліцин) як антиоксидант, що містить сульфгідрильні групи, може безпосередньо взаємодіяти з пероксидом водню, а також брати участь у відновленні дегідроаскорбату (Foyer, Noctor, 2009).

Для постійного видалення пероксиду водню необхідно, щоб рівень відновлених аскорбінової кислоти і глутатіону був досить високим. Для цього спільно діють декілька ферментів у так званому аскорбат-глутатіоновому циклі,

що забезпечує знешкодження пероксиду водню. Цикл включає взаємопов'язані окислювально-відновні реакції за участю аскорбату, глутатіону і НАДФН (Asada, 1999). Аскорбатпероксидаза знешкоджує пероксид, окиснюючи аскорбат до монодегідроаскорбату. Останній може відновлюватися монодегідроаскорбатредуктазою за рахунок НАДФН. Інший шлях полягає в окисненні монодегідроаскорбату до дегідроаскорбату. Для його відновлення дегідроаскорбатредуктазою використовується відновлений глутатіон (GSH). У свою чергу окиснений глутатіон відновлюється глутатіонредуктазою з використанням НАДФН (Asada, 1999).

Отримано відомості про підвищення вмісту GSH за холодової адаптації сосни шотландської (Wingsle et al., 1999), полуниці (Luo et al., 2011), ячменю (Radyuk et al., 2009) і рослин багатьох інших видів. Зазвичай показники вмісту GSH і аскорбату виявляються взаємозалежними (Galiba, 2013).

Флавоноїди є поліфенольними антиоксидантами, поширеними в рослинному світі. Різноманітність флавоноїдів величезна, їх загальна кількість досягає близько восьми тисяч сполук (Тараховский и др., 2013). Всі вони тією чи іншою мірою беруть участь в антиоксидантному захисті клітин. Відповідно до загальноприйнятої точки зору антиоксидантні властивості флавоноїдів пояснюються їх здатністю служити пастками для вільних радикалів, а також хелатувати іони металів, що беруть участь в радикальних процесах (Es-Safi et al., 2007).

Холод та інші стресові чинники істотно впливають на вміст флавоноїдів в рослинних тканинах (Babenko et al., 2019). Так, поєднання дії холоду і підвищеної освітленості призводило до збільшення вмісту безбарвних флавоноїдів (що поглинають в діапазоні УФ-В) у 2,5 раза, а антоціанів в 4 рази (Navaux, Kloppstech, 2001). Етсольовані проростки жита, що відрізняються певним рівнем конститутивної морозостійкості, містили значно більшу кількість антоціанів порівняно з нестійкими до холоду проростками пшениці (Kolupaev et al., 2016).

При холодovому загартуванні морозостійкого сорту пшениці вміст флавоноїдів зростав в 3 рази, а у нестійкого – у 1,5 раза (Olenichenko et al., 2008).

Відзначено високу кореляцію між вмістом флавоноїдів у листках і морозостійкістю злаків (Klimov, 2008). У рослин кукурудзи при впливі зниженої температури (10°C) відзначалося посилення експресії генів фенілаланінамонійліази та інших ферментів, залучених до синтезу флавоноїдів (Christie et al., 1994). Про роль антоціанів в антиоксидантному захисті свідчать дані про сильніші окиснювальні пошкодження мутантних рослин арабідопсису, що не містять антоціанів, за дії на них надлишкового освітлення та низьких температур (Navaux, Kloppstech, 2001).

1.3.4. Поліфункціональні протектори. *Розчинні вуглеводи* не тільки виконують функції сумісного осмоліту, що важливо для морозостійкості рослин, а й стабілізують біомембрани і виступають в ролі ефективних антиоксидантів (Ramel et al., 2009; Sin'kevich et al., 2009). Антиоксидантна дія цукрів може бути прямою, пов'язаною з перехопленням вільних радикалів, що показано в модельних системах, які генерують гідроксильний радикал (Morelli et al., 2003).

В ізольованих тилакоїдах інгібування тіол-регульованого ферменту циклу Кальвіна фосфорибулокінази гідроксил-радикалом запобігалось внесенням в середовище маніту (Shen et al., 1997). У рослинах арабідопсису, оброблених глюкозою або сахарозою, накопичувалося менше синглетного кисню і пероксиду водню, при цьому вони були стійкими до дії індуктора окиснювального стресу атразину (Ramel et al., 2009).

У той же час антиоксидантна дія цукрів може бути і непрямую – пов'язаною з метаболічним регулюванням компонентів антиоксидантної системи. Показана можливість індукування глюкозою багатьох генів стресової відповіді у арабідопсису, зокрема генів глутатіон-S-трансфераз і транспортерів кон'югатів глутатіону (Soueef et al., 2006). У рослин броколі синтез аскорбату активувався сахарозою. Водночас глюкоза була в цьому плані неактивною (Soueef et al., 2006).

Цілком природно, що накопичено величезний обсяг даних про підвищення вмісту цукрів за холодової адаптації рослин. Так, домінуючими водорозчинними сполуками, які накопичувались у вузлах куціння пшениці при загартуванні, є фруктани (Yoshida, Kavakami, 2013). Ефект накопичення фруктози, сахарози і

фруктанів помітно виявлявся у рослин пшениці через 3 доби загартування (Vagujfalvi et al., 1999). У рослин жита під час холодової адаптації спостерігалось досить швидке підвищення вмісту сахарози і рафінози (Koster, Linch, 1992). Показано накопичення цукрів у ріпаку за аклімації при температурі 4°C, яке виявлялося через 7 і досягало максимуму через 14 днів (Burbulis et al., 2011). У рослин арабідопсису формування морозостійкості при дії низької позитивної температури (1°C) тісно корелювало з накопиченням цукрів (Wanner, Junttila, 1999). Однак, ймовірно, не всі вуглеводи задіяні в процесі загартування. Так, при холодovому загартовуванні рослин арабідопсису вміст рафінози збільшився з 0,02 до 1,68 мкмоль/г сирової маси. Однак, трансгенні лінії, які конститутивно накопичують великі кількості рафінози, не розвивали морозостійкість (Zuther et al., 2004).

Останнім часом активно досліджується роль трегалози в адаптивних процесах. Показано підвищення морозостійкості екзогенною трегалозою, пов'язане зі стабілізацією мембран цим вуглеводом (Janmohammadi, 2012).

Отримано дані, які свідчать про те, що однією з головних складових протекторної дії цукрів в умовах гіпотермії, є їхній антиоксидантний ефект. Так, у рослин картоплі, трансформованих геном дріжджової інвертази, які містили внаслідок цього більшу кількість цукрів у листках, спостерігалася вища стійкість не тільки до холодovого, а й до окиснювального (обробка паракватом) стресів (Sin'kevich et al., 2009; 2010). При цьому підвищена стійкість забезпечувалася не ферментативною, а низкомолекулярною складовою антиоксидантного захисту, зокрема цукрами, вміст яких в клітинах рослин приблизно на чотири порядки вищий за вміст аскорбату (Sin'kevich et al., 2010).

Цукри, ймовірно, можуть чинити непрямий вплив і на інші компоненти антиоксидантної системи. Так, в їх присутності підвищувалася активність альтернативної оксидази (Borovik et al., 2014).

Пролін поєднує в собі функції осмопротектора, мембранозахисної сполуки і антиоксиданту (Liang et al., 2013; Dubrovna et al., 2020). Крім даних про здатність проліну до зв'язування вільних радикалів його антиоксидантна активність

підтверджується і в експериментах *in vivo*. Наприклад, показано, що рослини цукрової тростини, трансформовані геном Δ^1 -піролін-5-карбоксилатсинтази і здатні накопичувати велику кількість проліну, відрізнялися від звичайних рослин високою стійкістю до індуктора окиснювального стресу параквату (Molinari et al., 2007). Відомо, що наявність проліну в клітинному середовищі сприяє підвищенню розчинності білків у воді і формуванню термодинамічно стійкої їхньої структури, що важливо для стійкості до осмотичних стресів (Hassan et al., 2004), в т.ч. до зневоднення протопластів, зумовленого позаклітинним льодоутворенням. У зв'язку з цим припускають, що його накопичення поряд з цукрами може відігравати критично важливу роль в стійкості рослин до гіпотермії.

Підвищення вмісту проліну при гіпотермії зареєстровано у багатьох видів рослин: жита (Koster, Linch, 1992), пшениці (Babenko et al., 2020), рису (Aghaee, 2011), вівса (Liu et al., 2013), злакової рослини трахінії двоколоскової (Colton-Gagnon et al., 2014), бермудської трави (Zhang et al., 2010), тютюну (Konstantinova et al., 2002), хризантеми (Chen et al., 2014 року), *Jatropha curcas* (Ao et al., 2013). Для рослин деяких видів (жито, конюшина) показано підвищення вмісту проліну при ушкоджувальних, в т.ч. негативних, температурах (Svenning et al., 1997; Kolupaev et al., 2015).

Повідомляється, що в накопиченні проліну за холодової адаптації як посередник задіяний пероксид водню, що може індукувати експресію гена ключового ферменту синтезу проліну – Δ^1 -піролін-5-карбоксилатсинтази (Kocsy et al., 2011). У рослин *Jatropha curcas* зафіксована вища експресія гена і активність цього ферменту після холодового загартування (12°C), а також при ушкоджувальній температурі (1°C) (Ao et al., 2013). За холодової деаклімації ріпаку екзогенний пролін викликав підвищення вмісту цукрів і стабілізував мембрани деакліматизованих рослин при їх проморожуванні (Jonuytiene et al., 2012). Трансформанти тютюну з підвищеною експресією гена Δ^1 -піролін-5-карбоксилатсинтази відрізнялися високим вмістом проліну і високою стійкістю до гіпотермії (Konstantinova et al., 2002).

У той же час не у всіх дослідженнях підтверджується зв'язок між накопиченням рослинами проліну і розвитком їх стійкості до гіпотермії. Так, дослідження динаміки вмісту проліну в листках озимої пшениці в польових умовах показало його підвищення вже після впливу морозів (Майор та ін., 2009). Показано відсутність відмінностей у базовому вмісті проліну в листках озимої і ярої м'яких пшениць (Apostolova et al., 2008). Після холодого загартування вміст проліну збільшувався, однак відмінностей між сортами не відзначалося. У той же час в роботі Javadian і спіавт. (2010) виявлено більш істотне підвищення вмісту проліну у морозостійкого сорту озимої пшениці порівняно з менш стійким при тривалому холодому загартуванні. Показано збільшення вмісту проліну при холодому загартуванні у рослин арабідопсису, проте зв'язку між динамікою накопичення проліну і розвитком морозостійкості не виявлено (Wanner, Junttila, 1999). Автори розглядають накопичення проліну як наслідок дії на рослини низьких температур, а не причину стійкості до них. У холодостійкого генотипу рису при нормальній і зниженій температурі вміст проліну в листках і пагонах був нижчим, ніж у нестійкого (Aghaee et al., 2011). У роботі Tantau et al. (2004) показаний досить тісний зв'язок між накопиченням проліну і морозостійкістю ліній ячменю, вирощуваних *in vitro*. У більш холодостійкого генотипу суниці відзначено вищий вміст проліну за холодової адаптації, який поєднувався з меншим проявом окиснювальних пошкоджень (Luo et al., 2011). Таким чином, очевидно, у окремих видів рослин внесок проліну в антиоксидантний захист при холодому стресі може бути досить значним.

1.4. Підвищення стійкості рослин до гіпотермії дією екзогенних сигнальних сполук і фітогормонів

Формування стійкості рослин до гіпотермії за дії загартувальних температур, як зазначалося вище, включає в себе функціонування складної сигнальної мережі клітин. Зважаючи на це, можна очікувати, що обробка рослин екзогенними сигнальними сполуками може виступати у ролі сигналу, що сам по

собі підвищуватиме холодо- або морозостійкість рослин, а також сприятиме формуванню стійкості на фоні дії загартувальних температур. Захисний вплив на рослини, що зазнають дії низьких температур, може чинити і обробка стресовими фітогормонами.

Серед сполук, перспективних для використання у ролі індукторів захисних реакцій рослин за гіпотермії нині розглядаються газотрансмітери – оксид азоту і сірководень, фітогормони саліцилова і жасмонова кислоти, брасиностероїди і ряд інших сполук.

Оксид азоту. Оксид азоту став першим газотрансмітером, відкритим в клітинах тварин, коли в 1980 році було встановлено, що він утворюється в клітинах ендотелію і є сигнальною молекулою, що опосередковує судинорозширювальну дію ряду чинників (Сукманский, Реутов, 2016). Сигнальні функції NO у рослин почали вивчати через майже два десятиліття (Durner et al., 1998). У рослин оксид азоту може синтезуватися відновним або окиснювальним шляхами (Corpas, Barroso, 2017). У відновному шляху в реакціях, що відбуваються з участю нитратредуктази, нітрит–NO-редуктази або ксантиноксидоредуктази, субстратами можуть бути нітрат або нітрит (Kolupaev et al., 2019). Відновлення нітриту також може відбуватися за допомогою цитохром-с-оксидази електрон-транспортного ланцюга мітохондрій (Farnese et al., 2016).

Припускають, що окиснювальний, або L-аргінін-залежний, шлях синтезу NO аналогічний до того, що відбувається в клітинах тварин. Однак дотепер гомологи NO-синтази тварин виявлені тільки у зелених водоростей, але не у вищих рослин (Roszer, 2014). Аналізи транскриптомів показують відсутність гомологів канонічної NO-синтази у ембріофітів. При цьому припускають, що у вищих рослин все ж є білки, які в кооперації можуть генерувати NO, використовуючи як субстрат L-аргінін (Corpas, Barroso, 2017).

Встановлено, що як важлива внутрішньо- і міжклітинна сигнальна молекула, оксид азоту бере участь в регуляції клітинного циклу у рослин, процесах проростання насіння, деетіюляції, ризогенезу (Correa-Aragunde 2004; Krasnylenko et al., 2010), взаємодії рослин з симбіонтами (del Giudice et al., 2011) і

патогенами (Mamaeva et al., 2015). Показано, що оксид азоту задіяний в трансдукції сигналів, що стимулюють синтез фітогормонів, зокрема, етилену, абсцизової кислоти (АБК) і ауксину (Yemets et al., 2019). Також оксид азоту є важливим учасником у трансдукції сигналів стресових фітогормонів: АБК (Neill et al. 2008), жасмонової кислоти (Liu et al., 2005), брасиностероїдів (Karpets, Kolupaev, 2018).

Останнім часом оксиду азоту відводиться особлива роль в процесах адаптації рослин до дії абіотичних стресорів самої різної природи, зокрема, надлишкового освітлення, ультрафіолету, засолення, важких металів гіпо- і гіпертермії, (Oz et al., 2015; Yemets et al., 2019).

Роль оксиду азоту в адаптації рослин до гіпотермії належить до малодосліджених проблем стресової фітофізіології (Yemets et al., 2019). Однак в останні роки отримані дані, що свідчать про участь оксиду азоту у формуванні стійкості рослин до гіпотермії. Зокрема за впливу гіпотермії в органах рослин ряду видів (*Arabidopsis thaliana*, *Pisum sativum*, *Citrus aurantium*, *Brassica raniflora*, *Triticum aestivum*) зареєстровано підвищення вмісту NO (Zhao et al., 2009, Fancy, 2017, Yemets et al., 2019). Основним ферментатом, що генерує NO за умов впливу гіпотермії на рослини арабідопсису, є нитратредуктаза (Zhao et al., 2009).

Досліджено конкретні адаптивні реакції, які можуть формуватися за участю NO при холододовому стресі. Зокрема, встановлено, що холодоіндукована експресія гена Δ^1 -пірролін-5-карбоксилатсинтази і накопичення проліну у арабідопсису відбуваються за участю NO (Zhao et al., 2009). Ці ефекти слабо виявлялися у мутантів *nia1nia2* і пригнічувалися скавенджером NO РТІО (2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide). Також показана залежність від NO-статусу експресії таких специфічних холодочутливих генів як *CBF1*, *CBF2*, *CBF3*, *LTI30*, *LTI78*, *COR15a* (Baudouin et al., 2015; Yemets et al., 2019).

Позитивний вплив NO на холодостійкість рослин може бути пов'язаний з S-нітрозилюванням цільових білків. Так, у *Brassica jinsea* виявлено ефект диференційованого S-нітрозилювання 10 білків, серед яких і антиоксидантні ферменти – дегідроаскорбатредуктаза і глутатіон S-трансфераза (Sehrawat et al.,

2014). Також, показано підвищення активності СОД і аскорбатпероксидази внаслідок S-нітрозилювання (Puyaubert, Baudouin, 2014). Крім того, NO задіяний в посиленні експресії генів цих ферментів за холодової адаптації.

У ряді досліджень показано позитивний вплив екзогенного оксиду азоту на стійкість рослин до низьких температур. Так, обробка НПН рослин бермудської трави знижувала спричинюваний холодом вихід електролітів з тканин і запобігала підвищенню в клітинах вмісту продукту ПОЛ МДА. При цьому у рослин, оброблених донором NO, на тлі низьких температур відзначалися вищі величини активності СОД, пероксидази і каталази (Fan et al., 2015). Повідомляється про підвищення інтенсивності фотосинтезу і вмісту хлорофілу у рослин різних видів при обробці донорами оксиду азоту в умовах холодового стресу (Sami et al., 2018; Yemets et al., 2019).

Таким чином, екзогенний оксид азоту може посилювати розвиток стійкості рослин до гіпотермії. З практичної точки зору особливо перспективним видається використання донорів NO або газоподібного оксиду азоту в захищеному ґрунті, а також при низькотемпературному зберіганні плодів і овочів (Yemets et al., 2019).

Сірководень. Сірководень (H_2S), поряд з монооксидом азоту (NO) і монооксидом вуглецю (CO), належить до ключових молекул-газотрансміттерів в клітинах рослин і тварин (Yamasaki, Cohen, 2016; Singh et al., 2020). Активація адаптивних реакцій рослин є одним з найбільш яскравих фізіологічних ефектів сірководню (Shi et al., 2015). Однак механізми індукування стрес-протекторних систем рослин під впливом H_2S , безпосередні мішені його дії, сигнальні і гормональні посередники, що забезпечують фізіологічні ефекти, дотепер залишаються маловивченими.

Основний механізм генерації сірководню у рослин пов'язаний з перетворенням L-цистеїндесульфгідразою (КФ 4.4.1.1) L-цистеїну на піруват з вивільненням H_2S і NH_3 (Romero et al., 2013). Можливий і синтез сірководню з D-цистеїну за дії D-цистеїндесульфгідрази (КФ 4.4.1.15) (Guo et al., 2016).

За впливу на рослини арабідопсису (Shi et al., 2015) і винограду (Fu et al., 2013) низьких температур спостерігали посилення експресії генів L/D-

цістеїндесульфгідраз і генерації H_2S . У листках огірка під впливом температури $4^\circ C$ також показано посилення синтезу сірководню (Liu et al., 2019).

Вплив екзогенного H_2S на стійкість рослин до низьких температур досліджений слабо. Показано підвищення морозостійкості *Cynodon dactylon* (L.) за обробки NaHS (Shi et al., 2013). Фумігація H_2S , який вивільняється з NaHS, плодів банана при низькотемпературному зберіганні підвищувала їх лежкість і зменшувала накопичення продукту ПОЛ МДА (Luo et al., 2015). При цьому обробка H_2S викликала підвищення активності фенілаланінамонійліази і загального вмісту фенольних сполук. Крім того, в плодах збільшувалася активність СОД, пероксидази, каталази, аскорбатпероксидази і глутатіонредуктази. Також підвищення стійкості плодів банана при низькотемпературному зберіганні під дією H_2S пов'язують зі змінами метаболізму проліну: підвищенням активності Δ^1 -піролін-5-карбоксилат-синтетази і зниженням активності проліндегідрогенази (Luo et al., 2015).

Саліцилова кислота (СК) бере участь у регуляції багатьох фізіологічних програм і процесів, зокрема, проростання насіння, цвітіння, синтезу інших гормонів, фотосинтезу, дихання, транспірації, термогенезу, реакції на інфікування патогенами і адаптації до дії різних стресорів (Vlot et al., 2009; Janda et al., 2014). Це дає підстави розглядати саліцилати як один з класів фітогормонів.

СК у рослин синтезується ізохоризматним і фенілпропаноїдним шляхами (Saleem, 2020). Однак, в обох гілках використовується хоризмат, отриманий з шкімової кислоти. Хоризмат в цитоплазмі може перетворюватися на фенілаланін. Біосинтез СК за фенілпропаноїдним шляхом починається з перетворення фенілаланіну на *транс*-коричну кислоту під дією фенілаланінамонійліази. *Транс*-корична кислота потім може перетворюватися на два різних метаболіти: *орто*-кумарову кислоту і бензальдегід. *Орто*-кумарова кислота перетворюється безпосередньо на СК, а бензальдегід спочатку перетворюється на бензойну кислоту альдегідоксидазою. В кінцевому підсумку бензойна кислота за допомогою гідроксилази перетворюється на СК. Ізохоризматний шлях функціонує в пластидах: спочатку ізохоризматсинтаза1

перетворює хоризмат на ізохоризмат, а потім ізохоризмат перетворюється на СК за допомогою ізохоризматпіруватліази.

У ряду видів рослин виявлено накопичення СК та глікозилату СК у відповідь на дію низьких температур (Wang et al., 2006; Janda et al., 2014).

Екзогенна СК підвищувала стійкість молодих рослин пшениці до низьких температур, що виявлялося у зменшенні прояву окиснювального стресу. При цьому під впливом СК посилювалося накопичення транскриптів генів антиоксидантних ферментів (СОД, каталази, пероксидази) і підвищувалася їх активність. Також під впливом СК зафіксовано підвищення вмісту проліну в проростках (Ignatenko et al., 2019). Обробка саліцилатом рослин огірка за впливу низької позитивної температури індукувала посилення експресії гена і зростання активності альтернативної оксидази (Lei et al., 2010). Також в експериментах з проростками огірка показано посилення експресії генів антиоксидантних ферментів та їх активності і підвищення вмісту аскорбату і відновленого глутатіону (Pan et al., 2020).

Жасмонова кислота (ЖАК) поряд СК також нині розглядається як один зі стресових фітогормонів (Kolupaev, Yastreb, 2021). Значна увага приділяється її дослідженню як фактора регуляції росту і розвитку рослин (Ali et al., 2020; Jang et al., 2020), а також як сигналу, що активує експресію захисних генів рослин в процесі патогенезу (Васюкова, Озерецковская, 2009). Останніми роками накопичено значний обсяг інформації, що свідчить і про важливу роль ЖАК в адаптації рослин до абіотичних стресорів (Kolupaev, Yastreb, 2021).

Синтез ЖАК відбувається в результаті послідовного перетворення ненасичених жирних кислот під впливом ферментів, локалізованих в пластидах, пероксисомах і цитоплазмі (Feussner, 2002; Wasternack, 2007; Li et al., 2018).

У рослин арабідопсису і рису виявлено збільшення кількості ЖАК у відповідь на дію холоду, також встановлена холодоіндукована експресія генів, причетних до синтезу ЖАК – ліпоксигенази, аленоксидсинтази та аленоксидциклази (Kolupaev, Yastreb, 2021).

Обробка рослин арабідопсису метил-жасмонатом підвищувала морозостійкість як в поєднанні з холодовою акліматизацією (загартування протягом тижня при 4°C), так і без неї (Hu et al., 2017). Водночас дефектні за жасмонатним сигналінгом (*jar1* і *coil*) або за синтезом ЖАК (*lox2* і *aos*) рослини відрізнялися зниженою морозостійкістю. Також встановлено конкретний механізм участі жасмонатного сигналінгу в регуляції експресії генів, важливих для морозостійкості. Показано, що білки-репресори передачі сигналів ЖАК JAZ пригнічують транскрипційну функцію ICE і сигнальний шлях ICE-CBF/DREB1, під контролем якого перебуває синтез цілого ряду білків COR (cold regulated protein), необхідних для адаптації до низьких температур (Hu et al., 2017; Kolupaev, Yastreb, 2021). При цьому екзогенна ЖАК або синтезована в результаті холодового загартування, індуючи деградацію білків JAZ, знімає блок з сигнального шляху ICE-CBF/DREB1, що контролює експресію генів *COR*.

Попередня обробка рослин огірка метил-жасмонатом зменшувала ушкоджувальний ефект низької позитивної температури, що проявлялося в меншому гальмуванні ростових процесів і зниженні інтенсивності окиснювального стресу (Игнатенко и др., 2020).

У прикладних дослідженнях, пов'язаних з пошуком способів зменшення пошкоджень плодів при низькотемпературному зберіганні, показано підвищення екзогенним метилжасмонатом стійкості до низьких температур плодів різних видів рослин: цукіні, манго, гуави, солодкого перцю, томатів, граната, персика, мушмули та інших (Kolupaev, Yastreb, 2021).

Брасиностероїди (БС) – клас рослинних полігідроксистероїдів, структурно споріднених до стероїдних гормонів тварин. Нині виділено і отримано у чистому вигляді близько 70 природних БС, що мають загальний 5 α -холестановий скелет. Висока біологічна активність встановлена лише для деяких представників БС, включаючи брасинолід, 24-епібрасинолід і 28-гомобрасинолід (Wajguz, 2011). БС відіграють ключову роль в підтриманні нормального росту рослин як в оптимальних умовах, так і за дії стресорів (Колупаєв та ін., 2020). Накопичений значний обсяг даних, які свідчать про те, що модифікація сигнального шляху БС

може бути одним із результативних напрямів вирішення проблеми адаптації сільськогосподарських культур (Грабовская, Бабенко, 2020). Показано, що БС викликають розвиток ряду адаптивних реакцій, серед яких особливо важливими є активація антиоксидантної системи, регуляція вмісту низькомолекулярних протекторів (проліну, поліамінів, гліцинбетаїну та ін.), а також посилення синтезу стресових білків, у т.ч., дегідринів.

Про роль брасиностероїдів у стійкості рослин до низьких температур свідчить зростання їх ендogenous вмісту за дії цього чинника, зареєстроване на прикладі деяких видів рослин. Так, вплив температури $+8^{\circ}\text{C}$ на проростки кукурудзи спричиняв підвищення вмісту ендogenous БС в перші три доби адаптації, при цьому рівень 24-ЕБЛ зростав у 16 разів, 28-ГБЛ – на два порядки, брасиноліду у 8 разів (Кравец и др., 2011).

У проростків кукурудзи за обробки 24-ЕБЛ зафіксовано посилення інтенсивності біосинтезу білків за умов гіпотермії (Скатерная и др., 2012). Обробка БС підвищувала стійкість винограду до охолодження (Chen et al., 2019). Автори асоціюють такий ефект зі змінами під впливом БС функціонування аскорбат-глутатіонового циклу, що є компонентом антиоксидантної системи. Збільшення активності антиоксидантних ферментів та активація утворення низькомолекулярних антиоксидантів за гіпотермії показані у рослин огірка, попередньо оброблених БС (Bartwal, Arora, 2020). Важливою складовою захисної дії БС за умов гіпотермії може бути посилення синтезу флавоноїдів, у тому числі антоціанів (Planas-Riverola et al., 2019).

Встановлено, що БС беруть участь у регуляції не лише холодо-, а й морозостійкості. Рослини арабідопсису, дефектні за генами сигналінгу БС, були чутливими до дії негативних температур, незважаючи на холодове загартування. Виявлено, що БС шляхом активації транскрипційного фактора CBF1 можуть спричиняти експресію генів реакції на холод *COR* (Eremina et al., 2017). БС-індуковане зростання холодостійкості включає в себе накопичення білків BZR1 та BES1 у дефосфорильованих формах, які сприяють транскрипції генів *CBF*, що необхідно для розвитку холодостійкості (Li et al., 2017).

Також показано підвищення холодостійкості окремих видів за дії комерційних препаратів з діючою речовиною 24-ЕБЛ. Так, встановлено, що передпосівна обробка насіння солодкого перцю (*Capsicum annuum* L.) препаратом Епін-екстра сприяла збільшенню його схожості за зниженої температури (Будыкина и др., 2013). Схожий ефект Епіну-екстра показаний і на молодих рослинах огірка (Будыкина и др., 2012).

Висновки до розділу 1

Незважаючи на підвищення середньорічної температури, яке стабільно спостерігається на планеті уже кілька останніх десятиліть, актуальність проблеми холодо- і морозостійкості рослин не тільки не знижується, а й зростає. Останніми роками в Україні та інших країнах відзначається велика амплітуда температур в зимовий і весняний періоди від високих до низьких, а у найближчому майбутньому прогноуються аномально холодні зими з різкими перепадами температур і браком снігового покриву. Зважаючи на це, пізнання механізмів адаптації рослин до гіпотермії має не тільки важливе фундаментальне, але й прикладне значення.

Нині досягнуто певного розуміння механізмів кріопошкодження рослин. Порушення функціональної активності біомембран (насамперед внутрішніх мембран хлоропластів і мітохондрій) в результаті переходу їх ненасичених жирних кислот з рідинно-кристалічного в стан гелю вважається однією з причин пошкоджень теплолюбних рослин за низьких позитивних температур (Лось, 2005).

За дії від'ємних температур у рослин відбувається утворення льоду в міжклітинниках. Таке явище дозволяє їм уникнути летального утворення льоду всередині клітин.

Окиснювальний стрес розглядається як одна зі складових холодового ушкодження рослин. За дії на рослини від'ємних температур принаймні однією з причин посилення утворення АФК може бути порушення функцій

біомакромолекул і мембранних комплексів внаслідок зневоднення, зумовленого утворенням позаклітинного льоду.

Антиоксидантна система, що забезпечує контроль вмісту АФК, є важливою протекторною системою, необхідною для виживання рослин за екстремальних низьких температур. Численними дослідженнями, виконаними на рослинах різної таксономічної належності, показані ефекти активації АОС при загартуванні і помірному холодовому стресі. Встановлено роль комплексу антиоксидантних ферментів і низькомолекулярних антиоксидантів у холодovій адаптації. Особливе значення для стійкості рослин до низьких температур мають пролін, цукри і деякі інші сполуки, що проявляють поряд з антиоксидантними осмопротекторний, мембранопротекторний і шаперонний ефекти.

Антиоксидантна система є багатокомпонентною. Її складові перебувають у функціональній взаємодії, особливості якої почали активно вивчати тільки в останні роки. Водночас внесок тих чи інших захисних систем у розвиток стійкості може істотно відрізнятись у рослин різних видів. У зв'язку з цим скринінг донорів стійкості для потреб селекції можливий тільки з урахуванням видових особливостей функціонування антиоксидантної та осмопротекторної систем.

Антиоксидантна, а також інші протекторні системи рослин, можуть бути індуковані дією екзогенних сигнальних посередників і стресових фітогормонів.

Попри те, що прояв властивості холодо- і морозостійкості на рівні цілої рослини в природних умовах може істотно відрізнятись від такого на модельних об'єктах і в факторостатних умовах, прийоми індукування стійкості рослин екзогенними сполуками з урахуванням їх видових особливостей можуть виявитись ефективними. Це зокрема стосується дії донорів газотрансмітерів (оксиду азоту, сірководню) та стресового фітогормону саліцилової кислоти, а також інших сполук та їх комбінацій.

Зважаючи на викладене, у дисертаційній роботі здійснено комплексну порівняльну оцінку функціонування антиоксидантної й осмопротекторної систем культурних злаків з різним рівнем морозостійкості – озимих пшениці, жита і тритикале. Особливу увагу приділено особливостям стану цих систем у

тритикале, оскільки можливий зв'язок між функціонуванням протекторних систем і морозостійкістю сортів цієї зернової культури дотепер майже не досліджувався. Стан антиоксидантної системи злаків вивчався з урахуванням можливості використання його як одного з маркерів для скринінгу морозостійкості матеріалу для потреб селекції.

Окремий блок досліджень стосувався впливу на стан антиоксидантної та осмопротекторної систем озимих злаків донорів газотрансмітерів – оксиду азоту і сірководню. Порівняльних досліджень їх дії на злаки з різним рівнем морозостійкості (жито, пшениця) досі не проводилося. Також вивчали вплив комбінованої обробки насіння донором NO і саліциловою кислотою як можливий ефективний практичний прийом індукування стійкості рослин, передусім на ранніх стадіях розвитку.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛ, УМОВИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Коротка характеристика об'єктів досліджень

В основній частині досліджень використовували проростки пшениці м'якої (*Triticum aestivum* L., сорт Досконала), жита посівного (*Secale cereale* L., сорт Пам'ять Худоєрка), тритикале (\times *Triticosecale* Wittmack, сорти Раритет, Букет, Олександра дворучка, Підзимок харківський). Нижче наводяться короткі відомості про вказані сорти злаків за даними Каталогу сортів та гібридів сільськогосподарських культур селекції Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України (<https://yuriev.com.ua/ua/katalog-produkcii/katalog/>) та Лабораторії селекції і фізіології пшениці озимої цього ж Інституту.

Пшениця м'яка озима сорту Досконала. Сорт універсального типу використання, один з найменш вимогливих до умов вирощування. Вирізняється витривалістю до пізніх строків сівби. Має високу зимостійкість. Середньостиглий, середньорослий, стійкий до вилягання сорт. Середня урожайність за 2017-2020 рр. на дослідних ділянках ІР ім. В.Я. Юр'єва 6,34 т/га.

Тритикале озиме сорту Букет. Сорт універсального призначення, зимостійкість висока (8-9 балів), стійкий до посухи. Середня урожайність 5,68-9,56 т/га.

Тритикале озиме сорту Раритет. Сорт хлібопекарського призначення, середньостиглий. Зимостійкість вища від середньої (7,5 бала). Середня урожайність 5,88 т/га.

Тритикале дворечка сорту Олександра. Сорт неморозостійкий, середня урожайність за 2018-2020 рр. на дослідних ділянках ІР ім. В.Я. Юр'єва 5,35 т/га.

Тритикале дворучка сорту Підзимок харківський. Сорт неморозостійкий, середня урожайність за 2017-2020 рр. на дослідних ділянках ІР ім. В.Я. Юр'єва 6,63 т/га.

2.2. Пророщування зернівок і умови холодого загартування та кріостресу рослин

Зернівки досліджуваних злаків після 30-хвилинного знезараження в 6% розчині пероксиду водню пророщували протягом 3 діб при температурі 20°C на водопровідній воді, очищеній з використанням системи водопідготовки, що включає в себе фільтр механічного очищення, вугільний фільтр і напівпроникну зворотноосмотичну мембрану з розміром комірок 1 нм. Потім проростки поміщали на 6-7 діб в камеру, обладнану компресорно-конденсаторним агрегатом Danfoss Optima (Нідерланди), для загартування в темряві за температури 2-4°C (Kolupaev et al., 2015).

Після закінчення загартування температуру у камері знижували зі швидкістю 1 градус/год і витримували проростки при температурах діапазону від -5 до -9°C протягом 5 годин. Надалі температуру підвищували зі швидкістю 1 градус/год до 2°C, потім проростки відрощували протягом 3 діб при температурі 20°C і освітленні 6000-7000 лк та визначали відносну кількість зразків, що вижили за їх здатністю до росту. Як контроль використовували 4-денні незагартовані проростки. Оскільки при низькій температурі розвиток проростків уповільнюється, 10-денні загартовані рослини за ростовими показниками відповідали 4-денним, вирощеним при температурі 20°C. Пагони загартованих та незагартованих проростків використовували для біохімічних аналізів. Окремі показники визначали також у пагонах проморожених проростків (див. нижче).

Оцінку морозостійкості рослин у фазі кущіння проводили за ДСТУ 4749:2007 (2008). Насіння висівали у наповнені ґрунтовою сумішшю ящики оптимальні для сівби озимих культур строки. Впродовж осінньо-зимового періоду рослини розміщували на вегетаційному майданчику в природних умовах вирощування й загартування.

Проморожування рослин проводили в низькотемпературних камерах в січні-лютому, знижуючи температуру зі швидкістю 1 градус/год. Експозиція

проморожування – 24 години. Після проморожування рослини в ящиках розморожували впродовж доби за температури не вище 5°C, після чого їх переносили в теплицю, зрізали листки так, щоб залишились листкові пластинки довжиною 0,5 см, і відрощували за температури 20-22°C при освітленні 8000 лк. Через 20 діб проводили обліки та вираховували відсоток живих рослин у зразку.

До живих відносили тургорні, зелені рослини, приріст листків яких за період відрощування становив не менше 5 см. В інших випадках рослину вважали нежиттєздатною. Отримані результати виражали у відсотках живих рослин до їх загальної кількості в кожному повторенні. Температура, за якої відсоток живих рослин до їх загальної кількості був близьким до 50, вважали критичною температурою вимерзання даного сорту (ЛТ₅₀).

2.3. Обробка рослинного матеріалу екзогенними індукторами стійкості (донорами H₂S, NO, саліциловою кислотою)

Для дослідження впливу донора сірководню на стійкість проростків до кріостресу на початку пророщування насіння і на третю добу в середовище додавали гідросульфід натрію (NaHS) в концентраціях діапазону 0,025-1 мМ.

В експериментах з дослідження впливу NO на стійкість до кріостресу проводили праймування насіння шляхом занурення на 1 годину в розчин донора NO НПН в концентраціях діапазону 0,1-2 мМ, зразки контрольного варіанта витримували 1 год в дистильованій воді. В окремих серіях дослідів як додатковий контроль використовували так званий «виснажений» НПН – розчин продуктів розкладання цієї сполуки, які не можуть продукувати NO (Mamaeva et al., 2015). Його одержували шляхом витримання розчину НПН у відкритому посуді на світлі (8000 лк) протягом двох діб. Показано, що навіть при помірному освітленні період напіврозпаду НПН у розчинах становить 9-12 год (Floryszak-Wieczorek et al., 2006).

В експериментах з вивчення комбінованого впливу саліцилової кислоти та NO насіння досліджуваних варіантів занурювали на 1 год в розчини саліцилової

кислоти (1-100 мкМ), НПН (50-200 мкМ) або їх суміші, насіння контрольного варіанта витримували 1 год в дистильованій воді.

Через 3 доби етіюльовані проростки поміщали на 6-7 діб в холодильну камеру (без освітлення) з температурою 2-4°C, потім піддавали проморожуванню, як описано вище. В окремих серіях дослідів оцінювали морозостійкість незагартованих проростків за ідентичною методикою проморожування.

2.4. Біохімічні показники

2.4.1. Антиоксидантні ферменти. Наважки пагонів гомогенізували на холоді в 0,15 М К, Na-фосфатному буфері (рН 7,6) з додаванням ЕДТА (0,1 мМ) і дитіотреїтолу (1 мМ). Для досліджень використовували супернатант після центрифугування гомогенату при 8000 g протягом 10 хв. при 4°C (Kolupaev et al., 2015).

Активність цитозольних форм СОД (КФ 1.15.1.1), визначали за рН реакційної суміші 7,6, використовуючи метод, заснований на здатності ферменту конкурувати з нітросиним тетразолієм за супероксидні аніон-радикали, які утворюються внаслідок аеробної взаємодії НАДН і феназинметосульфату. Активність каталази (КФ 1.11.1.6) аналізували за рН реакційної суміші 7,0 за кількістю пероксиду водню, розкладеного за одиницю часу. Активність пероксидази (КФ 1.11.1.7) визначали, використовуючи гваякол як донор водню, і H_2O_2 як субстрат. За допомогою К, Na-фосфатного буферу рН реакційної суміші доводили до 6,2. Активність СОД і пероксидази виражали у відносних одиницях зміни оптичної густини/(мг білка хв), активність каталази – в мкмоль H_2O_2 /(мг білка хв.). В окремих експериментах активність ферментів виражали у розрахунку на грам сухої або сирі речовини рослинного матеріалу.

2.4.2. Аналіз активності фенілаланінамонійліази (ФАЛ). Активність ферменту визначали за утворенням *транс*-коричної кислоти з L-фенілаланіну за методикою, описаною Zucker (1965), з модифікаціями (Адамовская и др., 2007).

Пагони проростків гомогенізували в 0,1 М боратному буфері (рН 8,8), що містив 0,5 мМ ЕДТА і 3 мМ дитіотреїтолу при температурі не вище 4°C, після чого екстрагували протягом 30 хв при такій же температурі. Гомогенат центрифугували при 8000 g протягом 20 хв при 4°C. Супернатант використовували для визначення ферментативної активності. Реакційну суміш, що складалася з 0,5 мл супернатанту, 1,5 мл боратного буферу (рН 8,8) і 2 мл 50 мМ L-фенілаланіну, інкубували в термостаті протягом 1 год при 37°C. Одразу після закінчення інкубації визначали оптичну густина при 290 нм. Оптичним контролем слугувала ідентична реакційна суміш з додаванням ферментної витяжки, інактивованої кип'ятінням. Активність ФАЛІ виражали в нмоль *транс*-коричної кислоти/(мг білка × год). Для розрахунків використовували коефіцієнт екстинкції *транс*-коричної кислоти, що дорівнює $10000 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (Zucker 1965).

2.4.3. Вміст білків. Загальний вміст розчинних білків в пробах визначали за Bradford, використовуючи як стандарт бичачий сироватковий альбумін (Bradford, 1976).

2.4.4. Низькомолекулярні сполуки. *Сумарний вміст цукрів* в проростках визначали методом Моріса-Рое з використанням антронового реактиву (Zhao et al., 2003) з модифікаціями (Kolupaev et al., 2015). Цукри екстрагували з рослинного матеріалу дистильованою водою при 10-хвилинному нагріванні на киплячій водяній бані. Освітлення екстракту проводили шляхом додавання в пробірки рівних об'ємів (0,3–0,4 мл) 30%-ного розчину сульфату цинку і 15%-ного розчину жовтої кров'яної солі. Проби фільтрували через паперовий фільтр. За необхідності фільтрат перед вимірюванням розбавляли дистильованою водою в кілька разів. У реакційні пробірки додавали 3 мл антронового реактиву і 1 мл фільтрату, в контрольну пробу замість фільтрату вносили дистильовану воду. Після цього проби кип'ятили протягом 7 хв на водяній бані з подальшим охолодженням до кімнатної температури. Світлопоглинання визначали відносно контрольного розчину при 610 нм. Як стандарт використовували D-глюкозу.

Вміст проліну в пагонах проростків визначали за методом Бейтса зі співавт. (Bates et al., 1973) з модифікаціями. Пролін вилучали з рослинного матеріалу

дистильованою водою з наступним 10-хвилинним кип'ятінням, екстракт фільтрували і до порцій фільтрату додавали однакові об'єми нінгідринового реактиву та льодяної оцтової кислоти і кип'ятили проби протягом 1 год на водяній бані. Світлопоглинання забарвленого продукту визначали при довжині хвилі 520 нм. Як стандарт використовували L-пролін.

Загальний вміст фенольних сполук визначали за допомогою реактиву Фоліна (Запрометов, 1971). Наважку рослинного матеріалу (200 мг) розтирали в 6 мл 70% 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 відносно набору реактивів без рослинного матеріалу. Як стандарт використовували хлорогенову кислоту. Рослинний матеріал гомогенізували в 70% етанолі, екстракцію проводили протягом 20 хв при кімнатній температурі. Екстракт змішували з 1%-ним розчином $AlCl_3$ в 95%-ному етанолі в пропорції 1:1 і визначали його оптичну густину при 414 нм відносно зразка, який містив всі компоненти суміші, крім солі алюмінію. Як стандарт використовували рутин.

Для визначення вмісту флавоноїдів, що мають максимум поглинання в УФ-В області, і антоціанів наважки етіюльованих проростків гомогенізували в 1% розчині HCl в метанолі. Після центрифугування гомогенату при 8000 g протягом 15 хв визначали оптичну густину супернатанту при довжинах хвиль 530 нм і 300 нм (Nogues, Baker, 2000).

2.4.5. Інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ). Інтенсивність ПОЛ в тканинах проростків визначали за кількістю продуктів, що реагують з 2-тіобарбітуровою кислотою (в основному це малоновий діальдегід – МДА) (Fazlieva et al., 2012). 300 мг рослинного матеріалу гомогенізували в 10 мл реакційного середовища (0,25%-на тіобарбітурова і 10%-на трихлороцтова кислоти) Переносили в пробірки закривали фольгою і кип'ятили 30 хв. на водяній бані. Потім охолоджували і центрифугували 20 хв за 8000 g. Оптичну густину

розчину визначали при 532 нм. Також враховували неспецифічне світлопоглинання, яке визначали при 600 нм.

2.5. Повторення і статистична обробка результатів експериментів

Експерименти проводили у 3-4-разовому біологічному повторенні. Кожне біологічне повторення являло собою середню пробу (наважку) для біохімічних аналізів, що формувалася не менш ніж з 6 проростків. При визначенні морозостійкості проростків і рослин у фазі кущіння кожна проба містила не менше 30 рослин. При цьому кожен експеримент, що проводився у 3-4 разовому біологічному повторенні, відтворювали незалежно не менше 3-х разів.

Статистичну обробку результатів проводили стандартними методами. Вірогідність відмінностей між варіантами оцінювали за критерієм Ст'юдента за $P \leq 0,05$. В окремих експериментах для оцінки вірогідності відмінностей використовували дисперсійний аналіз.

Для оцінки зв'язку між станом антиоксидантної системи в цілому і морозостійкістю досліджуваних проростків злаків проводили нормування до діапазону від 0 до 1 показників виживаності проростків і морозостійкості рослин та всіх досліджуваних у відповідних серіях експериментів показників стану антиоксидантної системи: активності СОД, каталази і пероксидази, вмісту цукрів, проліну, антоціанів і флавоноїдів. Для цього середні величини кожного показника досліджуваного сорту перетворювали за формулою (Суринов и др., 2018):

$$y(x) = (x - x_{\min}) / (x_{\max} - x_{\min}),$$

де $y(x)$ – нормований показник значення x , x_{\min} і x_{\max} – мінімальні та максимальні значення перетворених показників. Для розрахунку інтегрального показника антиоксидантного статусу обчислювали суму нормованих величин семи показників для кожного сорту. Таким же способом визначали інтегральні величини для низькомолекулярних протекторних сполук (сума нормованих показників вмісту цукрів, проліну, антоціанів і флавоноїдів) та ферментативної складової антиоксидантної системи (сума нормованих показників активності

СОД, каталази і пероксидази). Надалі ці сумарні величини так само нормували за формулою, наведеною вище.

На рисунках і в таблицях наведені середні значення та їх стандартні похибки.

РОЗДІЛ 3. ОСОБЛИВОСТІ ФУНКЦІОНУВАННЯ АНТИОКСИДАНТНОЇ ТА ОСМОПРОТЕКТОРНОЇ СИСТЕМ ЖИТА, ТРИТИКАЛЕ І ПШЕНИЦІ

Як зазначалося, антиоксидантна система включає в себе комплекс ферментів (СОД, каталазу, різні пероксидази, ензими аскорбат-глутатіонового циклу) і ряд низькомолекулярних сполук (аскорбінова кислота, глутатіон, флавоноїдні сполуки, антиоксиданти, розчинні в ліпідах - α -токоферол, β -каротин і ін.) (Gill, Tuteja, 2010; Kolupaev et al., 2019). В останні роки показано, що істотний внесок в антиоксидантний захист клітин вносять і деякі сполуки, для яких антиоксидантні функції не вважаються основними, зокрема розчинні вуглеводи (Sin'kevich et al., 2009) і пролін (Liang et al., 2013). Ці сполуки у багатьох видів за умов холодової адаптації накопичуються в значних кількостях (Koster et al., 1992; Sin'kevich et al., 2010). У ряді досліджень показаний прямий зв'язок між накопиченням цукрів і проліну і стійкістю окремих видів рослин до гіпотермії (Burbulis et al., 2011; Luo et al., 2011). З іншого боку, на деяких об'єктах подібного зв'язку не виявлено (Apostolova et al., 2008).

У той же час показано, що на ранніх фазах розвитку у рослин жита, що відрізняються від інших злаків, у т.ч. озимої пшениці, певним рівнем конститутивної морозостійкості, виявляються специфічні особливості функціонування антиоксидантної системи. Для них характерні висока активність пероксидази, вмісту проліну і антоціанів, що мають високу антиоксидантну активність (Kolupaev et al., 2016).

Як модельний об'єкт зернових злаків, поряд з пшеницею і житом, для дослідження функціонування протекторних систем, що зумовлюють морозостійкість, становить інтерес міжродовий гібрид тритикале (\times *Triticosecale* Wittm.). Як зазначалося, його сучасні озимі сорти перевершують сорти пшениці не тільки за морозостійкістю, а й за продуктивністю (Рибалка та ін., 2015). Проте функціонування антиоксидантної системи тритикале у зв'язку з морозостійкістю вивчене недостатньо. У ряді робіт, виконаних з використанням польських сортів,

показано підвищення активності СОД, каталази, неспецифічної пероксидази і аскорбатпероксидази за холодової адаптації тритикале (Golebiowska, 2011; Szechynska-Hebda et al., 2015; Gawronska, Gołebiowska-Pikania 2016). Встановлено, що в період перезимівлі в природних умовах у вузлах кущіння тритикале вміст проліну був вищим, ніж у пшениці, але нижчим, ніж у жита (Катышева и др., 2015). Однак комплексне порівняння функціонування ферментативних і низькомолекулярних складових антиоксидантної системи у пшениці, жита і тритикале за умов адаптації до холоду дотепер не проводилося.

Зважаючи на це, зіставляли основні показники функціонування антиоксидантної системи етіолованих проростків тритикале з відповідними параметрами жита і пшениці у звичайних умовах і за холодового загартування.

Проростки пшениці і тритикале практично не виявляли конститутивної морозостійкості і після 5 год. охолодження при -6°C майже повністю гинули (табл. 3.1).

Таблиця 3.1. Вживаність (%) проростків озимих злаків після проморожування при температурах -6 і -9°C протягом 5 год.

Вид	Температура проморожування	
	-6°C	-9°C
Без загартування		
<i>Secale cereale</i>	$23,6 \pm 1,8$	-
\times <i>Triticosecale</i>	$0,5 \pm 0,2$	-
<i>Triticum aestivum</i>	0,0	-
Після загартування		
<i>Secale cereale</i>	$73,9 \pm 2,7$	$67,5 \pm 2,0$
\times <i>Triticosecale</i>	$72,2 \pm 2,4$	$63,1 \pm 3,3$
<i>Triticum aestivum</i>	$65,5 \pm 3,5$	$48,6 \pm 2,4$

У той же час після такого впливу близько 24% незагартованих проростків жита зберігали життєздатність. Після загартування морозостійкість проростків всіх трьох видів підвищувалася. За впливу температури -6°C відмінності між злаками були незначними. Однак після проморожування при -9°C вживаність проростків пшениці була помітно нижчою порівняно з тритикале та житом (табл. 3.1).

Конститутивна активність СОД в проростках трьох видів істотно не відрізнялася (рис. 3.1, А). Після холодого загартування зростала активність ферменту в проростках пшениці. У інших злаків відзначалася лише тенденція до незначного підвищення активності СОД після загартування.

Активність каталази за оптимальної температури вирощування в проростках злаків трьох видів вірогідно не відрізнялася (рис. 3.1, Б). Загартування спричиняло вірогідне при $P \leq 0,05$ підвищення активності ферменту у пшениці і тенденцію до її збільшення у тритикале та жита.

Базова активність пероксидази у жита була значно вищою, ніж у пшениці і тритикале (рис. 3.1, В). У той же час у тритикале вона була нижчою, ніж у пшениці.

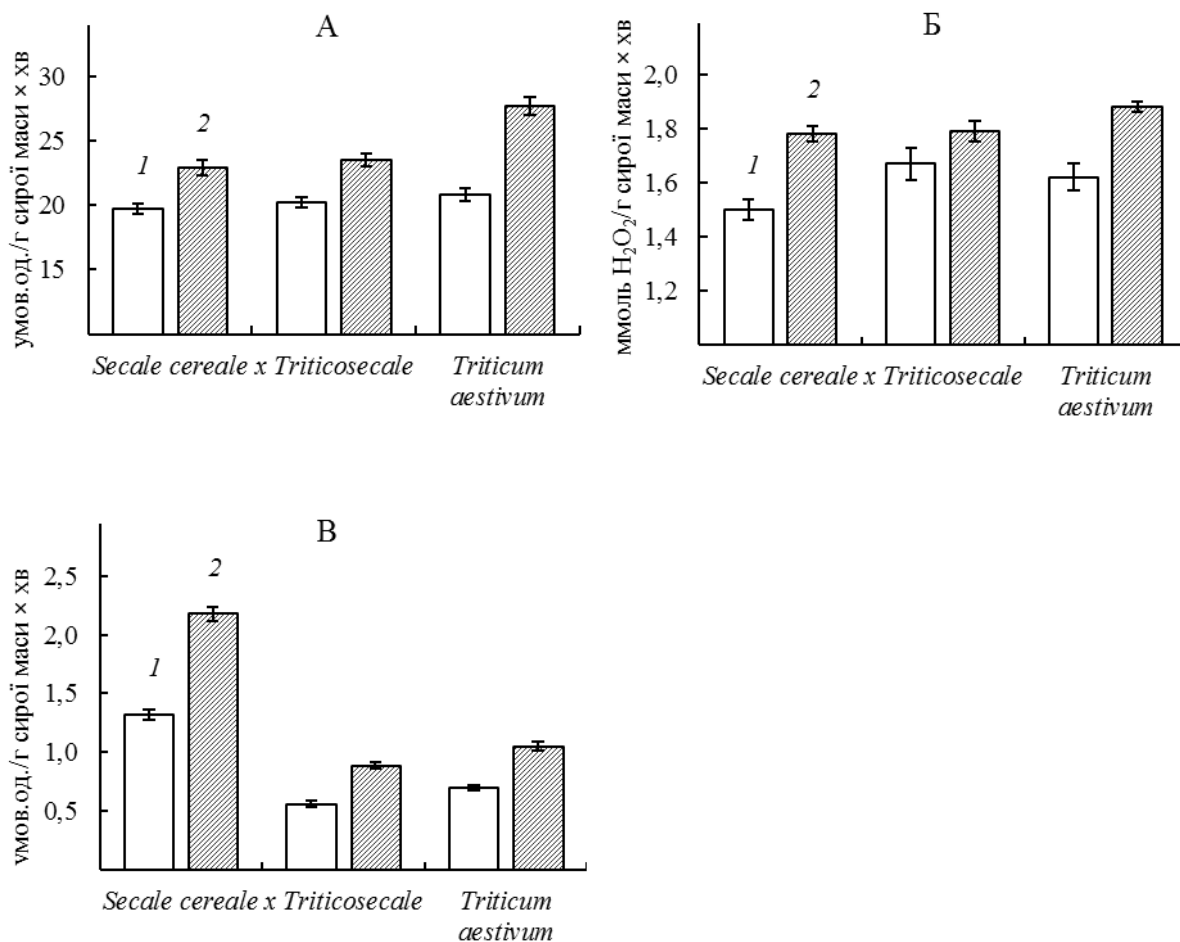


Рис. 3.1. Активність СОД (А), каталази (Б) і пероксидази (В) в проростках злаків. 1 – контроль; 2 – загартування.

Після холодового загартування активність ферменту підвищувалася в проростках всіх трьох видів. При цьому показник активності пероксидази у жита перевищував такі у пшениці і тритикале більш ніж у два рази.

Конститутивний вміст цукрів в проростках жита і тритикале був помітно вищим, ніж у пшениці (рис. 3.2, А). Загартування викликало підвищення вмісту цукрів в проростках трьох видів, пропорційне до його кількості, виявленої до загартування.

За звичайних умов вміст проліну в проростках жита був більш ніж у 2,5 рази вищим, ніж пшениці (рис. 3.2, Б). Кількість проліну у проростків тритикале незначно перевищувала відповідну величину, характерну для проростків пшениці. Загартування викликало підвищення вмісту проліну в усіх трьох зразках. Найбільш високі величини абсолютного вмісту проліну спостерігалися у рослин жита.

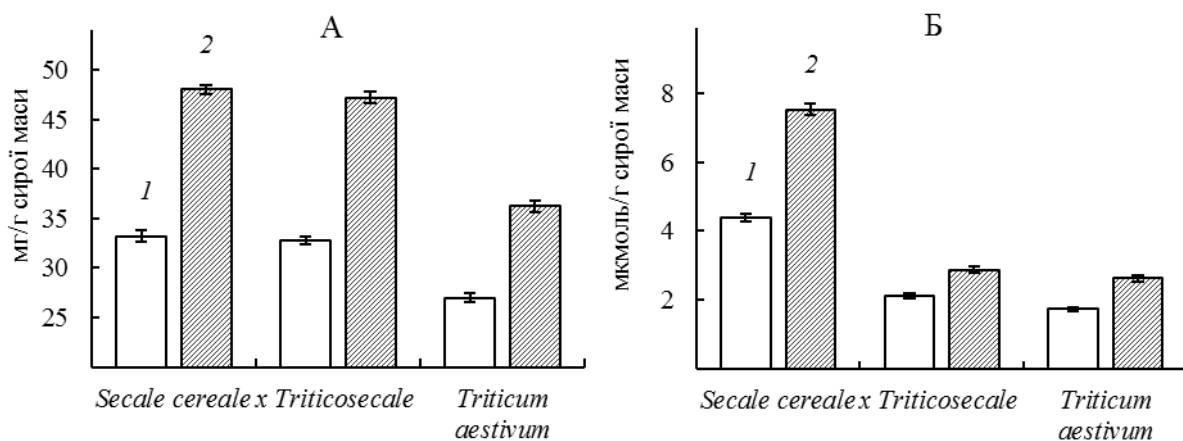


Рис. 3.2. Вміст цукрів (А) і проліну (Б) в проростках злаків. 1 – контроль; 2 – загартування.

Базовий вміст антоціанів в проростків жита приблизно в п'ять разів перевищував такий у пшениці (рис. 3.3, А). У тритикале він був вдвічі вищим, ніж у пшениці. Після загартування вміст антоціанів підвищувався в 1,4-1,5 рази в усіх трьох видів злаків.

Вміст безбарвних флавоноїдів також був вищим у жита і тритикале (рис. 3.3, Б). У цих видів він зростав після загартування, в той час як у пшениці цей показник майже не змінювався.

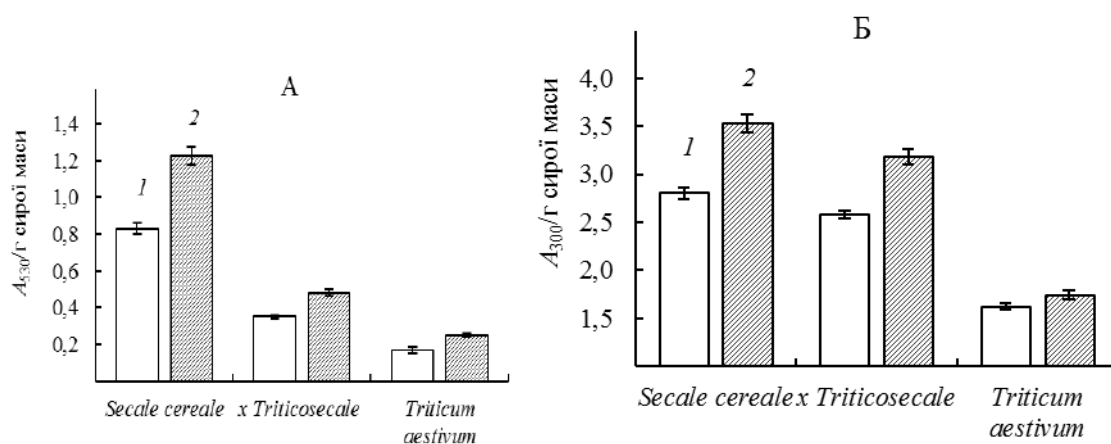


Рис. 3.3. Вміст антоціанів (А) і флавоноїдів (Б) в проростках злаків. 1 – контроль; 2 – загартування.

Отже, у етіюльованих проростків жита, пшениці та тритикале виявлялися помітні відмінності у функціонуванні протекторної антиоксидантної системи у звичайних умовах і після холодового загартовування. У незагартованих проростків жита відзначалися високі показники вмісту проліну, антоціанів, флавоноїдів, що поглинають в області УФ-В, а також активності пероксидази (рис. 3.1-3.3). Можна вважати, що високий рівень зазначених показників зумовлює наявність у проростків жита конститутивної морозостійкості. У проростків тритикале така стійкість практично не виявлялася (табл. 3.1).

Однак в загартованому стані їх резистентність наближалася до морозостійкості жита і значно перевершувала таку пшениці. Підвищена стійкість тритикале до низьких температур частково може бути пов'язана з більш ефективним функціонуванням антиоксидантної системи. Так, в умовах наших експериментів для тритикале був характерним підвищений у порівнянні з пшеницею вміст безбарвних флавоноїдів, антоціанів і цукрів (рис. 3.2, 3.3).

У той же час всі ці показники антиоксидантної активності у тритикале були нижчими, ніж у проростків жита. Крім того, у проростків тритикале активність

пероксидази була набагато нижчою, ніж у проростків жита. Більше того, ця активність у тритикале була навіть нижчою, ніж у пшениці.

В цілому можна говорити про більш істотний внесок низькомолекулярних протекторів у прояв морозостійкості проростків злаків порівняно з ферментативними антиоксидантами. Досліджені нами низькомолекулярні захисні сполуки є поліфункціональними. Так, пролін поєднує функції одного з основних сумісних осмолітів рослинної клітини з функціями антиоксиданту (Szabados, Savoure, 2010). Також пролін розглядається як низькомолекулярний шаперон (Liang et al., 2013), який може брати участь в підтриманні нативної структури ферментів, в т.ч. антиоксидантних.

Існує гіпотеза, згідно з якою пролін може виступати і у ролі метаболічного сигналу, що регулює окиснювально-відновний гомеостаз і експресію деяких генів стресової відповіді у рослин (Hossain et al., 2014). Однак експериментальних доказів участі проліну в регуляції експресії генів, причетних до адаптивних реакцій рослин, поки що недостатньо.

Проте пролін може відігравати дуже важливу роль в адаптації до холоду, деяких видів рослин, зокрема жита. У ряді досліджень, виконаних в лабораторних і польових умовах, з рослинами на різних фазах розвитку, показано його участь у формуванні та підтриманні морозостійкості (Koster et al., 1992; Katysheva et al., 2015). Так, при тривалій холодівій аклімації жита вміст проліну зростає майже в 10 разів (Koster et al., 1992). При цьому, як уже зазначалося, базовий вміст проліну у рослин жита істотно вищий, ніж у пшениці і тритикале (рис. 3.2, Б).

Загальновідома роль цукрів у захисті рослинних клітин від шкідливої дії гіпотермії. Давно з'ясовано, що за гіпотермії (впливу загартовувальних температур) у злакових відбувається накопичення вуглеводів у формі поліфруктозанів, насамперед в вузлах кушіння (Bancal, Gaudillere, 1989). Зниження температури нижче 0°C спричиняє у озимих злаків гідролітичне розщеплення накопичених при загартуванні олігосахаридів, що зумовлює додаткове збільшення в клітинах концентрації моно- і дисахаридів (Kolupaev, Trunova, 1994; Livingston III, Henson, 1998).

Однією з головних функцій вуглеводів, що накопичуються при стресах, вважається їх антиденатураційна дія на білково-ліпідні компоненти клітин, які зазнають дегідратації або впливу інших альтеруючих чинників (Колупаєв, Трунова, 1992). Як зазначалося, поряд з осмопротекторними, антиденатураційними і мембранопротекторними властивостями цукрів притаманні і антиоксидантні властивості, зумовлені здатністю зв'язувати вільні радикали (Sin'kevich et al., 2009). Вміст цукрів в рослинних клітинах значно вищий від кількості «спеціалізованих» антиоксидантів, що дає підстави говорити про помітний внесок цукрів в систему антиоксидантного захисту рослин.

Ймовірно, накопичення цукрів має важливе значення для формування морозостійкості проростків тритикале (рис. 3.2, А). Їх кількість у цієї культури була практично такою ж, як і у жита і значно перевершувала цей показник у проростків пшениці. З іншого боку, в польових умовах вміст цукрів у вузлах кущіння рослин тритикале протягом зими був нижчим, ніж у жита і незначно перевищував їх кількість у пшениці (Поморцев, 2013). Не виключено, що внесок цукрів у морозостійкість тритикале на різних фазах розвитку рослин може бути неоднаковим, також можливі сортові відмінності.

Ще однією групою сполук, важливих для формування морозостійкості злаків, можуть бути різні флавоноїди, в т.ч. антоціани і безбарвні флавоноїди, які поглинають в області УФ-В. Вони накопичувалися у великих кількостях у жита і тритикале (рис. 3.3). Ймовірно, що всі флавоноїди тією чи іншою мірою беруть участь в антиоксидантному захисті клітин.

У порівняльних експериментах були отримані дані про дуже високу антиоксидантну активність флавоноїдів, яка помітно перевершує активність інших антиоксидантів. Так, показано, що ефективність взаємодії флавоноїдів з АФК в чотири рази вища, ніж у аскорбінової кислоти і α -токоферолу (Khlestkina et al., 2013). Окремо слід відзначити високу антиоксидантну активність антоціанів, в т.ч. їх безбарвних таутомерів, які здатні ефективно інактивувати супероксидні аніон-радикали (Neill, Gould, 2003). Показано підвищення вмісту антоціанів і флавоноїдів, що мають максимум світлопоглинання при 350 нм, у рослин

арабідопсису за дії низької температури та надлишкового освітлення (Navaux, Kloppstech, 2001; Munne-Bosch et al., 2002).

Підвищення загального змісту флавоноїдів зареєстровано і за низькотемпературної адаптації пшениці (Olenichenko et al., 2008). У рослин сорго і кукурудзи при гіпотермії також індукувався синтез антоціанів (Shichijo, 1993; Christie et al., 1994).

Для підтвердження зв'язку вказаних біохімічних показників, зокрема, підвищеного вмісту флавоноїдів і проліну з морозостійкістю проростків озимих злаків необхідні дослідження ряду сортів, що розрізняються за морозостійкістю. Їх результати наводяться у розділі 4.

Висновки до розділу 3

Проведено порівняння показників функціонування антиоксидантної і осмопротекторної системи етіюльованих проростків озимих сортів жита, тритикале і пшениці у фізіологічно нормальних умовах і після холодого загартування. Активність СОД і каталази у незартованих злаків трьох видів істотно не відрізнялися. У той же час активність пероксидази у жита була набагато вищою, ніж у пшениці і тритикале. Загартування спричиняло значне підвищення активності СОД у пшениці і менш істотне у проростків жита і тритикале. Активність пероксидази після загартування підвищувалася у всіх злаків.

Вміст цукрів у незагартованих проростків жита і тритикале істотно перевищував такий у пшениці. Після холодого загартування він пропорційно підвищувався в усіх трьох злаків. Базовий вміст проліну у жита був значно вищим, ніж у пшениці і тритикале. Загартування викликало істотне підвищення його вмісту у жита і менш помітне у інших злаків.

Найбільший вміст антоціанів спостерігався у проростків жита, а найменшим він був у пшениці. Після загартування він підвищувався у всіх досліджуваних злаків. Вміст безбарвних флавоноїдів, що поглинають в УФ В, за звичайних умов

і після дії загартовувальної температури у жита і тритикале був вищим, ніж у пшениці.

Таким чином, в антиоксидантний захист жита більший внесок вносять висока активність пероксидази та вміст проліну, а тритикале – підвищений вміст флавоноїдів і цукрів. У той же час у пшениці під час холодової адаптації більш істотно змінювалася активність антиоксидантних ферментів – СОД і каталази.

Необхідно відзначити, що пролін і цукри є мультифункціональними захисними речовинами. Вони, крім антиоксидантної функції, виконують мембранопротекторну функцію, а також є основними осмопротекторними сполуками. Підвищений вміст одночасно проліну і цукрів у жита і цукрів у тритикале може бути однією з причин їх вищої порівняно з пшеницею морозостійкості.

РОЗДІЛ 4 ЗВ'ЯЗОК МІЖ МОРОЗОСТІЙКІСТЮ СОРТІВ ТРИТИКАЛЕ І СТАНОМ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ

Як відзначалося у розділі 3, детального вивчення змін стану антиоксидантної системи, особливо вмісту низькомолекулярних антиоксидантів, при адаптації до гіпотермії генотипів тритикале з різною морозостійкістю дотепер не проводилося. Зважаючи на це, досліджували зв'язок між вмістом низькомолекулярних протекторів з антиоксидантними властивостями, активністю ключових антиоксидантних ферментів, резистентністю до окиснювального стресу і морозостійкістю сортів тритикале.

У роботі використовували чотири сорти тритикале з різною морозостійкістю: Букет і Раритет (озимі високоморозостійкі), Олександра (озимий неморозостійкий) та Підзимок харківський (неморозостійкий, що належить до «дворучок»).

1.1. Морозостійкість проростків тритикале

Проростки досліджуваних сортів тритикале практично не виявляли конститутивної морозостійкості. Виживаність зразків сортів Букет і Раритет після 5-годинного проморожування за температури -6°C становила близько 2%, а проростки сортів Олександра і Підзимок харківський гинули повністю (табл. 4.1).

Після проморожування загартованих проростків при -6°C виживало понад 50% зразків високо морозостійких сортів Букет і Раритет. Сорт Олександра виявляв нижчу стійкість, найнижчою (до 15 %) була виживаність проростків сорту Підзимок харківський. Після впливу температури -9°C виживаність загартованих проростків була дуже низькою, хоча сортові відмінності зберігалися (табл. 4.1).

Таблиця 4.1. Вживаність проростків тритикале після проморожування, %.

Сорт	Температура проморожування	
	-6°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±1,1	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.

Для виявлення зв'язку між морозостійкістю сортів тритикале і їх стійкістю до окиснювального стресу оцінювали вміст продукту ПОЛ МДА у зразках звичайних та стресових умовах.

Таблиця 4.2. Вміст МДА (нмоль/г сірої речовини) у проростках тритикале.

Сорт	Без загартування	Після загартування (6 діб при 2-4°C)	Після проморожування загартованих проростків (6 год при -6°C)
Букет	21,7 ± 0,9 (ab)	19,8 ± 0,6 (bc)	20,4 ± 0,5 (bc)
Раритет	17,8 ± 0,7 (bc)	16,5 ± 0,4 (c)	16,5 ± 0,6 (c)
Олександра	23,6 ± 0,8 (ab)	22,0 ± 0,5 (b)	25,7 ± 0,7 (a)
Підзимок харківський	18,9 ± 1,0 (bc)	18,2 ± 0,4 (c)	20,8 ± 0,4 (b)

Примітка: Тут і на рис. 4.2 і 4.3 однаковими латинськими літерами позначені величини, відмінності між якими не вірогідні за $P \leq 0,05$.

Кількість МДА у незагартованих проростків різних сортів дещо відрізнялася (табл. 4.2). Після загартування відзначалася тенденція до зниження вмісту МДА у морозостійких сортів Букет і Раритет.

Оскільки після проморожування пошкодження і загибель проростків виявлялися не одразу, було проаналізовано вміст МДА в проростках через 1 добу після кріостресу, коли візуальних пошкоджень не спостерігалось. При цьому у сортів Букет і Раритет кількість МДА після проморожування не змінювалася, в той час як у нестійких Олександра і Підзимок Харківський цей показник зростає, що свідчить про розвиток окислювальних ушкоджень.

Таким чином, отримані дані щодо вмісту МДА у пагонах проростків через 1 добу після проморожування (табл. 4.2) узгоджуються з результатами прямої оцінки морозостійкості проростків тритикале (табл. 4.1) і вказують на роль саме окиснювального стресу у розвитку пошкоджень, завданих дією негативних температур.

4.2. Активність антиоксидантних ферментів

За відсутності загартування активність СОД у різних сортів тритикале відрізнялася не істотно, виняток становили нижчі значення активності у сорту Олександра (рис. 4.1, А). Загартування спричиняло значне підвищення активності ферменту тільки у морозостійких сортів Букет і Раритет, при цьому їх абсолютні значення активності СОД істотно перевищували такі у сортів Олександра і Підзимок харківський.

Активність каталази у незагартованих проростків різних сортів відрізнялася незначно (рис. 4.1, Б). Нижчі величини були характерні для сорту Раритет, однак у цього сорту відзначалося вірогідне підвищення активності ферменту після загартування. Тенденції до збільшення активності каталази при загартуванні (відмінності не значимі за $P \leq 0,05$) спостерігалися і у сортів Букет і Олександра. У той же час у сорту Підзимок харківський активність ферменту істотно не змінювалася. В цілому абсолютні величини активності каталази після загартування у різних сортів істотно не відрізнялися (рис. 4.1, Б).

За відсутності загартування вищі значення активності пероксидази були характерні для сортів Букет і Олександра (рис. 4.1, В). Загартування викликало тенденцію до підвищення активності ферменту в усіх сортах, крім сорту Букет.

При цьому однак достовірних при $P \leq 0,05$ сортових відмінностей за активністю пероксидази зафіксувати не вдалося.

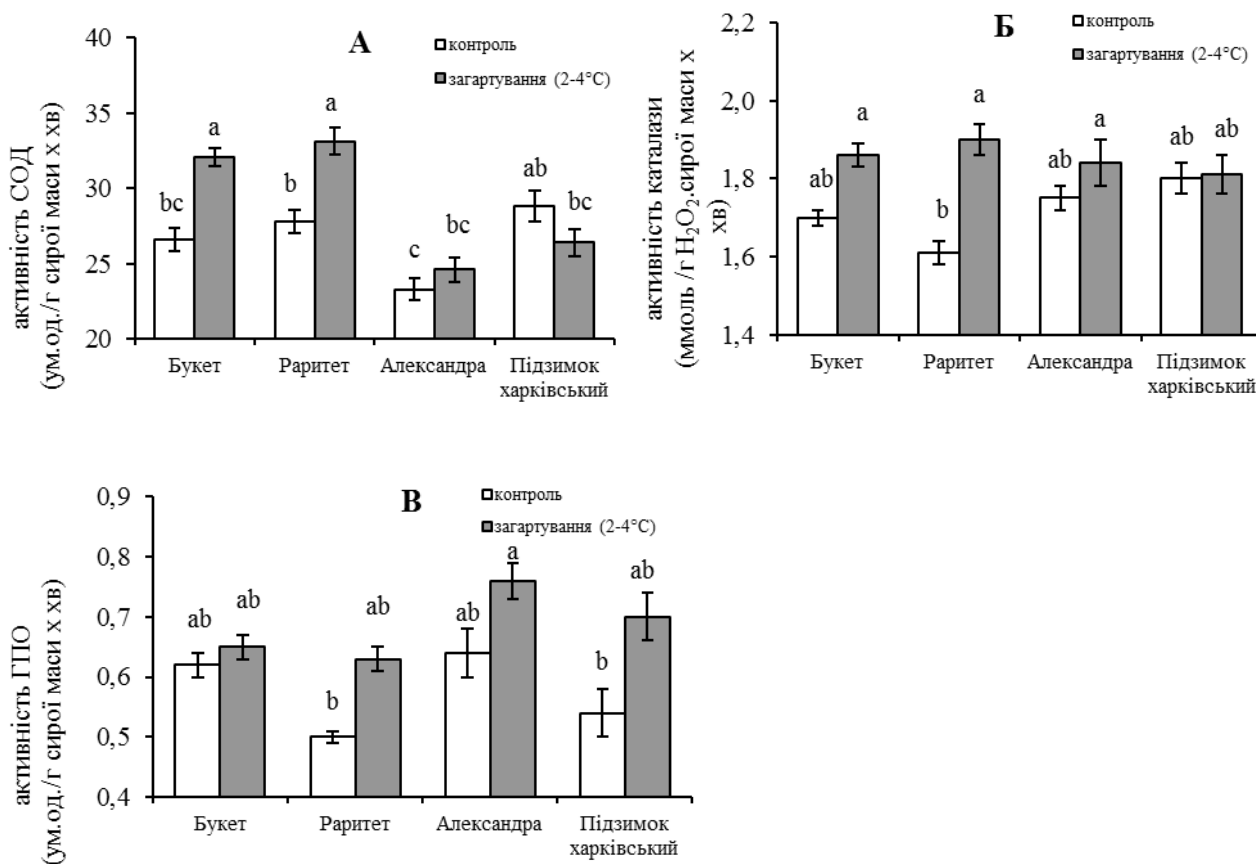


Рис. 4.1. Активність СОД (А), каталази (Б) і пероксидази (В) в проростках тритикале.

Тут і на рис. 4.2 однаковими латинськими літерами позначені величини, відмінності між якими не вірогідні за $P \leq 0,05$.

4.3. Вміст мультифункціональних протекторів

Для незагартованих проростків був характерним високий вміст цукрів у сорту Олександра і низький у сорту Підзимок харківський (рис 4.2, А). У незагартованих проростках сортів Букет і Раритет вміст цукрів мав середні значення. Після загартування вміст цукрів збільшувалася у всіх сортів, однак у сорту Підзимок харківський він був помітно нижчим у порівнянні з іншими генотипами.

У незагартованих проростків вищі в порівнянні з іншими сортами значення вмісту проліну спостерігалися у сорту Раритет (рис. 4.3, Б). Після загартування він збільшувався в усіх сортів, однак у сорту Олександра величини були істотно нижчим, ніж у трьох інших сортів.

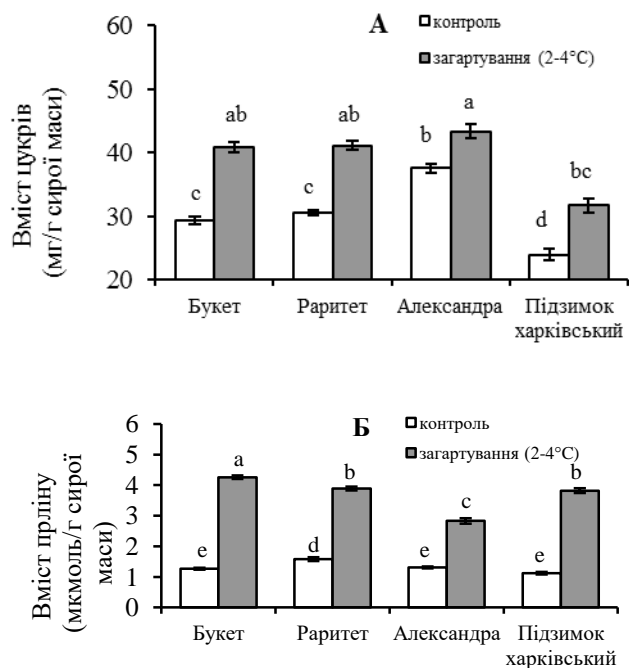


Рис 4.2. Вміст цукрів (А) і проліну (Б) в проростках тритикале.

4.4. Вміст вторинних метаболітів

Незважаючи на інтерес до вторинних метаболітів як сполук з антиоксидантною і мембрано-протекторною активністю, їх роль у стійкості рослин до гіпотермії досліджена недостатньо. Показано, що при зниженні температури у рослин сорго індукувався синтез антоціанів (Shichijo et al., 1993). У листках рослин кукурудзи вміст антоціанів також підвищувався не тільки за стресових температур, а й при відносно невеликому відхиленні температури від оптимуму (Christie et al., 1998). За таких умов відзначалося посилення експресії генів фенілаланінамонійліази та інших ферментів, залучених до синтезу флавоноїдів (Christie et al., 1994). Водночас значення флавоноїдних сполук у

прояві морозостійкості тритикале різних генотипів досі залишалося не дослідженим.

Зважаючи на це, аналізували загальний вміст фенольних сполук, флавоноїдів і окремо кількість антоціанів за умов холодowego загартування проростків сортів тритикале з різною морозостійкістю.

Базовий сумарний вміст фенольних сполук у проростках різних генотипів тритикале не відрізнявся (рис. 4.3). Дещо нижчим він був у найменш стійкого сорту Підзимок харківський, проте ця відмінність від інших сортів не була вірогідною за $P \leq 0,05$.

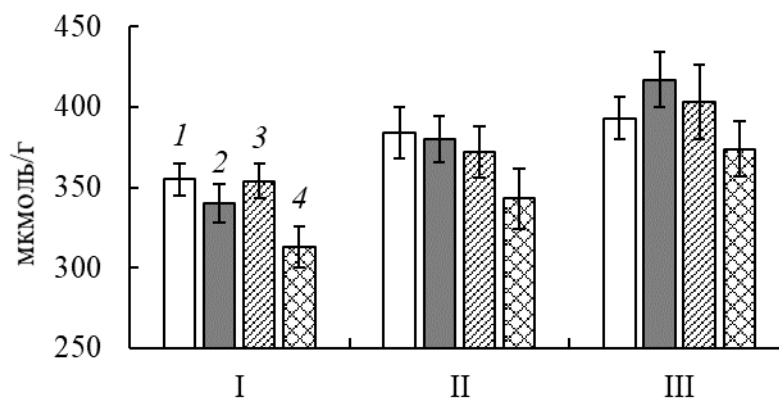


Рис. 4.3. Зміна вмісту фенольних сполук (мкмоль хлорогенової кислоти/г сухої речовини) у проростках тритикале в процесі холодowego загартування.

I – без загартування; II, III – відповідно через 2 і 6 діб загартування за температури 2–4°C; 1 – Букет; 2 – Раритет; 3 – Олександра; 4 – Підзимок харківський.

У процесі загартування виявлялася тенденція до зростання вмісту фенольних сполук у проростках, однак цей ефект для всіх досліджених сортів був вірогідним лише за $P < 0,1$. Відмінності між окремими сортами за вмістом фенольних сполук після загартування також не були значимими (рис. 4.3).

Сумарний вміст флавоноїдів у незагартованих проростках різних генотипів істотно не відрізнявся (рис. 4.4). Через 2 доби впливу загартувальної температури їх кількість змінювалася мало, проте через 6 діб загартування загальний вміст

флавоноїдів у проростках усіх досліджуваних сортів зростав в 1,7-1,9 раза. При цьому вірогідних сортових відмінностей не виявлено.

Вміст антоціанів у проростках різних генотипів за контрольних умов відрізнявся, найвищим він був у сорту Букет (рис. 4.5). Через 2 доби загартування цей показник вірогідно зростав у всіх чотирьох сортів. При цьому морозостійкі сорти Букет і Раритет відрізнялися істотно вищим вмістом антоціанів порівняно з нестійкими сортами Олександра і Підзимок харківський. Триваліше загартування приводило до подальшого зростання вмісту антоціанів у проростках усіх досліджуваних сортів.

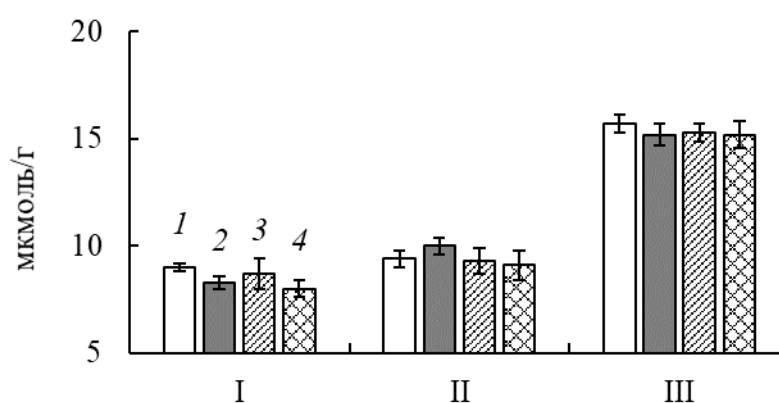


Рис. 4.4. Зміна вмісту флавоноїдів (мкмоль рутину/г сухої речовини) у проростках тритикале в процесі холодого загартування.

I – без загартування; II, III – відповідно через 2 і 6 діб загартування за температури 2–4°C; 1 – Букет; 2 – Раритет; 3 – Олександра; 4 – Підзимок харківський.

Водночас абсолютні величини у найменш стійкого сорту Підзимок харківський були помітно нижчими порівняно з трьома іншими сортами (рис. 4.5).

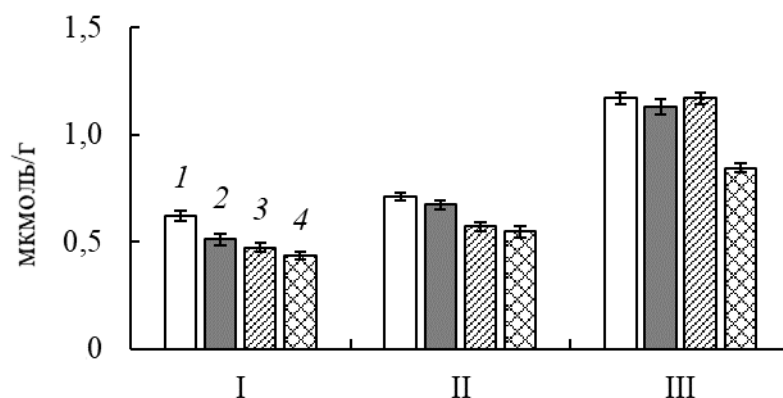


Рис. 4.5. Зміна вмісту антоціанів (мкмоль ціанідину /г сухої речовини) у проростках тритикале в процесі холодного загартування.

I – без загартування; II, III – відповідно через 2 і 6 діб загартування за температури 2–4°C; 1 – Букет; 2 – Раритет; 3 – Олександра; 4 – Підзимок харківський.

Таким чином, в цілому формування морозостійкості проростків тритикале супроводжується змінами у вторинному метаболізмі.

При цьому сумарний вміст фенольних сполук, який визначають за їх взаємодією з реактивом Фоліна, в процесі загартування збільшувався слабо, сортових відмінностей за цим показником також не виявлено. Значно помітнішими в процесі загартування проростків були зміни загального вмісту флавоноїдів, однак зростання цього показника під час загартування майже не залежало від морозостійкості сортів.

Отже, є підстави вважати, що флавоноїди причетні до формування стійкості проростків тритикале до кріостресу. Не виключено, що сортові відмінності у тритикале можуть бути виявлені при визначенні лише певних флавоноїдних сполук, а не їх сумарного вмісту. Зокрема, в наших експериментах виявлено накопичення проростками тритикале антоціанів (рис. 4.5). При цьому навіть у незагартованих проростків тритикале виявлялися сортові відмінності. Найпомітнішими вони були через 2 доби від початку загартування, коли вміст антоціанів у морозостійких сортів Букет і Раритет істотно перевищував такий у нестійких Олександра і Підзимок харківський. За тривалішого загартування ці

відмінності частково нівелювалися, хоча для найменш стійкого сорту був характерний найнижчий вміст антоціанів.

Ймовірно антоціани є одними з найважливіших вторинних метаболітів для процесу холодового загартування тритикале, а можливо й інших злаків. Як уже зазначалося, саме антоціани мають вкрай високу антиоксидантну активність і здатні ефективно деактивувати супероксидні аніон-радикали (Neill et al., 2003)

Отже, є підстави для висновку про певний внесок антоціанів і можливо, інших флавоноїдів, але не вторинних метаболітів загалом, у процесі 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, що функціонально взаємодіють з прооксидантами і між собою (Kolupaev et al., 2019).

Зважаючи на це, на наступному етапі роботи (розділ 5) досліджували зв'язок між середніми нормованими величинами антиоксидантної активності і морозостійкістю зразків злаків, що були представлені сортами жита, тритикале і пшениці.

Висновки до розділу 4

Встановлено, що після холодового загартування проростків тритикале різних генотипів у них відбувалося зниження вмісту продукту ПОЛ МДА, що опосередковано вказує на активацію антиоксидантної системи. Водночас ефект зростання вмісту МДА після ушкоджувального проморожування був характерним для проростків неморозостійких сортів тритикале, у стійких сортів зміни вмісту МДА після кріостресу були незначними. Це свідчить про роль окиснювального стресу у розвитку пошкоджень, спричинюваних дією холоду.

Після загартування проростків при 2–4 °С у морозостійких сортів тритикале Букет і Раритет підвищувалася активність СОД і каталази, у менш стійких – Олександра і Підзимок харківський – активність цих ферментів змінювалася

менш істотно. У той же час у цих сортів після загартування більш помітно зростала активність пероксидази.

У загартованих проростків сортів Букет, Раритет і Олександра вміст цукрів був значно вищим, ніж у сорту Підзимок харківський. Вміст проліну у відповідь на холодове загартування підвищувався в усіх сортів, при цьому абсолютні значення у сортів Букет, Раритет і Підзимок харківський були істотно вищими, ніж у сорту Олександра.

Вміст фенольних сполук у незагартованих проростків різних генотипів відрізнявся слабо, лише у сорту Підзимок харківський він був дещо нижчим порівняно з іншими досліджуваними генотипами. Загартування спричиняло невеликий підйом сумарного вмісту фенольних сполук в усіх досліджуваних сортів. Загальна кількість флавоноїдів у незагартованих проростків різних генотипів відрізнялася слабо. Шестидобове загартування спричиняло підвищення вмісту флавоноїдів у проростках усіх досліджуваних сортів на 1,7–1,9 раза при цьому істотних сортових відмінностей не відзначалося. Вміст антоціанів у незагартованих проростків різних сортів відрізнявся: найвищим він був у сорту Букет, а найнижчим – у сорту Підзимок харківський. В процесі холодового загартування він зростав і досягав приблизно однакових величин у сортів Букет, Раритет і Олександра, проте у найменш морозостійкого сорту Підзимок харківський цей показник був значно нижчим. Такі результати свідчать про помітний внесок антоціанів, але не вторинних метаболітів в цілому, у систему антиоксидантного захисту проростків тритикале при низьких температурах.

В цілому, отримані результати свідчать про відсутність чітких зав'язків між величинами окремих показників стану антиоксидантної системи і морозостійкістю сортів тритикале і вказують на необхідність пошуку інтегральних маркерів стану цієї системи.

РОЗДІЛ 5. КОРЕЛЯЦІЯ МОРОЗОСТІЙКОСТІ ОЗИМИХ ЗЛАКІВ З ІНТЕГРАЛЬНИМИ НОРМОВАНИМИ ПОКАЗНИКАМИ ВМІСТУ НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНИХ ПРОТЕКТОРНИХ СПЛУК І АКТИВНОСТІ АНТИОКСИДАНТНИХ ФЕРМЕНТІВ

У двох попередніх розділах нами описано базовий та індукований холодним загартуванням стан антиоксидантної системи озимих пшениці, жита і кількох сортів тритикале та зроблено акценти на найбільш помітних відмінностях окремих показників у різних видів і сортів. Водночас відзначалося, що окремо взяті показники активності певних антиоксидантних ферментів або вмісту низькомолекулярних антиоксидантів чи поліфункціональних сполук не мають чітко вираженого зв'язку з морозостійкістю видів і сортів.

Неоднозначність зв'язків між вмістом або активністю окремих антиоксидантів і морозостійкістю рослин ймовірно зумовлена насамперед складною функціональною взаємодією між окремими групами антиоксидантів (Kolupaev et al., 2019). Зокрема, у деяких роботах зафіксовано реципрокні зв'язки між вмістом цукрів і активністю СОД у рослин (Sin'kevich et al., 2009), між вмістом інших низькомолекулярних сполук (проліну, флавоноїдів) і активністю антиоксидантних ферментів (Radyukina et al., 2012). Зважаючи на це, можна припустити, що пошук маркерів стійкості, у тому числі для практичних цілей (скринінгу стійких генотипів), може стати більш успішним за комплексної оцінки ряду ключових показників стану антиоксидантної системи. При цьому комплекс таких показників, ймовірно, може застосовуватися лише для оцінки таксономічно близьких груп рослин.

Вважається, що морозостійкість етіюльованих проростків культурних злаків сильно корелює з морозостійкістю дорослих рослин (Самыгин, 1967). При цьому етіюльовані проростки набувають властивості морозостійкості в ході загартування за низьких позитивних температур. Цей процес, як показано в попередніх

розділах, супроводжується як накопиченням мультифункціональних низькомолекулярних протекторів (цукрів, проліну, вторинних метаболітів), так і модифікаціями ферментативної складової антиоксидантної системи. Водночас спеціальних порівняльних досліджень можливого зв'язку між показниками функціонування антиоксидантної системи за низькотемпературної адаптації проростків і морозостійкістю культурних злаків різних видів у фазі кущіння, у тому числі в умовах, наближених до природних, дотепер не проводилося.

Зважаючи на це, було проведено дослідження зв'язків між окремими та інтегральними показниками стану антиоксидантної системи жита, пшениці і різних генотипів тритикале та морозостійкістю етіольованих проростків і зелених рослин у фазі кущіння.

Для оцінки зв'язку між станом антиоксидантної системи в цілому і морозостійкістю досліджуваних проростків злаків проводили нормування до діапазону від 0 до 1 показників виживаності проростків і морозостійкості рослин та всіх досліджуваних показників стану антиоксидантної системи. Детально розрахунок наведено у розділі 2.

Як свідчать результати, наведені в розділах 3 і 4, певний рівень конститутивної морозостійкості, що виявлялася без попереднього загартування, мали тільки проростки жита. Незагартовані проростки пшениці і тритикале практично повністю гинули після проморожування при -6°C . Зважаючи на це, у даній частині дослідження оцінювали морозостійкість тільки попередньо загартованих проростків. Найвища виживаність після проморожування відзначалася у проростків жита, незначною мірою поступалися їм за морозостійкістю проростки тритикале сортів Букет і Раритет (табл. 5.1). Відносно високу стійкість виявляли проростки пшениці сорту Досконала, що характеризується як морозостійкий (табл. 5.1). Значно нижчою була морозостійкість у проростків тритикале сортів Олександра і дворучки Підзимок харківський.

Таблиця 5.1. Морозостійкість проростків озимих злаків і рослин у фазі кущіння

Об'єкт	Вживаність проростків після 5 год проморожування при - 6°C		LT ₅₀ при проморожуванні рослин у фазі кущіння	
	%	Нормований показник	°C	Нормований показник
Жито озиме Пам'ять Худоєрка	60,5±3,2	1	-21,3±0,5	1
Тритикале озиме Букет	54,3±3,3	0,864	-18,1±0,5	0,333
Тритикале озиме Раритет	53,2±2,6	0,840	-18,4±0,5	0,396
Тритикале дворучка Олександра	26,6±2,8	0,258	-16,5 ±0,0	0
Тритикале дворучка Підзимок харківський	14,8±2,2	0	-16,6±0,5	0,021
Пшениця озима Досконала	49,2±2,8	0,753	-17,4±0,5	0,188

В цілому схожа диференціація досліджуваних зразків спостерігалася і при оцінці морозостійкості дорослих зелених рослин. Найнижча температура загибелі 50% рослин відзначалася для жита (-21,5°C). Сорти тритикале Букет і Раритет витримували температуру близько -18°C, децю вищою була критична температура для рослин пшениці, а 50 % рослин тритикале сортів Олександра і Підзимок харківський гинули за температури приблизно -16,5°C (табл. 5.1). В цілому між морозостійкістю проростків і дорослих рослин у фазі кущіння відзначалася досить висока кореляція ($r = 0,78$, $P \leq 0,07$). За морозостійкістю проростків сорти злаків розташовувалися так: Пам'ять Худоєрка > Букет > Раритет > Досконала > Олександра > Підзимок харківський. За стійкістю рослин у фазі кущіння послідовність розташування сортів була схожою: Пам'ять Худоєрка > Раритет ≥ Букет > Досконала > Підзимок харківський ≥ Олександра. Це опосередковано свідчило на користь припущення про наявність зв'язку між біохімічними показниками проростків і стійкістю дорослих рослин.

Зв'язку між активністю СОД і стійкістю злаків до низьких температур не спостерігалася (табл. 5.2). Так, висока активність ферменту була характерною для незагартованих проростків пшениці (сорт Досконала) і неморозостійкого сорту тритикале Підзимок харківський. Водночас у найбільш морозостійкого зразка (жито сорту Пам'ять Худоєрка) активність ферменту була невисокою. У

загартованих проростків найвищою була активність СОД у пшениці, високою – у морозостійких сортів тритикале, проте у жита вона була низькою, як і у неморозостійких сортів тритикале (табл. 5.2).

Таблиця 5.2. Нормовані показники активності антиоксидантних ферментів проростків злаків

Об'єкт	Активність СОД		Активність каталази		Активність пероксидази	
	I	II	I	II	I	II
Жито озиме Пам'ять Худоєрка	0,308	0,143	0	0,429	1	1
Тритикале озиме Букет	0,635	0,771	0,571	0,571	0,160	0,019
Тритикале озиме Раритет	0,794	0,871	0,286	0,929	0	0
Тритикале дворучка Олександра	0	0	0,714	0,357	0,185	0,115
Тритикале дворучка Підзимок харківський	0,952	0,114	1	0	0,050	0,051
Пшениця озима Досконала	1	1	0,429	1	0,395	0,287

Примітка. I – незагартовані проростки; II – загартовані проростки

Не виявлялося і прямого зв'язку між активністю каталази та морозостійкістю досліджуваних злаків (табл. 5.2). У незагартованих проростків найвищою вона була у неморозостійкого сорту тритикале Підзимок харківський, а найнижчою у жита. Після загартування картина змінювалася. Найвища активність відзначалася у пшениці, високою вона була і у тритикале сорту Раритет. Водночас у іншого морозостійкого сорту тритикале (Букет) вона була помірною, а у найбільш морозостійкого жита нижчою від величин у пшениці і тритикале (табл. 5.2).

Незагартовані зразки жита відрізнялися найвищою активністю пероксидази, у пшениці вона була помітно нижчою порівняно з житом, але значно вищою, ніж в усіх сортів тритикале (табл. 5.2). Після загартування найвища активність також

відзначалася у жита, відносно великою вона була у пшениці і низькою в усіх сортів тритикале. Примітно, що у морозостійкого сорту тритикале (Раритет) активність ферменту як без загартування, так і після загартування була найнижчою порівняно з усіма іншими зразками.

Між вмістом проліну у незагартованих проростків і морозостійкістю зразків також певних зв'язків не відзначалося, хоча найвищі величини були характерними для найбільш морозостійкого зразка жита (табл. 5.3). Помірні величини відзначалися у проростків пшениці і морозостійкого тритикале сорту Раритет. У іншого ж морозостійкого сорту тритикале – Букет – вміст проліну був найнижчим відносно інших досліджуваних зразків. Після загартування картина дещо змінилася. Проте і на тлі загартування найбільший вміст проліну відзначався у жита, найнижчим він був у пшениці.

Таблиця 5.3. Нормовані показники вмісту низькомолекулярних протекторів у проростках злаків

Об'єкт	Пролін		Цукри		Флавоноїди		Антоціани	
	I	II	I	II	I	II	I	II
Жито озиме Пам'ять Худоєрка	1	1	0,625	1	1	1	1	1
Тритикале озиме Букет	0	0,361	0,437	0,669	0,588	0,480	0,628	0,106
Тритикале озиме Раритет	0,154	0,335	0,505	0,657	0,580	0,564	0,609	0,106
Тритикале дворучка Олександра	0,077	0,120	1	0,781	0,576	0,313	0,615	0,115
Тритикале дворучка Підзимок харківський	0,038	0,320	0	0,079	0,059	0,095	0	0,029
Пшениця озима Досконала	0,115	0	0,189	0	0	0	0,048	0

Примітка. I – незагартовані проростки; II – загартовані проростки.

Кореляції між вмістом цукрів у незагартованих проростках і морозостійкістю загартованих також не відзначалося (табл. 5.3). Найбільшу кількість цукрів виявлено у тритикале сорту Олександра, який відрізняється

низькою морозостійкістю. Щоправда, найнижча величина відзначалася у іншого неморозостійкого сорту тритикале – Підзимок харківський. Зв'язок між вмістом цукрів у загартованих проростків і морозостійкістю незагартованих був невиразним. Високий їх вміст був зареєстрований у жита і тритикале морозостійких сортів Раритет і Букет. Проте у сорту з низькою морозостійкістю Олександра вміст цукрів був навіть вищим, ніж у сортів Раритет і Букет, а у відносно стійкої пшениці значно нижчим порівняно з усіма сортами тритикале (табл. 5.3).

Між вмістом у проростках флавоноїдів, що поглинають в межах УФ-В, і морозостійкістю злаків простежувалася певна залежність (табл. 5.3). Так, як для загартованих, так і незагартованих проростків жита був характерним найбільший вміст флавоноїдів, високим він був у сортів тритикале, за винятком найменш морозостійкого Підзимок харківський. Водночас у пшениці вміст флавоноїдів, що поглинають в УФ-В, був нижчим порівняно з житом і тритикале.

До певної міри схожа картина відзначалася і за вмістом у проростках антоціанів, які репрезентують одну з груп флавоноїдів. Найбільша кількість антоціанів як за відсутності загартування проростків, та і після нього відзначалася у проростків жита (табл. 5.3). Дещо менший, але відносно високий їх вміст зафіксовано у сортів тритикале, за винятком найменш морозостійкого Підзимок харківський. Низький вміст антоціанів був характерним для проростків пшениці.

Отже, в цілому, певні позитивні кореляції з морозостійкістю простежувалися лише для окремих низькомолекулярних протекторів: проліну, антоціанів, флавоноїдів, що поглинають в УФ-В. Зважаючи на це, розраховували інтегральні показники ферментативної антиоксидантної активності та вмісту низькомолекулярних протекторів на основі відповідних нормованих показників.

Отримані результати дозволяють говорити про певні зв'язки між сумарною нормованою величиною активності АО ферментів у загартованих проростках і їх морозостійкістю (табл. 5.4). Найбільші значення були характерні для пшениці, водночас високі величини відзначалися і у жита та морозостійких сортів тритикале. При цьому у сорту тритикале, який є дворучкою з низьким рівнем

морозостійкості, відзначалася і найнижча активність антиоксидантних ферментів. Необхідно зауважити, що у незагартованих проростків таких закономірностей не виявлено.

Величина інтегральних показників вмісту низькомолекулярних протекторів також досить тісно асоціювалася з морозостійкістю. Так, навіть у незагартованих проростків жита і трьох сортів тритикале відзначалися відносно високі величини (табл. 5.4). У загартованих проростків також найбільші величини зафіксовані для жита і тритикале сортів Букет і Раритет.

Нарешті, для зразків без загартування найбільший інтегральний показник нормованих величин як активності антиоксидантних ферментів, так і вмісту низькомолекулярних протекторів був характерним для жита (табл. 5.4). Меншим цей інтегральний показник був у проростків неморозостійкого тритикале (Підзимок харківський) і ще меншим у морозостійких сортів тритикале (Букет і особливо Раритет). Відносно невисоким показник інтегральної антиоксидантної активності був у пшениці, а найнижчим у тритикале сорту Олександра. Значно чіткішими були закономірності для загартованих проростків. Найбільша інтегральна величина антиоксидантної активності відзначалася для жита, високою вона була у морозостійких сортів тритикале та пшениці, низькі величини були характерні для неморозостійких сортів тритикале Олександра і Підзимок Харківський.

Таблиця 5.4. Сумарні нормовані показники активності антиоксидантних (АО) ферментів (СОД, каталази і пероксидази) та низькомолекулярних протекторів (проліну, цукрів, флавоноїдів, що поглинають в УФ і антоціанів) у загартованих проростках пшениці.

Об'єкт	Активність АО ферментів (сума нормованих показників)		Вміст низькомолекулярних протекторів (сума нормованих показників)		Сума нормованих показників активності АО ферментів і вмісту низькомолекулярних протекторів	
	I	II	I	II	I	II
Жито озиме Пам'ять Худоєрка	0,371	0,663	1	1	1	1
Тритикале озиме Букет	0,423	0,564	0,441	0,404	0,331	0,557
Тритикале озиме Раритет	0,164	0,771	0,496	0,416	0,060	0,703
Тритикале дворучка Олександра	0	0,145	0,615	0,332	0	0,226
Тритикале дворучка Підзимок харківський	1	0	0	0,131	0,509	0
Пшениця озима Досконала	0,839	1	0,072	0	0,393	0,567

Примітка. I – незагартовані проростки; II – загартовані проростки.

За результатами досліджень були розраховані коефіцієнти кореляції між інтегральними показниками антиоксидантної активності та морозостійкістю загартованих проростків і дорослих злаків (табл. 5.5). Більшість показників незагартованих проростків слабо корелювала з величинами морозостійкості загартованих. Так, інтегральний показник активності антиоксидантних ферментів у незагартованих проростків був навіть у негативній, але невірогідній, кореляції з морозостійкістю загартованих проростків і дорослих рослин. Позитивна, але невірогідна, кореляція була між вмістом низькомолекулярних протекторів у незагартованих проростках і морозостійкістю загартованих проростків та

дорослих рослин. Між сумою нормованих показників активності антиоксидантних ферментів і вмісту низькомолекулярних протекторів у незагартованих проростках і морозостійкістю загартованих проростків та дорослих рослин так само не виявлено вірогідної кореляції.

Таблиця 5.5. Коефіцієнти кореляції між показниками стану антиоксидантної і осмопротекторної системи проростків і морозостійкістю загартованих проростків та рослин у фазі куціння

Показник	Морозостійкість проростків		Морозостійкість рослин у фазі куціння	
	I	II	I	II
Активність АО ферментів (сума нормованих показників)	-0,29	0,83*	-0,21	0,53
Вміст низькомолекулярних протекторів (сума нормованих показників)	0,53	0,54	0,75	0,88*
Сума нормованих показників активності АО ферментів і вмісту низькомолекулярних протекторів	0,30	0,94**	0,72	0,90*

Примітка. I і II – розрахунки кореляцій на основі показників стану АОС для незагартованих і загартованих проростків, відповідно. * - $P \leq 0,05$, ** - $P \leq 0,01$.

Значно тіснішими такі зв'язки були у загартованих проростків. Так, між інтегральною величиною активності антиоксидантних ферментів і морозостійкістю проростків відзначався високий коефіцієнт кореляції ($r = 0,83$). Водночас кореляція цього показника з морозостійкістю рослин у фазі куціння була середньою ($r = 0,53$) і не вірогідною при $P \leq 0,05$. Інтегральний показник вмісту низькомолекулярних протекторів у проростках вірогідно корелював з морозостійкістю дорослих рослин ($r = 0,88$), хоча його кореляція з виживаністю проростків після кріостресу була значно нижчою ($r = 0,54$). Нарешті, найбільш тісна кореляція з морозостійкістю як проростків, так і дорослих рослин, виявлена для сумарної нормованої величини активності антиоксидантних ферментів і вмісту низькомолекулярних сполук ($r = 0,94$ і $0,90$, відповідно) (табл. 5.5).

Аналізуючи отримані результати, треба відзначити більш тісний зв'язок з морозостійкістю вмісту у проростках низькомолекулярних протекторів порівняно

з активністю антиоксидантних ферментів. Особливо це стосується морозостійкості рослин у фазі кущіння. Відсутність високих значень кореляції між активністю антиоксидантних ферментів і морозостійкістю рослин у фазі кущіння може бути пов'язана з відмінностями функціонування ферментативної системи у етіюльованих проростків і цілої рослини з функціонуючим фотосинтетичним апаратом. Не виключено, що холодоіндуковані порушення функціонування антиоксидантної системи у зимуючих рослин можуть відбуватися іще в період загартування, коли листки рослин життєздатні і здійснюють фотосинтез, необхідний для накопичення цукрів та інших метаболітів з протекторними властивостями. Водночас слід відзначити, що внесок ферментативних антиоксидантів і низькомолекулярних протекторів у забезпечення захисту від редокс-порушень в умовах кріостресу може залежати від видових особливостей рослин. Зокрема, показано, що у проростках пшениці і ячменю за умов холодого загартування більшою мірою зростала активність антиоксидантних ферментів, тоді як у жита помітніше зростав вміст низькомолекулярних протекторів (Kolupaev et al., 2015).

Оцінюючи внесок окремих низькомолекулярних протекторів у стійкість злаків до кріостресу, варто відзначити зв'язок вмісту проліну з морозостійкістю. Він був дуже високим у загартованих проростків жита і помірно високим у морозостійких тритикале (табл. 5.3). Можна припустити, що значне накопичення проліну є однією зі стратегій адаптації жита та його гібридів. У пшениці відзначалося істотно менше накопичення проліну порівняно з житом та його гібридами. Проте при вивченні показників у трьох сортів пшениці було зареєстровано прямий зв'язок між вмістом проліну у загартованих проростках та їх морозостійкістю (Рябчун и др., 2015). Про зв'язки між вмістом проліну у різних сортів пшениці на ранніх стадіях розвитку з їх морозостійкістю у фазі кущіння повідомляється і у роботі інших авторів (Иванисов, Ионова, 2016). Не виключено, що інтенсивність синтезу і накопичення проліну є ознакою, яка проявляється на різних стадіях онтогенезу рослин, що дозволяє знаходити зв'язки між його вмістом у проростків і стійкістю дорослих рослин. Проте для підтвердження

цього припущення необхідні дослідження відповідних показників на різних стадіях розвитку рослин і за різних температурних умов.

Відомо, що пролін є мультифункціональним стресовим метаболітом, він виступає у ролі антиоксиданту, осмопротектора і навіть низькомолекулярного шаперона (Hayat et al., 2012; Kavi Kishor, Sreenivasulu, 2014; John et al., 2016). Відзначається його участь в холодовій адаптації різних злаків та рослин інших таксономічних груп (Kaplan et al. 2007; Rasheed et al. 2010; John et al., 2016). Примітно, що захисні ефекти накопичення проліну виявляються не лише при адаптації рослин до від'ємних температур, дія яких спричиняє стрес зневоднення, зумовлений утворенням льоду в міжклітинниках, а й за впливу низьких позитивних температур на теплолюбні рослини. Так, надекспресія гена ключового ферменту синтезу проліну - Δ^1 -піролін-5-карбоксилатсинтази, що спричиняє накопичення проліну, одночасно сприяла здатності томатів витримувати дію холоду (4°C) (Patade et al., 2013).

Безумовно, певний внесок у стійкість рослин до кріостресу і пов'язаного з ним окиснювального стресу мають і цукри, яким також притаманні властивості осмопротекторів, мембранопротекторів і антиоксидантів. З використанням сортів пшениці різного походження показано зв'язок між накопиченням цукрів і морозостійкістю (Kamata, Uemura, 2004; Рябчун и др., 2015). У дослідженнях *in vitro* з використанням ліпосом встановлено здатність сахарози й рафінози захищати мембрани від агрегації при висушуванні (Casela et al., 2006). Припускають, що таким чином цукри можуть запобігати порушенням мембран при зневодненні, пов'язаному з утворенням льоду в міжклітинниках (Kawamura, Matsuo Uemura, 2014). Трансгенні рослини петунії, здатні синтезувати більшу кількість рафінози, відрізнялися вищою стійкістю до кріостресу (Tajji et al., 2002; Pennycooke et al., 2003).

У наших експериментах відзначено зв'язок між вмістом флавоноїдних сполук і адаптацією різних видів і сортів злаків до дії низьких температур. Високий вміст антоціанів та безбарвних флавоноїдів, що поглинають в області УФ-В, характерний не лише для загартованих проростків морозостійких

генотипів, а й для незагартованих (див. рис. 3.3 і 4.5). Не виключено, що антоціани та інші флавоноїди важливі для конститутивної стійкості рослин. Їх високий вміст характерний, насамперед, для жита, яке вирізняється конститутивною морозостійкістю і водночас навіть у незагартованому стані резистентністю до прямих агентів окиснювального стресу (Kolupaev et al., 2016).

В цілому ж, ймовірно, морозостійкість рослин залежить як від вмісту низькомолекулярних протекторів, так і від активності антиоксидантних ферментів (Janda et al., 2003), хоча остання, ймовірно, є надзвичайно лабільним показником, який швидко змінюється залежно від зовнішніх і внутрішніх (наприклад, від віку рослин) чинників. При цьому між активністю антиоксидантних ферментів і вмістом низькомолекулярних протекторів можуть бути як прямі, так і зворотні кореляції (Radyukina et al., 2012), що, безумовно, ускладнює використання активності ферментів як маркерів стійкості.

Отримані результати засвідчують, що все ж найбільш тісний зв'язок з морозостійкістю має інтегральний нормований показник, що обчислюється на основі суми нормованих показників як вмісту низькомолекулярних антиоксидантів, так і активності антиоксидантних ферментів у загартованих проростках.

У даній роботі для досліджень використані не лише різні сорти, а й різні види злаків. У подальшому необхідно провести порівняльні дослідження стійкості достатньо більшої кількості сортів кожного виду злаків та їх антиоксидантного статусу. Не виключено, що це дозволить зменшити кількість показників антиоксидантної активності, необхідних для скринінгу морозостійких генотипів у межах певного виду злаків.

Висновки до розділу 5

Встановлено, що між морозостійкістю загартованих проростків і дорослих рослин пшениці, жита і тритикале існує достатньо висока кореляція ($r = 0,78$, $P \leq 0,07$). Показано, що чіткий зв'язок між окремо взятими показниками функціонування антиоксидантної системи у незагартованих проростків та

морозостійкістю загартованих проростків не виявляється. Водночас після загартування відзначалася висока кореляція сумарного нормованого показника ферментативної антиоксидантної системи (сума нормованих показників активності супероксиддисмутази, пероксидази і каталази) з морозостійкістю ($r = 0,83$, $P \leq 0,05$), проте коефіцієнт кореляції цього показника з морозостійкістю рослин у фазі кушіння був значно нижчим і невірогідним ($r = 0,53$). Водночас виявлено високу кореляцію між вмістом низькомолекулярних протекторів у загартованих проростках і морозостійкістю дорослих рослин у фазі кушіння ($r = 0,88$, $P \leq 0,05$). Напевно це зумовлено поліфункціональністю даних сполук, котрі, як зазначалося, виконують антиоксидантну, осмопротекторну і мембранопротекторну функції.

Найвища кореляція відзначалася між інтегральним нормованим показником, що складався з суми нормованих величин активності антиоксидантних ферментів та вмісту низькомолекулярних протекторів у загартованих проростках, і морозостійкістю проростків ($r = 0,94$, $P \leq 0,01$) та рослин у фазі кушіння ($r = 0,90$, $P \leq 0,05$).

РОЗДІЛ 6. ІНДУКУВАННЯ РОЗВИТКУ МОРОЗОСТІЙКОСТІ ЗЛАКІВ ЕКЗОГЕННИМИ СИГНАЛЬНИМИ СПОЛУКАМИ

Як уже зазначалося, у формуванні морозостійкості рослин задіяний ряд сигнальних і гормональних сполук. Проте можливості підвищення стійкості рослин до гіпотермії за допомогою донорів газотрансмітерів дотепер залишаються маловивченими, практично відсутніми, наприклад, порівняння впливу донорів NO і H₂S на протекторні системи різних видів злаків. Мало вивченим є комбінований вплив обробки донорами газотрансмітерів і стресовими фітогормонами на стійкість рослин до низьких температур. Водночас дослідження фізіологічних ефектів H₂S і NO становить інтерес як для пізнання фундаментальних механізмів формування адаптивних реакцій рослин, так і для розробки практичних прийомів, так званого «праймування» (priming). Під цим терміном розуміють індукування стійкості дією сигнальних молекул або їх донорів, багато в чому схоже на природні процеси загартування рослин, що дозволяє рослинам адаптуватися до екстремальних температур і інших несприятливих чинників (Savvides et al., 2016).

Використання H₂S та NO як агентів для праймування може бути перспективним у зв'язку з наявністю їх недорогих донорів (Lisjak et al., 2019).

У даному розділі наводяться результати досліджень впливу донорів сірководню і оксиду азоту, а також комбінованої дії донора NO і саліцилової кислоти на стан антиоксидантної і осмопротекторної систем проростків злаків.

6.1. Вплив донора сірководню NaHS на стан антиоксидантної і осмопротекторної систем проростків жита і пшениці

Незважаючи на те, що за останнє десятиліття отримано досить великий обсяг відомостей щодо стрес-протекторної дії донорів сірководню на рослини,

залишаються малодослідженими його механізми, видові особливості і навіть феноменологія ефектів при різних стресових впливах (Hancock et al., 2019).

Показано транзиторне підвищення ендogenous вмісту сірководню і посилення експресії генів ключових ферментів його синтезу – L-/D-цистеїндисульфгідраз – при дії температури 4°C у рослин винограду (Fu et al., 2013). Такий же ефект виявлено і у рослин арабідопсису з використанням мутантів, дефектних за генами цистеїндисульфгідраз, показана роль сірководню в активації холодочутливих генів *COR15* і *CBF3* (Du et al., 2017). У рослин огірка показано підвищення під впливом донора сірководню активності і посилення експресії генів кількох молекулярних форм H⁺-АТФази плазматичної мембрани коренів за дії низької температури (10°C) (Janicka et al., 2018).

В цілому, дія H₂S на стійкість рослин до гіпотермії і функціонування їх конкретних протекторних систем в умовах дії низьких температур досі вивчена слабо, а роботи, в яких би порівнювався вплив H₂S на рослини різних таксономічних груп, взагалі відсутні. У зв'язку з цим було доцільним вивчити вплив H₂S на стійкість до гіпотермії і процес холодого загартування проростків пшениці і жита, які, як зазначалося, відрізняються між собою особливостями функціонування антиоксидантної та осмопротекторної систем.

6.1.1. Морозостійкість проростків злаків. Морозостійкість незагартованих проростків пшениці, як і в інших серіях експериментів, результати яких наводилися раніше (див. розділ 3), була дуже низькою: після 5-годинного проморожування при -5° С їх виживаність склала 9%, при цьому обробка гідросульфідом натрію в концентраціях 0,1 і 0,5 мМ підвищувала її до 21-22%, концентрації 0,025 і 1 мМ виявилися менш ефективними (табл. 6.1).

Для проростків жита є характерною конститутивна морозостійкість і їх виживаність після проморожування при -5° С без попереднього загартування становила не менше 40%. Попередня обробка NaHS вірогідно збільшувала відсоток виживаність проростків жита (табл. 6.1). Найбільш ефективними, як і в випадку з проростками пшениці, були концентрації 0,1 і 0,5 мМ.

Таблиця 6.1. Вплив обробки NaHS на виживаність (%) незагартованих і загартованих проростків пшениці і жита після 4-годинного проморожування при температурах -5 і -9°C

Варіант	Виживаність проростків пшениці і жита, %		
	Проморожування незагартованих проростків при -5°C	Проморожування загартованих проростків при -5°C	Проморожування загартованих проростків при -9°C
Пшениця			
Контроль	9,0 ± 2,5 ^b	68,8 ± 2,6 ^b	30,6 ± 1,8 ^b
NaHS (0,025 мМ)	12,2 ± 2,2 ^{a, b}	80,5 ± 2,3 ^{a, b}	33,3 ± 2,7 ^b
NaHS (0,1 мМ)	21,7 ± 1,9 ^a	84,2 ± 2,1 ^a	46,6 ± 2,4 ^a
NaHS (0,5 мМ)	20,8 ± 2,0 ^a	85,0 ± 2,5 ^a	44,8 ± 2,6 ^a
NaHS (1 мМ)	16,8 ± 2,8 ^{a, b}	79,7 ± 2,7 ^{a, b}	38,6 ± 2,4 ^{a, b}
Жито			
Контроль	40,5 ± 2,0 ^b	86,6 ± 1,8 ^a	58,8 ± 3,0 ^b
NaHS (0,025 мМ)	44,2 ± 2,4 ^{a, b}	88,9 ± 2,4 ^a	62,4 ± 2,6 ^{a, b}
NaHS (0,1 мМ)	54,6 ± 2,2 ^a	96,6 ± 2,4 ^a	75,5 ± 2,5 ^a
NaHS (0,5 мМ)	58,4 ± 2,6 ^a	94,0 ± 2,0 ^a	77,1 ± 2,7 ^a
NaHS (1 мМ)	46,4 ± 3,2 ^{a, b}	92,8 ± 2,2 ^a	72,2 ± 2,4 ^{a, b}

Примітка. Тут і в табл. 6.2 однаковими латинськими буквами для кожного виду окремо відзначені значення, відмінності між якими не вірогідні за $P \leq 0,05$.

Загартування істотно підвищувало морозостійкість проростків пшениці, їх виживаність в різних варіантах дослідів становила близько 70-85% після проморожування при -5°C і 30-45% після проморожування при -9°C (табл. 6.1). В обох випадках попередня обробка NaHS сприяла збільшенню виживаності проростків.

Морозостійкість проростків жита під впливом загартування також істотно підвищувалася. Після проморожування при -5°C в усіх варіантах дослідів близько 90% проростків залишалися живими. У зв'язку з цим значного впливу обробки NaHS зафіксувати не вдалося (табл. 6.1).

Після проморожування при -9 °C відзначалися помітні відмінності за величиною виживаності контрольних і оброблених NaHS проростків жита. Найбільш ефективними були концентрації NaHS 0,1 і 0,5 мМ.

У зв'язку з цим, в наступних експериментах при вивченні впливу NaHS на біохімічні показники проростків пшениці і жита використовували саме такі його концентрації.

6.1.2. Вміст МДА. Для дослідження впливу H_2S на перебіг процесів, зумовлених окиснювальним стресом, що виникає за дії на рослини низьких температур, оцінювали вміст МДА у проростках жита і пшениці. У звичайних умовах обробка проростків пшениці і жита $NaHS$ не викликала істотних змін кількості МДА в пагонах (табл. 6.2). У той же час після холодого загартування проростків ці величини були нижчими порівняно з контролем.

Вплив H_2S на вміст МДА при холодому загартуванні в проростках пшениці був більш істотним, ніж в проростках жита.

Через 1 добу після проморожування загартованих проростків пшениці і жита при температурі $-5^\circ C$ візуальні їх пошкодження не виявлялися, що дозволило визначити в них вміст МДА. Цей показник зростав у обох видів, але більш істотно у пшениці (табл. 6.2). Обробка $NaHS$ знижувала спричинюване кріостресом накопичення МДА в пагонах загартованих проростків пшениці і жита.

Таблиця 6.2. Вміст МДА (нмоль/г сухої маси) в проростках пшениці і жита після загартування і проморожування.

Варіант	Вміст МДА в проростках, нмоль/г сухої маси		
	Без загартування	Після загартування (7 діб при $2-4^\circ C$)	Після проморожування загартованих проростків (4 год при $-5^\circ C$)
Пшениця			
Контроль	$70,6 \pm 2,2^a$	$58,8 \pm 2,0^a$	$142,2 \pm 3,2^b$
$NaHS$ (0,1 мМ)	$71,7 \pm 1,9^a$	$42,4 \pm 2,2^a$	$123,0 \pm 2,8^a$
$NaHS$ (0,5 мМ)	$74,5 \pm 2,6^a$	$43,9 \pm 1,9^a$	$116,4 \pm 4,2^a$
Жито			
Контроль	$147,8 \pm 2,6^a$	$129,5 \pm 3,6^a$	$189,8 \pm 7,6^a$
$NaHS$ (0,1 мМ)	$145,7 \pm 3,3^a$	$109,0 \pm 2,8^b$	$116,4 \pm 4,2^a$
$NaHS$ (0,5 мМ)	$150 \pm 2,5^a$	$113,3 \pm 3,3^a$	$149,9 \pm 5,6^a$

6.1.3. Активність антиоксидантних ферментів. При обробці $NaHS$ активність СОД в проростках пшениці за контрольних температурних умов істотно не змінювалася (рис. 6.1, А). Загартування викликало невелике, але

вірогідне при $P \leq 0,05$ підвищення активності ферменту. При цьому обробка NaHS, як і за фізіологічно нормальних умов, не викликала помітних змін активності СОД.

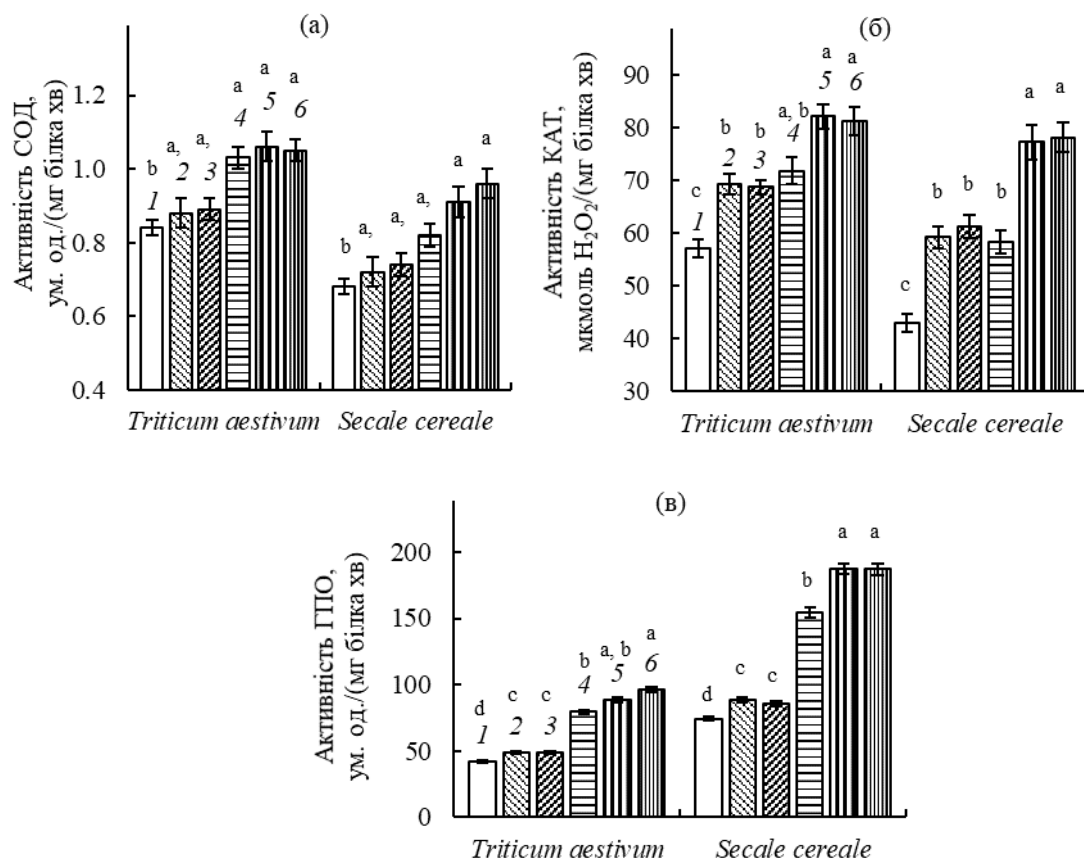


Рис. 6.1. Активність СОД (а), каталази (б) і пероксидази (в) в проростках пшениці і жита при дії донора сірководню і холодового загартування. 1 – контроль; 2 – NaHS (0,1 мМ); 3 – NaHS (0,5 мМ); 4 – загартування; 5 – загартування + NaHS (0,1 мМ); 6 – загартування + NaHS (0,5 мМ).

Тут і на рис. 6.2 та 6.3 однаковими латинськими буквами для кожного виду окремо відзначені значення, відмінності між якими не вірогідні за $P \leq 0,05$.

У проростків жита під впливом NaHS в обох концентраціях активність СОД також змінювалася незначно (рис. 6.1, А). Загартування викликало лише тенденцію до збільшення активності ферменту. Однак при поєднанні дії загартування і обробки NaHS активність СОД була вірогідно вищою, ніж в контролі.

Під впливом обробки NaHS і загартування в пагонах проростків пшениці підвищувалася активність каталази (рис. 6.1, Б). Комбінація загартування і обробки NaHS викликала тенденцію до додаткового збільшення активності ферменту, проте її значення в цих варіантах істотно не відрізнялися від величин варіанта тільки з загартуванням.

У проростків жита також відбувалося підвищення активності каталази під впливом NaHS і загартування (рис. 6.1, Б). При поєднанні загартування з обробкою 0,1 або 0,5 мМ NaHS відначалося вірогідне додаткове підвищення активності ферменту.

Обробка проростків пшениці NaHS в обох досліджуваних концентраціях викликала невелике, але вірогідне при $P \leq 0,05$ підвищення активності пероксидази в пагонах (рис. 6.1, В). Загартування чинило більш істотний вплив на активність ферменту. При комбінації загартування і обробки проростків NaHS (особливо в концентрації 0,5 мМ) відзначалося додаткове збільшення активності пероксидази.

Конститутивні величини активності пероксидази у проростків жита значно перевищували такі у проростків пшениці (рис. 6.1, В). Під впливом NaHS відбувалося підвищення активності ферменту. Загартування викликало дворазове збільшення активності пероксидази в проростках жита, а його поєднання з обробкою NaHS в обох концентраціях призводило до ще більшого підвищення ферментативної активності.

6.1.4. Вміст низькомолекулярних протекторів. Обробка незагартованих проростків пшениці NaHS в концентраціях 0,1 і 0,5 мМ сприяла підвищенню в них вмісту цукрів (рис. 6.2, А). Загартування викликало майже дворазове збільшення сумарної кількості розчинних вуглеводів у пагонах. При цьому поєднання загартування проростків з обробкою NaHS сприяло додатковому їх накопиченню, особливо ефективною була дія гидросульфід натрію в концентрації 0,5 мМ. Обробка проростків жита донором сірководню за фізіологічно нормальної температури сприяла підвищенню їх вмісту (рис. 6.2, А).

При загартуванні їх кількість також істотно збільшувалася, а обробка 0,1 і 0,5 мМ NaHS викликала додаткове накопичення цукрів в пагонах проростків жита.

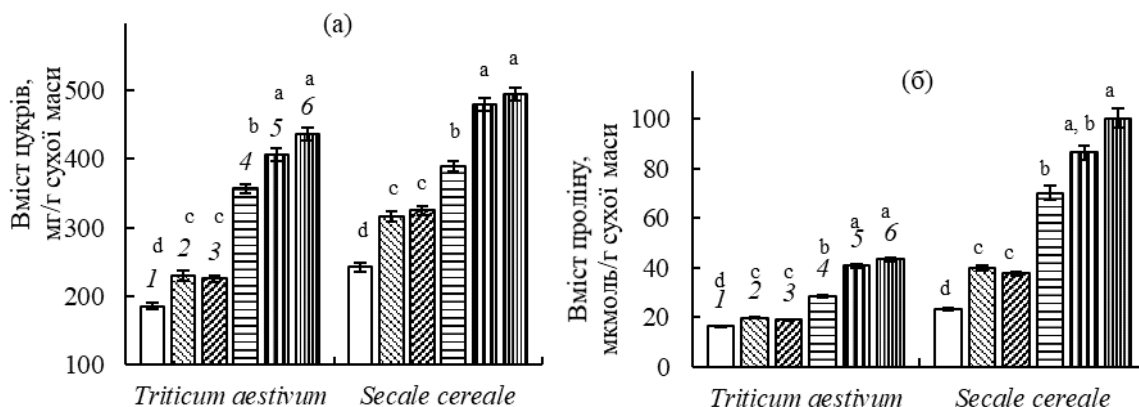


Рис 6.2. Вміст цукрів (а), проліну (б) в проростках пшениці і жита при дії донора сірководню і холодового загартування. 1 – контроль; 2 – NaHS (0,1 мМ); 3 – NaHS (0,5 мМ); 4 – загартування; 5 – загартування + NaHS (0,1 мМ); 6 – загартування + NaHS (0,5 мМ).

Під впливом обробки проростків пшениці NaHS за фізіологічно нормальної температури підвищувався вміст проліну (рис. 6.2, Б). Ще більш істотно його кількість в пагонах збільшувалася після загартування при 2-4°C. Поєднання загартування з обробкою NaHS викликало підвищення вмісту проліну до 40-43 мкмоль/г сухої маси, що більш ніж в 2,5 раза перевищувало значення контролю.

Обробка проростків жита NaHS в контрольних умовах індукувала істотне збільшення кількості проліну у пагонах (рис. 6.2, Б). Загартування спричиняло триразове підвищення вмісту проліну, а у варіантах з поєднанням загартування і NaHS він становив 86-100 мкмоль/г сухої речовини і перевищував значення контролю приблизно в 4 рази.

6.1.5. Вторинний метаболізм. Як уже зазначалося, до важливих низькомолекулярних антиоксидантів належать флавоноїди. Показано підвищення їх загального вмісту (Olenichenko et al., 2008) та кількості антоціанів (Kolupaev et al., 2016) за низькотемпературної адаптації пшениці. Однак вплив H₂S на вміст флавоноїдних сполук у рослин вивчено слабо. У плодах бананів при низькотемпературному зберіганні під впливом донора сірководню NaHS

зафіксовано підвищення загального змісту фенольних сполук і активності фенілаланінамонійліази (ФАЛ), (Luo et al., 2015). ФАЛ, що перетворює *L*-фенілаланін на *транс*-коричну кислоту, яка є попередником більшості вторинних метаболітів, вважається стартовим ферментом в складних процесах синтезу флавоноїдів (Neill et al., 2003; Адамовская и др., 2007). Водночас показано, що при обробці NaHS рослин брокколи за умов низькотемпературного зберігання відзначалося зниження активності ФАЛ і вмісту антоціанів, хоча при цьому відбувалося деяке збільшення загального вмісту флавоноїдів (Li et al., 2014). В роботі Li et al. (2015), виконаній на проростках кукурудзи, не виявлено суттєвих змін активності ФАЛ під впливом обробки NaHS, яка індукувала розвиток теплостійкості. Таким чином, відомості про вплив H₂S на функціонування вторинного метаболізму у рослин за фізіологічно нормальних і стресових умов нечисленні і досить суперечливі.

Зважаючи на це, вивчали вплив NaHS на активність ФАЛ та вміст антоціанів в проростках пшениці і жита в фізіологічно нормальних умовах і при холодовому загартуванні.

Обробка проростків пшениці NaHS за контрольних температурних умов викликала підвищення активності ФАЛ на 35-45% (табл. 6.3).

Таблиця 6.3. Активність ФАЛ (% до величини в контролі без загартування) в проростках пшениці за дії холодового загартування і NaHS

Варіант	Час загартування, діб			
	0	2	5	7
Контроль	100 ± 2,4	116 ± 2,0	96,2 ± 1,9	100 ± 2,5
NaHS (0,1 мМ)	134 ± 2,9	146 ± 3,2	124 ± 2,9	115 ± 1,9
NaHS (0,5 мМ)	145 ± 3,2	168 ± 4,3	132 ± 2,3	117 ± 1,7

Через 2 доби загартування відначалося відносно невелике, але вірогідне при $P \leq 0,05$ підвищення активності ферменту, в подальшому (на 5 і 7 добу) вона була на рівні контрольних зразків, які не зазнавали загартування.

Обробка проростків NaHS сприяла підтриманню підвищеної активності ФАЛ протягом всього періоду загартування (табл. 6.3). Особливо високою

активність ферменту в варіантах з обробкою 0,1 і 0,5 мМ NaHS була через 2 доби після загартування: вона перевищувала аналогічний показник контролю (без загартування і обробки NaHS) на 43 і 69 %, відповідно.

Обробка проростків жита донором сірководню викликала підвищення в них активності ФАЛ майже в 1,5 раза (табл. 6.4).

Таблиця 6.4. Активність ФАЛ (% від величини в контролі без загартування) в проростках жита за дії холодого загартування і обробки NaHS

Варіант	Час загартування, діб		
	0	4	7
Контроль	100 ± 2,5	116 ± 2,0	129 ± 3,1
NaHS (0,1 мМ)	146 ± 3,0	171 ± 4,3	169 ± 2,7

У процесі загартування відбувалося невелике, але вірогідне підвищення активності ФАЛ. При цьому обробка проростків NaHS викликала додаткове збільшення активності ФАЛ у проростків жита (табл. 6.4).

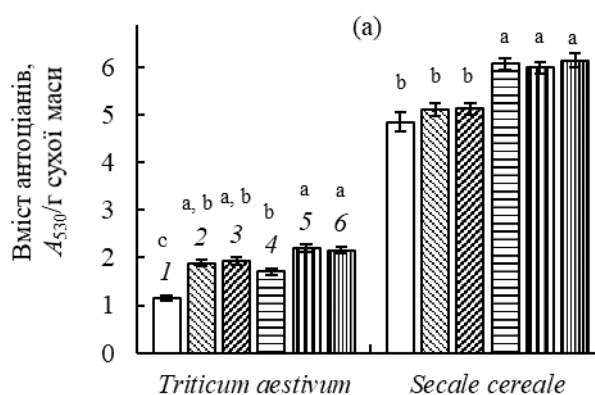


Рис 6.3. Вміст антоціанів в проростках злаків за обробки NaHS і загартування. 1 – контроль; 2 – NaHS (0,1 мМ); 3 – NaHS (0,5 мМ); 4 – загартування; 5 – загартування + NaHS (0,1 мМ); 6 – загартування + NaHS (0,5 мМ).

Під впливом NaHS в проростках пшениці збільшувався вміст антоціанів (рис. 6.3). Загартування також сприяло їх накопиченню в пагонах. При поєднанні загартування і NaHS відзначався найбільший вміст антоціанів, що дворазово перевищував значення контролю.

Проростки жита відрізнялися значно більшим вмістом антоціанів у пагонах в порівнянні з проростками пшениці (рис. 6.3). Однак їх обробка NaHS не викликала вірогідної зміни кількості антоціанів. Після загартування відзначалося підвищення вмісту цих пігментів, при цьому величини у варіантах з поєднанням дії низьких температур з обробкою донором сірководню істотно не відрізнялися від таких з впливом тільки загартування. Таким чином, обробка NaHS не чинила істотного впливу на вміст антоціанів в проростках жита ні за контрольних температурних умов, ні при загартуванні.

Поряд з антоціанами проростки жита містять значну кількість так званих «безбарвних» флавоноїдів, що поглинають в УФ-В частині спектра (див. розділ 3). Ці флавоноїди також вирізняються високою антиоксидантною активністю (Neill et al., 2003). Зважаючи на це, в окремій серії дослідів оцінювали вплив загартування і обробки NaHS на вміст цієї групи флавоноїдів у проростках жита.

Під впливом обробки NaHS в проростках вірогідно збільшувався вміст безбарвних флавоноїдів, що поглинають в області УФ-В (рис. 6.4). В процесі холодого загартовування він також зростав, більш помітно на 7-у добу. У варіанті з обробкою NaHS вміст флавоноїдів при загартуванні істотно збільшувався вже на 4-у добу. У момент закінчення загартування цей показник перевищував значення контролю приблизно в 1,5 раза.

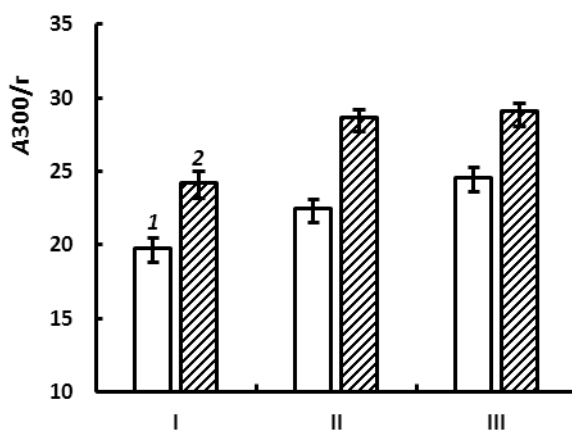


Рис 6.4. Вміст флавоноїдів, що поглинають в області УФ-В ($A_{300}/\text{г}$ сухої речовини) в проростках жита за дії донора сірководню і холодого загартування. I – без загартування, II і III – через 4 і 7 діб загартування при 3°C ; 1 – контроль, 2 – NaHS (0,1 мМ).

6.1.6. Можливі механізми стрес-протекторної дії екзогенного сірководню на проростки пшениці і жита за умов гіпотермії. Отже, обробка проростків пшениці і жита NaHS сама по собі викликала підвищення їх стійкості до низьких температур, а в умовах холодого загартування сприяла додатковому приросту морозостійкості (табл. 6.1). Морозостійкість двох злаків найістотніше підвищувалася за дії NaHS в концентраціях 0,1 і 0,5 мМ. При цьому, однак, за відсутності загартування вплив NaHS на стійкість проростків пшениці був більш істотним у порівнянні з впливом на стійкість проростків жита.

Під впливом обробки NaHS не тільки підвищувалася виживаність проростків пшениці і жита після дії від'ємних температур, а й знижувався ступінь прояву окиснювальних пошкоджень в першу добу після проморожування, що визначалося за вмістом МДА (табл. 6.2). Такі результати в цілому узгоджуються з даними, отриманими на рослинах бермудської трави (Shi et al., 2013).

Зменшення окиснювальних пошкоджень проростків пшениці і жита при проморожуванні в результаті їх попередньої обробки NaHS вказує на активацію H₂S антиоксидантної системи. Дійсно, в проростках обох видів відбувалося підвищення активності каталази та пероксидази як за дії тільки NaHS, так і при його поєднанні з загартуванням (рис. 6.1). При цьому виявлялися деякі видові особливості. У проростків жита базовий та індукований холодом рівень активності пероксидази був значно вищим, ніж у пшениці, більш вираженою у загартованих проростків жита була і реакція цього ферменту на обробку NaHS (рис. 6.1).

На відміну від пероксидази і каталази, активність СОД під впливом обробки NaHS істотно не змінювалася в обох видів злаків за фізіологічно нормальної температури, так і після холодого загартування (рис. 6.1). Слід відзначити, що активність СОД підвищувалася при обробці NaHS зелених рослин пшениці в нормальних умовах і на тлі посухи (Kolupaev et al., 2019). У рослин винограду показано підвищення активності СОД під впливом обробки NaHS в умовах дії зниженої температури (Fu et al., 2013). Можна припустити, що вплив H₂S на протекторні системи зелених і етіольованих об'єктів дещо відрізняється. У

випадку з етіологованими проростками злаків екзогенний сірководень, ймовірно, впливає на інші компоненти антиоксидантної системи, які знешкоджують радикальні АФК, зокрема, на вміст низькомолекулярних антиоксидантів.

Слід зазначити, що вплив донорів сірководню на активність і експресію генів антиоксидантних ферментів в даний час продемонстровано на багатьох об'єктах і при різних типах стресів. Так, підвищення стійкості рослин бермудської трави до дії холоду, спричинене NaHS, супроводжувалося збільшенням активності каталази, пероксидази і глутатіонредуктази (Shi et al., 2013). У рослин люцерни під впливом обробки NaHS, що індукувала розвиток солестійкості, не тільки підвищувалася активність, а й посилювалася експресія генів Cu/Zn-СОД, каталази, різних форм пероксидази (Lai et al., 2014).

В умовах наших експериментів особливо помітним був вплив NaHS на вміст поліфункціональних низькомолекулярних сполук, що виконують і роль антиоксидантів. Так, при обробці NaHS в проростках пшениці і особливо жита істотно підвищувався вміст цукрів, як в звичайних умовах, так і після холодового загартування (рис. 6.2). Цукри, як відомо, належать до ключових кріопротекторів, при цьому вони можуть проявляти і антиоксидантну дію. Більш того, припускають, що цукри як антирадикальні агенти можуть функціонально замінювати СОД (Sin'kevich et al., 2009). Примітно, що в наших дослідах NaHS, підвищуючи вміст цукрів (рис. 6.2), не чинив позитивного впливу на активність СОД (рис. 6.1).

Іншою важливою поліфункціональною захисною сполукою є пролін. У наших експериментах обробка NaHS проростків обох злаків викликала підвищення в них вмісту проліну як при фізіологічно нормальній температурі, так і після загартування. При цьому вплив обробки NaHS на вміст проліну у жита був більш істотним (рис. 6.2). Ймовірно, дія H_2S на вміст проліну залежить від видових особливостей рослин. У деяких роботах навіть показано зниження вмісту проліну при обробці рослин NaHS. Зокрема, такі ефекти зареєстровані у рослин огірка в умовах сольового стресу (Yu et al., 2013) та у проростків шпинату за умов посухи (Chen et al., 2016) З іншого боку, у рослин пшениці, оброблених NaHS,

вміст проліну в умовах ґрунтової посухи підвищувався більш істотно в порівнянні з необробленими (Kolupaev et al., 2019). Ймовірно, неоднозначність впливу H_2S на вміст проліну може бути зумовлена складною функціональною взаємодією цього низкомолекулярного протектора з іншими компонентами антиоксидантної системи, внесок яких в захисні процеси також може бути різним залежно від виду і фізіологічного стану рослин. Наприклад, відомо, що між активністю СОД і накопиченням проліну, як і накопиченням цукрів, у рослин може проявлятися реципрокна залежність (Shevyakova et al., 2009).

Ще однією важливою протекторною реакцією злаків, що індукується як загартуванням, так і H_2S є активація вторинного метаболізму. В умовах наших експериментів під впливом загартування і H_2S у проростках злаків відзначалося підвищення активності ФАЛ – ключового ферменту синтезу флавоноїдів (табл. 6.3, 6.4). При цьому загартування пшениці викликало транзиторне підвищення активності ФАЛ, яке передувало зростанню вмісту антоціанів. У жита підвищення активності ФАЛ відзначалося упродовж всього періоду загартування. Обробка $NaHS$ підвищувала активність ферменту в обох злаків. При поєднанні загартування і дії екзогенного H_2S активність ферменту зростала додатково, проте у пшениці прояв цього зростання зменшувався після 5 діб загартування.

Вміст антоціанів при обробці $NaHS$ в контрольних умовах і на фоні загартування помітно підвищувався у проростків пшениці, що мають низький конститутивний вміст цих сполук (рис. 6.3). У той же час у проростків жита, що містили в кілька разів більше антоціанів, індукування їх накопичення обробкою $NaHS$ не спостерігали. Проте, у проростків жита під дією як загартування, так і екзогенного H_2S було виявлено зростання вмісту безбарвних флавоноїдів (рис. 6.4). Найбільші величини відзначалися при поєднанні загартування і обробки $NaHS$.

В цілому, можна вважати, що накопичення флавоноїдних сполук є одним з важливих механізмів захисної дії H_2S на рослини при стресах різної природи. З цим припущенням узгоджуються і деякі результати, отримані на інших об'єктах. Так, виявлено збільшення вмісту безбарвних флавоноїдів (поглинаючих в УФ-В) і

антоціанів у рослин ячменю при індукуванні їх стійкості до дії УФ-В обробкою NaHS (Li et al., 2016). Показано підвищення під дією NaHS загального змісту флавоноїдів і кількості антоціанів при низькотемпературному зберіганні плодів глоду (Sun et al., 2015). При зберіганні коренів лотоса (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) за низької температури під впливом H₂S підвищувалися активність ФАЛ і вміст фенольних сполук (Sun et al., 2015).

Таким чином, екзогенний H₂S, ймовірно, індукує багато складових первинного і вторинного метаболізму, необхідних для розвитку стійкості рослин до гіпотермії.

6.2. Вплив донора NO нітропрусиду натрію на стан антиоксидантної і осмопротекторної систем проростків

Оксид азоту (NO) належить до найбільш досліджених молекул-газотрансмітерів у рослин. Проте його значення для адаптації рослин до дії холоду залишається маловивченим.

У деяких дослідженнях показано позитивний вплив екзогенного NO на стійкість рослин до гіпотермії. Як уже зазначалося, обробка рослин бермудської трави нітропрусидом натрію (НПН) знижувала спричинювані холодом (4°C) вихід електролітів з тканин і підвищення в клітинах вмісту продуктів ПОЛ (Fan et al., 2015). При цьому у рослин, оброблених НПН, відзначалися підвищення активності і посилення експресії генів ключових антиоксидантних ферментів. Фоліарна обробка молодих рослин ярої пшениці 0,1 мМ НПН сприяла їх адаптації до дії низької позитивної температури (2–5°C), що виявлялося в зменшенні проявів індукованого холодом окиснювального стресу і підвищенні активності антиоксидантних ферментів (Esim et al., 2015). Показано, що замочування насіння ярої пшениці в 0,1 мМ розчинах НПН сприяло збереженню близьких до нормальних ростових показників зростання і водного режиму у рослин, які зазнали впливу 4°C протягом 6 год (Bibi et al., 2017).

У той же час практично недослідженим залишається значення NO для стійкості рослин до дії від'ємних температур. Зокрема, дотепер не вивчався вплив NO на ці процеси накопичення кріопротекторів і активації антиоксидантних ферментів у морозостійких злаків. Зважаючи на це, вивчали вплив праймування НПН насіння озимих жита і пшениці на їх морозостійкість і зв'язок цього процесу з накопиченням низькомолекулярних протекторів і модифікацією ферментативної антиоксидантної системи.

6.2.1. Морозостійкість проростків. Як показали дослідження, праймування насіння НПН майже не впливало на стійкість незагартованих проростків до від'ємних температур. Можна відзначити лише тенденцію до невеликого підвищення виживаності проростків жита після їх обробки 0,2 мМ НПН (табл. 6.5). Після 6-денного холодового загартування проростки обох злаків набували морозостійкості: вони частково виживали після дії температур -6 і -8 °С. При цьому морозостійкість проростків жита була істотно вищою, ніж пшениці (табл. 6.5).

Таблиця 6.5. Концентраційна залежність впливу праймування насіння НПН на морозостійкість проростків жита и пшениці

Варіант	Виживаність проростків, %		
	Проморожування незагартованих проростків (5 год при -6°C)	Проморожування загартованих проростків (5 год при -6°C)	Проморожування загартованих проростків (5 год при -8°C)
Жито			
Контроль	$23,4 \pm 2,0$	$48,2 \pm 3,0$	$40,6 \pm 2,8$
НПН (0,1 мМ)	$24,7 \pm 2,3$	$64,8 \pm 2,4$	$55,2 \pm 2,6$
НПН (0,2 мМ)	$27,2 \pm 1,8$	$71,6 \pm 2,6$	$60,6 \pm 2,2$
НПН (0,5 мМ)	$25,9 \pm 2,1$	$59,1 \pm 3,1$	$51,6 \pm 2,8$
НПН (2,0 мМ)	$23,2 \pm 1,8$	$43,3 \pm 3,3$	$46,2 \pm 3,0$
Пшениця			
Контроль	0	$34,2 \pm 2,8$	$19,6 \pm 2,4$
НПН (0,1 мМ)	0	$58,8 \pm 3,2$	$34,9 \pm 2,7$
НПН (0,2 мМ)	0	$59,6 \pm 3,4$	$35,8 \pm 2,9$
НПН (0,5 мМ)	0	$41,3 \pm 2,7$	$26,3 \pm 2,8$
НПН (2,0 мМ)	0	$31,7 \pm 2,9$	$24,2 \pm 2,6$

Праймування насіння НПН в концентраціях діапазону 0,1–0,5 мМ підвищувало морозостійкість обох злаків. Найбільший позитивний вплив чинила обробка насіння 0,2 мМ розчином (табл. 6.5). Така закономірність виявлялася при проморожуванні проростків як при -6, так і при -8°C. Для доказу специфічності дії НПН як донора оксиду азоту порівнювали вплив на морозостійкість праймування насіння свіжоприготованим і «виснаженим» НПН.

Обробка насіння жита і пшениці продуктами світлоіндукованого розкладання НПН не чинила вірогідного впливу на морозостійкість проростків (рис. 6.5), що дає підстави пов'язувати ефекти НПН з його дією як донора NO.

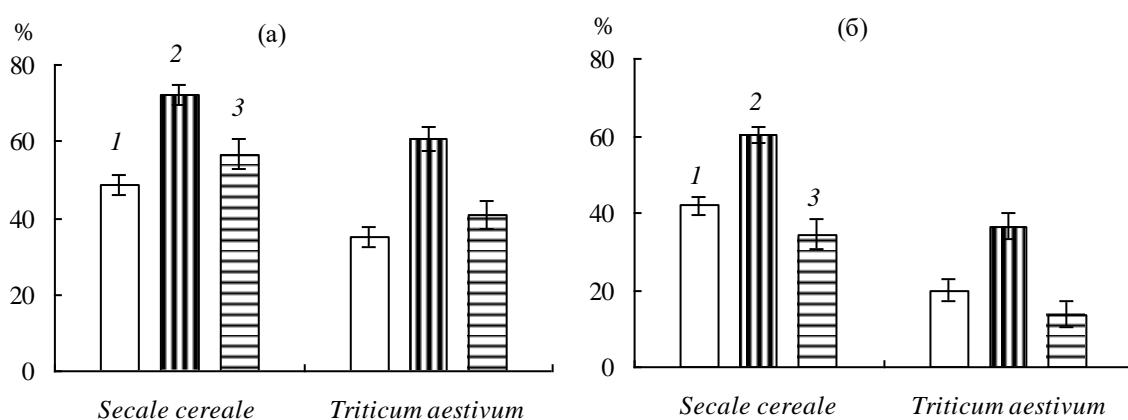


Рис. 6.5. Порівняння впливу свіжоприготованого і «виснаженого» НПН на виживаність (%) проростків жита і пшениці після 5-годинного проморожування при -6°C (а) і -8°C (б). 1 – контроль; 2 – НПН (0,2 мМ); 3 – «виснажений» НПН (0,2 мМ).

6.2.2. Вміст МДА. Під впливом праймування НПН в проростках жита і пшениці у фізіологічно нормальних температурних умовах зменшувався вміст продукту ПОЛ МДА (рис. 6.6).

Схожий ефект викликало і загартування. При цьому в проростках обох видів, вирощених з насіння, обробленого НПН, відзначалися найменші величини вмісту МДА.

Після проморожування вміст МДА в проростках збільшувалася, особливо помітно це виявлялося у менш морозостійкої пшениці. Праймування насіння НПН

помітно зменшувало прояв такого ефекту окиснювального стресу в обох злаків (рис. 6.6).

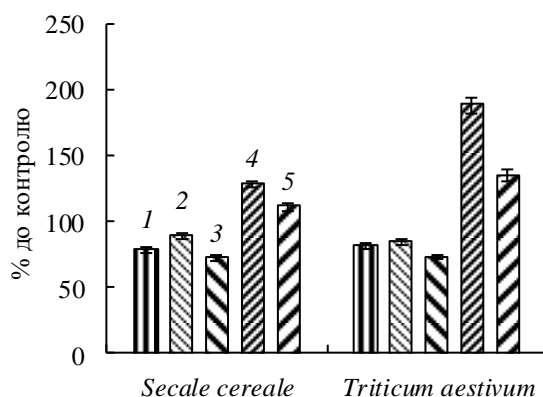


Рис. 6.6. Вміст МДА в проростках жита і пшениці за дії НПН, загартування (6 діб при 2–4°C) і проморожування (5 год при – 6°C). 1 – НПН (0,2 мМ); 2 – загартування; 3 – НПН (0,2 мМ) + загартування; 4 – загартування + проморожування; 5 – НПН (0,2 мМ) + загартування + проморожування.

6.2.3. Активність антиоксидантних ферментів. Активність СОД у проростків пшениці в контрольному варіанті була вищою, ніж у жита (рис. 6.7, А). Праймування НПН за відсутності холодового загартовування спричиняло помітне підвищення активності ферменту тільки у проростків жита. Після холодового загартування активність СОД підвищувалася в проростках обох видів. При цьому праймування насіння НПН сприяло збільшенню активності ферменту у проростках як жита, так і пшениці (рис. 6.7, А).

Активність каталази, як і СОД, в контролі була вищою у проростків пшениці (рис. 6.7, Б). Загартування викликало підвищення активності каталази у проростків жита і пшениці. Праймування НПН у фізіологічно нормальних умовах істотно не впливало на активність каталази в проростках обох видів. У той же час після загартування в проростках жита, вирощених з насіння, праймованого донором NO, відзначалися нижчі значення активності ферменту (рис. 6.7, Б).

Конститутивна активність пероксидази в проростках жита була вищою, ніж у проростках пшениці (рис. 6.7, В).

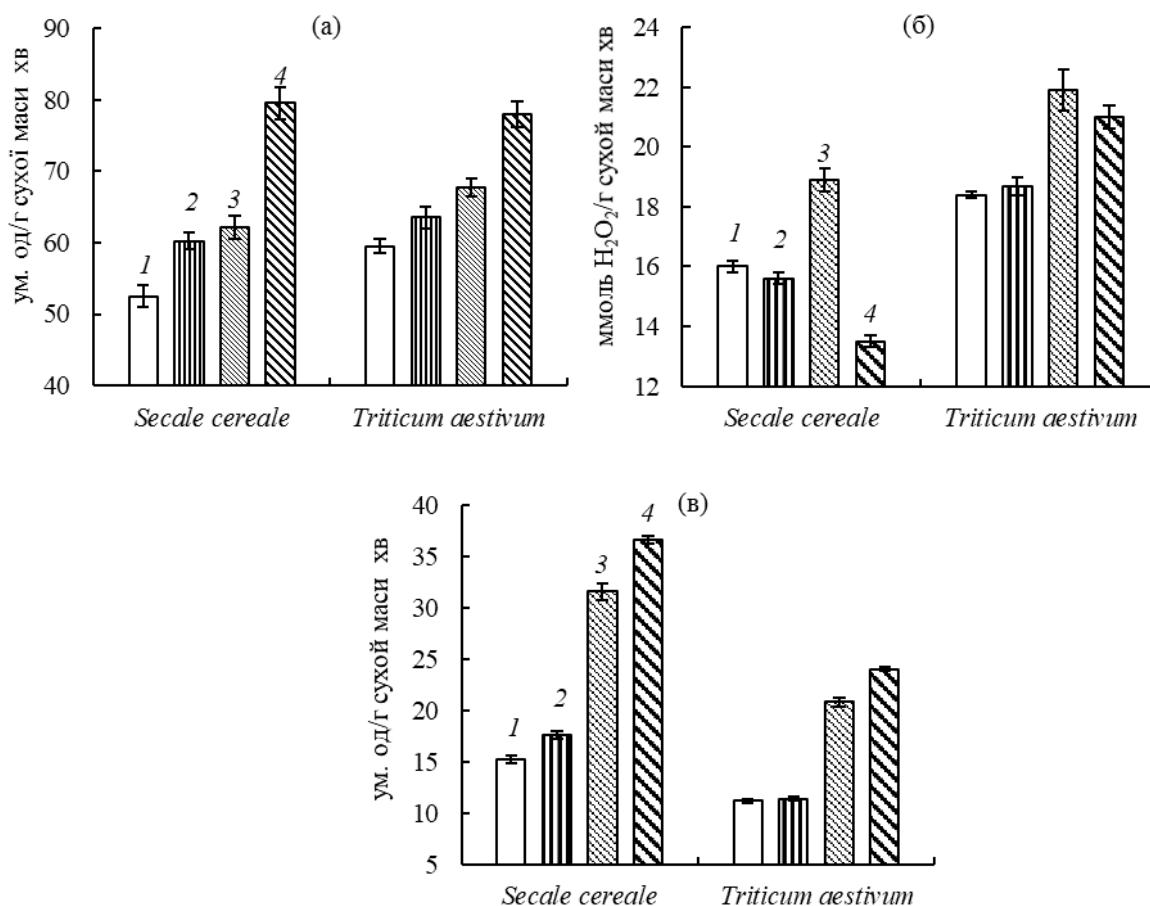


Рис. 6.7. Активність СОД (а), каталази (б) і пероксидази (в) в проростках жита і пшениці за дії НПН і холодового загартування (6 діб при 2–4 °С). 1 – НПН (0,2 мМ); 2 – загартовування; 3 – НПН (0,2 мМ) + загартування; 4 – загартування + проморожування; 5 – НПН (0,2 мМ) + загартування + проморожування

За відсутності загартовування праймування насіння НПН не чинило істотного впливу на активність пероксидази в обох видів злаків. Під впливом загартування активність цього ферменту істотно збільшувалася як у жита, так і у пшениці. При цьому праймування НПН сприяло підвищенню активності ферменту в обох видів.

6.2.4. Вміст сумісних осмолітів. За відсутності загартування праймування НПН викликало підвищення вмісту цукрів у проростках обох злаків. Загартування призводило до більш істотного зростання їх кількості. При цьому праймування 0,2 мМ НПН сприяло накопиченню більшої кількості цукрів при загартуванні проростків злаків обох видів (рис. 6.8, А).

За відсутності загартування праймування НПН спричиняло вірогідне збільшення вмісту проліну тільки у проростків жита (рис. 6.8, Б). Після загартування в обох злаків відбувалося істотне підвищення вмісту проліну. При цьому праймування насіння НПН викликало суттєве додаткове накопичення проліну при загартуванні проростків жита, у проростків пшениці такий ефект проявлявся лише на рівні тенденції (рис. 6.8, Б).

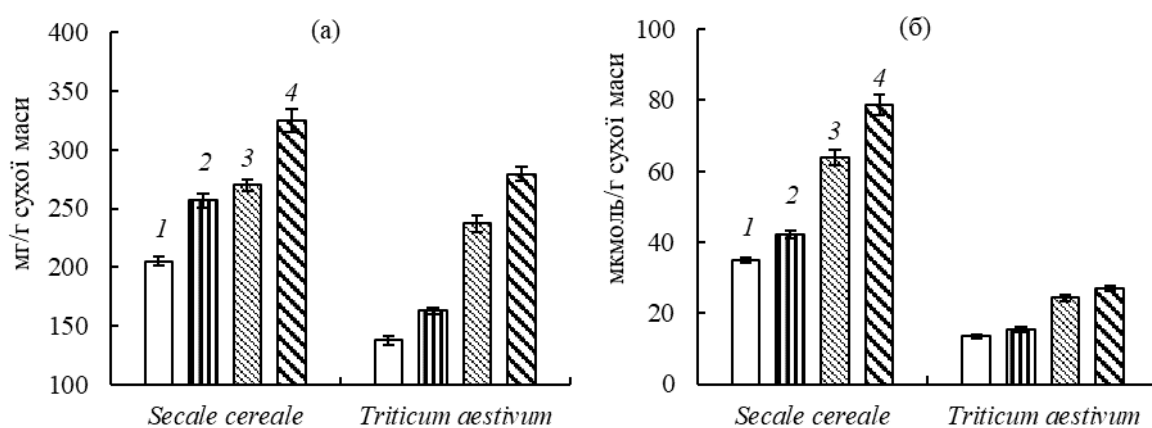


Рис. 6.8. Вміст цукрів (а), проліну (б), в проростках жита і пшениці за дії НПН і загартування (6 діб при 2–4 °С). 1 – контроль; 2 – НПН (0.2 мМ); 3 – загартування; 4 – НПН (0.2 мМ) + загартування.

6.2.5. Вміст вторинних метаболітів. Праймування НПН при рості проростків за контрольних температурних умов викликало помітне підвищення кількості кількості вторинних метаболітів в обох видів. Під впливом загартування також відбувалося накопичення антоціанів у проростках жита і пшениці. Праймування НПН посилювало цей ефект у обох злаків, більш помітною була його дія на проростки пшениці (рис. 6.9, Б).

У фізіологічно нормальних температурних умовах кількість флавоноїдів, що поглинають в УФ-В, під впливом праймування насіння донором NO трохи збільшувалася у проростків обох злаків (рис. 6.9, Б). Після загартування їх вміст у варіантах без праймування істотно підвищувався в обох злаків. Праймування

НПН викликало додаткове накопичення флавоноїдів, більш помітним воно було у проростків жита (рис. 6.9, Б).

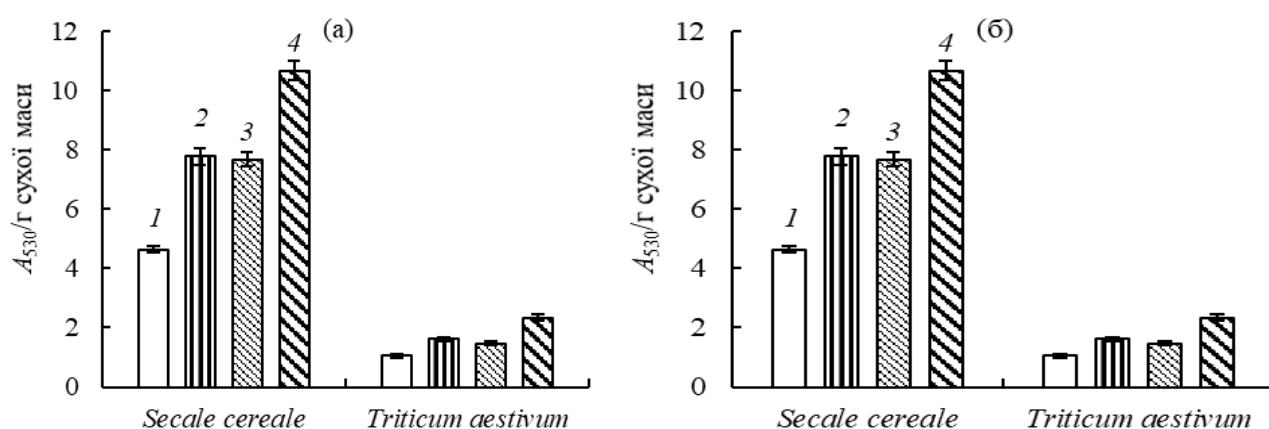


Рис. 6.9. Вміст антоціанів (а) і «безбарвних» флавоноїдів (б) в проростках жита і пшениці за дії НПН і холодого загартовування (6 діб при 2-4°C). 1 – контроль; 2 – НПН (0,2 мМ); 3 – загартування; 4 – НПН (0,2 мМ) + загартування.

В цілому, отримані результати свідчать про позитивний вплив NO на морозостійкість озимих злаків. Такий вплив значною мірою пов'язаний з накопиченням низькомолекулярних поліфункціональних протекторів (цукрів, пролін, антоціанів) і частково з активацією ферментативної антиоксидантної системи (рис. 6.7-6.9). Про це свідчить менш виражений прояв окиснювальних пошкоджень після проморожування проростків жита і пшениці, вирощених з насіння, праймованого НПН (рис. 6.6).

Таким чином, показано феномен посилення донором NO ефекту загартування проростків злаків, що приводить до підвищення їх морозостійкості. Його біохімічними складовими є посилення накопичення низькомолекулярних поліфункціональних протекторів (цукрів, проліну, флавоноїдних сполук) і частково підвищення активності антиоксидантних ферментів (СОД і пероксидази). Цілком ймовірно, що обробка екзогенним NO могла сприяти і активації інших протекторних систем.

Можна вважати, що активація ключових механізмів, пов'язаних з експресією генів, які зумовлюють розвиток морозостійкості, запускається дією низьких позитивних температур, тоді як NO, поряд з іншими компонентами сигналінгу, бере участь в регуляції цього процесу.

6.3. Комбінований вплив донора оксиду азоту і саліцилової кислоти на розвиток морозостійкості проростків пшениці

За сучасними уявленнями саліцилова кислота належить до ключових стресових гормонів рослин. Вона бере участь у формуванні захисних реакцій у рослин не тільки на біотичні, а й абіотичні стресори (Agarwal et al., 2005; Shakirova et al., 2009). Саліцилова кислота може підсилювати такі важливі для стійкості рослин до абіотичних стресорів реакції як підвищення активності антиоксидантних ферментів (Kolupaev et al., 2018; Wang et al., 2018), накопичення сумісних осмолітів (Kolupaev et al., 2018; Min et al., 2018), синтез шаперонів (Kim et al., 2013).

Отримано відомості і про позитивний вплив екзогенної саліцилової кислоти на процеси холодової адаптації рослин різної таксономічної належності. Так, показано посилення саліциловою кислотою холодового загартування пшениці (Tasgin et al., 2003; Yordanova, Popova, 2007; Wang et al., 2018; Холопцева и др., 2019), шпинату (Min et al., 2018) і рослин інших видів (Pal et al., 2013). Також зареєстровано підвищення під впливом саліцилової кислоти холодостійкості кукурудзи (Horvath et al., 2007), ячменю (Mutlu et al., 2014), томату (Miura, Tada, 2014), маслин (Hashempour et al., 2014) та інших видів рослин.

Зокрема, показано, що обробка проростків пшениці саліциловою кислотою викликала накопичення пероксиду водню і абсцизової кислоти, що виконують роль посередників у реалізації її дії як індуктора морозостійкості (Wang et al., 2018). При цьому саліцилова кислота індукувала підвищення активності супероксиддисмутази, каталази і аскорбатпероксидази в проростках пшениці. Спричинене саліциловою кислотою підвищення резистентності шпинату до дії

низьких температур супроводжувалося збільшенням вмісту аскорбінової кислоти, токоферолу, проліну, трегалози та інших низькомолекулярних протекторних сполук (Min et al., 2018). Праймування насіння кукурудзи саліциловою кислотою викликало підвищення їх схожості при низьких температурах і сприяло збільшенню активності антиоксидантних ферментів, амілази і вмісту цукрів (Ferooq et al., 2008).

З іншого боку, не всі наявні експериментальні дані дозволяють робити висновки про позитивну роль саліцилової кислоти в розвитку холодо- або морозостійкості рослин. Так, екзогенна саліцилова кислота посилювала холодоіндуковані пошкодження мембран рису (Wang et al., 2009). При цьому під її впливом знижувалася активність пероксидази і каталази. Автори вважають, що, принаймні, частково, відсутність позитивного впливу саліцилової кислоти може бути пов'язана з її високим ендogenous вмістом в органах проростків рису (Wang et al., 2009). Також показано вищу морозостійкість саліцилатдефіцитних трансформантів арабидопсису *NahG* порівняно з рослинами Col-0 (Majláth et al., 2011). Можливо, що відсутність ендogenous саліцилової кислоти у таких рослин індукує альтернативні сигнальні шляхи, що також сприяє адаптації. В цілому ж, відомості про роль саліцилової кислоти у формуванні адаптивних реакцій рослин різних видів до дії низьких температур неоднозначні.

NO є одним з посередників в реалізації фізіологічних ефектів саліцилової кислоти. Показано підвищення вмісту NO в клітинах рослин женьшеню (Puyaubert, Baudouin, 2014); і пшениці (Baudouin, Jeandroz, 2015) у відповідь на дію саліцилової кислоти. В експериментах з рослинами шпинату показано, що індукований саліциловою кислотою ефект підвищення їх стійкості до проморожування, який супроводжувався збільшенням вмісту аскорбінової кислоти і проліну, усувався скавенджером NO РТЮ (Shin et al., 2018). Таким чином, є підстави вважати, що індукування морозостійкості саліциловою кислотою на рослини може бути опосередковано оксидом азоту. У той же час показано, що за інших стресових впливів ефекти NO як сигнальної молекули можуть також реалізуватися за посередництва саліцилової кислоти. Наприклад,

встановлено, що у рослин тютюну, трансформованих геном бактеріальної саліцилатгидроксилази (*NahG*), під впливом донора оксиду азоту не розвивалася резистентність до вірусу тютюнової мозаїки (Song, Goodman, 2001).

В контексті функціональних зв'язків між NO і саліцилової кислотою виникає питання: чи може відбуватися посилення її стрес-протекторних ефектів при поєднанні з обробкою рослинних об'єктів донорами NO? В роботі Esim і Atici (2015) показано більш повне запобігання наслідків холодоіндукованого (3-денна дія температур 2-5°C) окиснювального стресу у неморозостійких (ярих) сортів пшениці за фоліарної обробки комбінацією 1мМ саліцилової кислоти і 0,1 мМ НПН. У той же час комбінована дія цих сполук на стійкість рослин до від'ємних температур дотепер не вивчалася. Також відсутні дані про комбіновану стрес-протекторну дію саліцилової кислоти і НПН при праймуванні насіння.

Зважаючи на це, порівнювали роздільний і сумісний вплив праймування насіння пшениці саліциловою кислотою і НПН на розвиток холодоіндукованої морозостійкості проростків і стан їх антиоксидантної та осмопротекторної систем.

6.3.1. Вживаність проростків пшениці після кріостресу. Обробка насіння саліциловою кислотою в концентраціях 1-100 мкМ помітно підвищувала вживаність загартованих проростків порівняно з контролем (рис. 6.10, А). Найбільш помітний ефект виявлявся при використанні концентрацій 10 і 100 мкМ.

Під впливом NO, як і в експериментах, результати яких наводилися в п. 6.2, відбувалося значне підвищення морозостійкості загартованих проростків (рис. 6.10, Б).

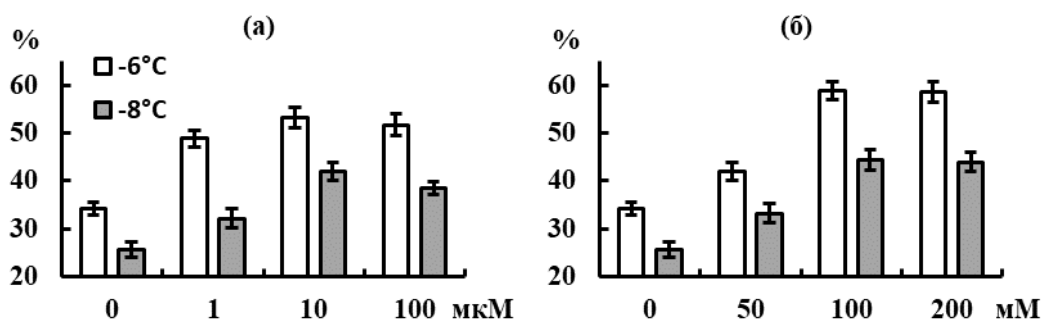


Рис. 6.10. Виживаність (%) загартованих проростків пшениці, вирощених з насіння, оброблених СК (а) або НПН (б) після кріостресу (проморожування протягом 5 год).

Після праймування насіння комбінацією саліцилової кислоти (10 мкМ) і НПН (100 мкМ) відзначалося найбільше підвищення виживаності загартованих проростків пшениці при проморожуванні за температур -6 і -8°C (рис. 6.11).

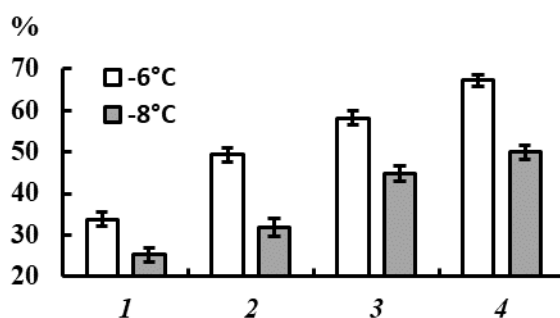


Рис. 6.11. Вплив комбінованої обробки насіння СК і НПН на виживаність (%) загартованих проростків пшениці після кріостресу. 1 – контроль; 2 – СК (10 мкМ); 3 – НПН (100 мкМ); 4 – СК (10 мкМ) + НПН (100 мкМ).

6.3.2. Активність антиоксидантних ферментів у проростках пшениці.

Під впливом загартування проростків пшениці, як і в експериментах, результати яких були наведені раніше, спостерігалось невелике підвищення активності СОД (рис. 6.12, А). Праймування насіння саліциловою кислотою не викликало істотної зміни активності СОД у загартованих проростків.

Водночас вплив НПН призводив до збільшення активності СОД в загартованих проростках у порівнянні з дією тільки загартування. Ще більш

істотний ефект відзначався при праймуванні насіння комбінацією НПН і саліцилової кислоти.

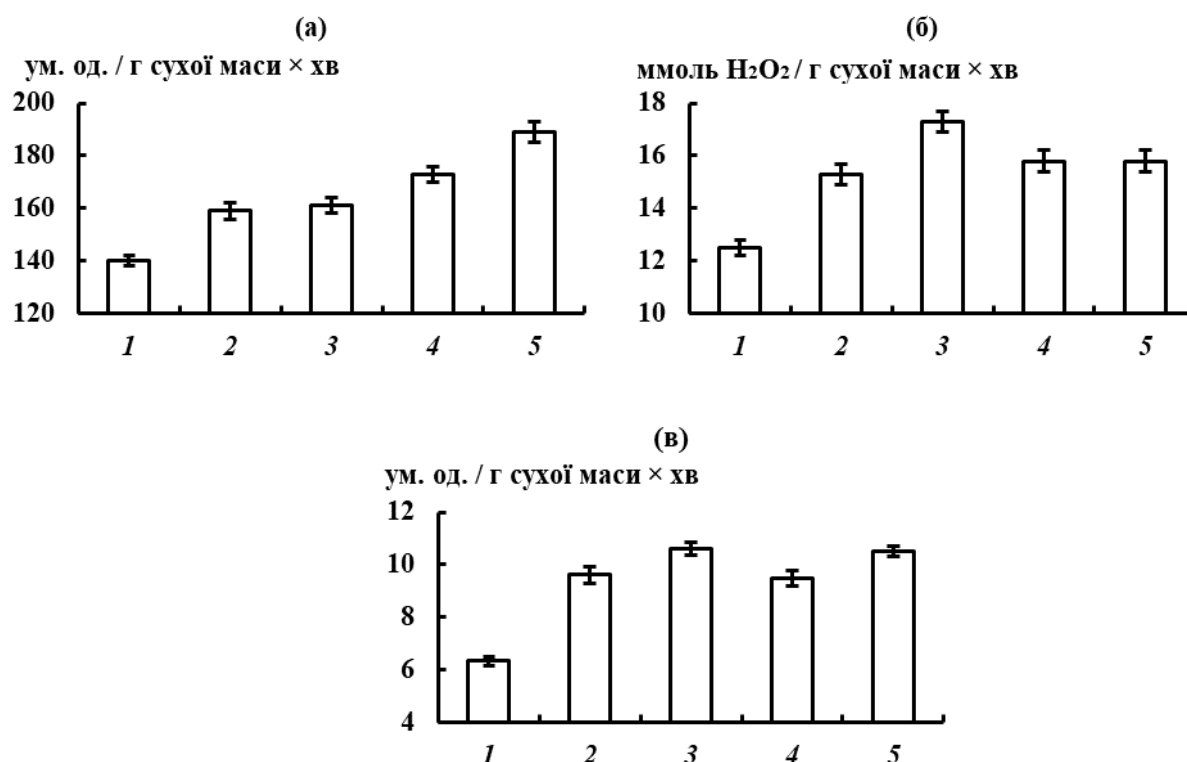


Рис. 6.12. Активність СОД (а), каталази (б) і пероксидази (в) в проростках пшениці після холодого загартування. 1 – контроль без загартування 2 – контроль загартований ; 3 – СК (10 мкМ); 4 – НПН (100 мкМ); 5– СК (10 мкМ) + НПН (100 мкМ).

Активність каталази в проростках збільшувалася після загартування (рис. 6.12, Б). Праймування насіння саліциловою кислотою викликало невелике додаткове збільшення активності ферменту після загартування (ефект був значимим при $P \leq 0,1$). Активність каталази у загартованих проростках після праймування НПН істотно не відрізнялася від такого в проростках, підданих тільки загартуванню. Не спостерігали додаткового збільшення активності каталази і в загартованих проростках після праймування комбінацією розчинів саліцилової кислоти і НПН.

Після загартування, як і в експериментах, описаних раніше, відбувалося підвищення активності пероксидази в проростках (рис. 6.12, В). Праймування

саліциловою кислотою приводило до додаткового збільшення активності ферменту. У варіанті з праймуванням НПН, а також його комбінацією з саліциловою кислотою, активність пероксидази у загартованих проростків істотно не відрізнялася від такої у варіанті з тільки загартовувальним впливом.

6.3.3. Вміст низькомолекулярних протекторів. Під впливом загартування проростків відзначалося помітне накопичення проліну (рис. 6.13), а поєднання праймування насіння саліциловою кислотою з впливом загартування викликало додаткове підвищення вмісту проліну. Такий самий ефект спостерігали при поєднанні загартування з обробкою НПН. У варіанті з комбінованою дією саліцилової кислоти і НПН адитивності їх впливу на вміст проліну не відзначали.

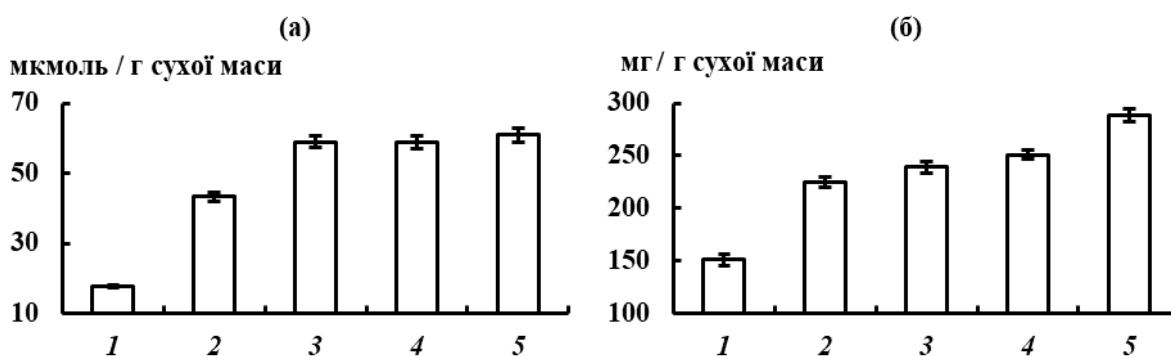


Рис. 6.13. Вміст проліну (а) і цукрів (б) в проростках пшениці після холодного загартування. 1 – контроль без загартування 2 – контроль загартований ; 3 – СК (10 мкМ); 4 – НПН (100 мкМ); 5– СК (10 мкМ) + НПН (100 мкМ).

Вміст цукрів у проростках пшениці після загартування збільшувався (рис. 6.13, Б). Обробка насіння саліциловою кислотою і, особливо, НПН також викликала підвищення вмісту цукрів в проростках, а найвищим він був за умов праймування комбінацією саліцилової кислоти і НПН.

Отже, після праймування комбінацією саліцилової кислоти і НПН у концентраціях, що викликають максимальний ефект, і загартування проростки відрізнялися найбільшою стійкістю до дії від'ємних температур (рис. 6.11). Таким

чином, відзначався ефект синергізму стрес-протекторної дії саліцилової кислоти і оксиду азоту.

При комбінованій обробці насіння саліциловою кислотою і НПН відзначалось максимальне підвищення активності СОД. Також комбінована обробка насіння саліциловою кислотою і НПН спричиняла найбільш суттєве накопичення цукрів в проростках при загартуванні (рис. 6.13, Б).

Таким чином, вперше показано посилення позитивного впливу саліцилової кислоти і НПН на формування морозостійкості при їх сумісному застосуванні. Цілком ймовірно, що протекторна дія саліцилової кислоти і НПН, а також їх комбінації не обмежується тільки змінами вивчених нами показників активності антиоксидантних ферментів, накопичення цукрів і проліну.

Одним з важливих ефектів саліцилової кислоти може бути посилення під її впливом накопичення в проростках білків нуклеаторів утворення позаклітинного льоду, що необхідно для запобігання летального внутрішньоклітинного льодоутворення (Tasgin et al., 2003; Mutlu et al., 2013). В роботі Wang і співавт. (2018) показано активацію під впливом саліцилової кислоти експресії ряду генів, важливих для холодової адаптації: *CBF1*, *COR14*, *CSI200*, *ABI5* та ін. Оксид азоту також бере участь в регуляції експресії холодочутливих генів (*CBF1*, *CBF2*, *CBF3*, *LTI30*, *LTI78* та ін.) (Puyaubert, Baudouin, 2014; Baudouin, Jeandroz, 2015).

Взаємне посилення стрес-протекторних ефектів саліцилової кислоти і NO може відбуватися, щонайменше, за рахунок двох різних механізмів. По-перше, може відрізнятися спектр «захисних» генів, на експресію яких прямо або опосередковано впливають саліцилова кислота і NO. У зв'язку з цим при їх спільній дії можливе розширення спектра активованих захисних реакцій. Також слід зазначити, що NO може впливати не тільки на роботу сигнальної мережі і експресію певних генів, а й взаємодіяти з цільовими білками безпосередньо, наприклад, з молекулами антиоксидантних ферментів шляхом їх S-нітрозилювання або нітрування і тим самим модифікувати їх активність (Arora et al., 2016). З іншого боку, NO може бути посередником у реалізації фізіологічних ефектів саліцилової кислоти. Як уже зазначалося, індукування саліциловою

кислотою підвищення стійкості рослин шпинату до дії негативних температур пригнічувалося скавенджером NO (Shin et al., 2018). У роботі Alavi зі співавт. (2014) показано, що обробка проростків пшениці саліциловою кислотою і НПН підвищує їх стійкість до осмотичного стресу, спричинюваного дією ПЕГ. У стресових умовах обидві сполуки сприяли накопиченню біомаси рослин і підвищенню вмісту хлорофілу. При цьому позитивні ефекти саліцилової кислоти і НПН усувалися поглиначем NO метиленовим синім. Обробка саліциловою кислотою підвищувала солестійкість рослин рису, що проявлялося в збільшенні вмісту аскорбінової кислоти, активності каталази, глутатіон-S-трансферази і глутатіонпероксидази (Mostofa et al., 2015). Такі ефекти усувалися обробкою рослин скавенджером NO гемоглобіном, що свідчить про роль оксиду азоту як посередника в реалізації захисної дії саліцилату. Можливо, в умовах наших експериментів обробка насіння НПН сприяла формуванню сигналів, за допомогою яких реалізується стрес-протекторна дія саліцилової кислоти.

Таким чином, комбіноване використання саліцилової кислоти і донорів оксиду азоту для праймування насіння пшениці можна розглядати як перспективний прийом підвищення стійкості рослин до гіпотермії та інших стресорів, принаймні, на ранніх фазах розвитку. При цьому спільна дія фітогормону і сигнального посередника може посилювати їх фізіологічні ефекти.

Висновки до розділу 6

Проведено порівняльне дослідження впливу донора сірководню гідросульфиду натрію (NaHS) на стійкість проростків озимих сортів пшениці і жита до дії від'ємних температур. Обробка незагартованих проростків NaHS в концентраціях 0,1 і 0,5 мМ викликала підвищення їх виживаності після проморожування при температурі -5°C . Вплив NaHS в таких же концентраціях збільшував і виживаність загартованих при $2-4^{\circ}\text{C}$ проростків обох видів після їх проморожування при -9°C . Під впливом NaHS в проростках обох видів за фізіологічно нормальної температури ($20-22^{\circ}\text{C}$) і після холодого загартування відзначалося підвищення вмісту цукрів і проліну. Також обробка NaHS

спричиняла активацію вторинного метаболізму, що виявлялося в підвищенні активності фенілаланінамонійліази у контрольних умовах і після загартування у обох видів. Вміст антоціанів при обробці NaHS збільшувався тільки у проростків пшениці, хоча у проростків жита зростав вміст безбарвних флавоноїдів, що поглинають в області УФ-В. H_2S також індукував підвищення активності каталази і пероксидази в проростках обох видів за фізіологічно нормальної температури і загартування. Під впливом H_2S у обох видів зменшувалося спричинюване кріостресом накопичення МДА.

Праймування насіння жита і пшениці 0,1–0,2 мМ НПН підвищувало здатність проростків до холодого загартування. Праймування НПН сприяло підвищенню вмісту в проростках злаків цукрів, проліну, антоціанів і флавоноїдів, що поглинають в УФ-В. У них також спостерігали збільшення активності СОД і пероксидази. Праймування насіння НПН запобігало значному накопиченню МДА у проростках після їх проморожування.

Показано підвищення виживаності проростків після проморожування після праймування насіння 10 мкМ саліциловою кислотою і посилення захисного ефекту при комбінованій обробці 10 мкМ саліциловою кислотою з 100 мкМ НПН. Праймування саліциловою кислотою спричиняло підвищення активності СОД, каталази і пероксидази, вмісту проліну та цукрів у тканинах проростків. При комбінованому застосуванні саліцилової кислоти і НПН в проростках відзначалося додаткове підвищення активності СОД і вмісту цукрів. Таким чином, за сумісної дії саліцилової кислоти і НПН їх стрес-протекторні ефекти посилюються.

Отже, донори газотрансмітерів H_2S та NO , а також стресовий фітогормон саліцилова кислота можуть чинити кріопротекторний вплив на злаки, активуючи сигнальну мережу й посилюючи функціонування антиоксидантної та осмопротекторної систем за умов адаптації рослин до холоду. Особливо слід відзначити здатність екзогенних газотрансмітерів і саліцилової кислоти істотно посилювати накопичення в проростках злаків мультифункціональних протекторів, які є основними осмопротекторами – цукрів і проліну.

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Загальновідомо, що морозостійкість рослин є полігенною ознакою. У формуванні цієї властивості, яке зазвичай відбувається в ході загартування рослин дією помірно низьких температур, бере участь велика кількість генів, що регулюють широкий спектр фізіологічних процесів і структурних змін. Це значно ускладнює вивчення механізмів морозостійкості і пошук фізіолого-біохімічних маркерів цієї ознаки. Проте внесок антиоксидантної системи у формування морозостійкості є дуже істотним. Це зумовлено тим, що окиснювальний стрес, пов'язаний з прямим впливом температури на стан ліпідів мембран і порушеннями у функціонуванні електрон-транспортних систем, є однією з ключових причин розвитку клітинних пошкоджень за дії холоду.

Останніми роками відбувся помітний поступ в уявленнях про функціонування антиоксидантної системи і значно розширилися знання про спектр речовин, які виконують антиоксидантні функції. Встановлено, що поряд з такими класичними антиоксидантами, як аскорбінова кислота і глутатіон, значний внесок в антиоксидантний захист у рослин роблять цукри, пролін та інші вільні амінокислоти, поліаміни (Колупаєв, Карпец, 2019). При цьому пролін і цукри виконують функції основних сумісних осмолітов, які запобігають надмірному зневодненню клітин за умов утворення льоду в міжклітинниках, зменшують ймовірність замерзання внутрішньоклітинного вмісту за рахунок кріоскопічних механізмів, мають мембранопротекторний вплив. Іншими словами, ця група речовин належить до мультифункціональних протекторів. Водночас ці сполуки перебувають у складних функціональних зв'язках з ферментативними антиоксидантами. З одного боку, низькомолекулярні протектори здатні запобігати пошкодженню білкових антиоксидантів, діючи як хімічні шаперони (Kaur-Sawhney et al, 2003; Mishra et al, 2006; Szabados et al, 2009; Liang et al, 2013), з іншого – вони можуть впливати на експресію генів окремих антиоксидантних ферментів (Radyukina et al, 2011; Carvalho et al, 2013). Логічно очікувати, що накопичення вказаних сумісних осмолітов за холодової адаптації рослин у

значних кількостях підсилюватиме процеси функціональної взаємодії між низькомолекулярними і ферментативними антиоксидантами. Зокрема, як зазначалося, відомо про реципрокну функціональну взаємодію між СОД, проліном і цукрами (Radyukina et al, 2012). Зокрема, ефекти зниження активності СОД за високого вмісту цукрів у рослинних клітинах зареєстровані саме в умовах адаптації до холоду (Sin'kevich et al, 2009).

Однак в цілому досліджень, в яких би аналізувався достатньо широкий спектр показників ферментативної і неферментативної складових антиоксидантної системи в контексті адаптації рослин до гіпотермії дуже мало.

Проведене нами порівняння функціонування антиоксидантної системи проростків пшениці, жита і тритикале при адаптації до кріостресу показало помітні відмінності у внеску окремих компонентів в антиоксидантний захист. Так, у жита відзначено більший внесок в антиоксидантний захист активності пероксидази та вмісту проліну і антоціанів, у тритикале – підвищеного вмісту флавоноїдів і цукрів (Горелова и др., 2018). У той же час у пшениці в процесі холодової адаптації більш істотно змінювалася активність антиоксидантних ферментів – СОД і каталази. Ці результати свідчать про видоспецифічність функціонування кріопротекторної системи і неможливість порівняльної оцінки її стану у різних видів за окремими показниками. З урахуванням цього ми здійснили спробу кількісно оцінити стан антиоксидантної системи проростків жита, пшениці і чотирьох сортів тритикале з використанням сумарних нормованих показників ферментативної антиоксидантної активності і вмісту ключових низькомолекулярних антиоксидантів (Горелова та ін., 2020). Для оцінки зв'язку між станом кріопротекторної системи в цілому і морозостійкістю досліджуваних проростків злаків проводили нормування до діапазону від 0 до 1 показників всіх досліджуваних показників стану цієї системи та виживаності загартованих проростків і морозостійкості рослин. Такий підхід дозволив встановити високу вірогідну кореляцію сумарного показника ферментативної антиоксидантної системи (сума нормованих показників активності супероксиддисмутази, пероксидази і каталази) у загартованих проростків злаків з їх морозостійкістю ($r =$

0,83, $P \leq 0,05$), хоча коефіцієнт кореляції цього показника з морозостійкістю рослин у фазі кушіння був значно меншим і невірогідним ($r = 0,53$). Проте за такого ж способу розрахунків виявлено високу кореляцію між вмістом низькомолекулярних протекторів у загартованих проростках і морозостійкістю дорослих рослин у фазі кушіння ($r = 0,88$, $P \leq 0,05$).

Нарешті, найбільш тісна кореляція відзначалася між інтегральним нормованим показником, що включав в себе суму нормованих величин активності антиоксидантних ферментів та вмісту низькомолекулярних сполук у загартованих проростках і морозостійкістю проростків ($r = 0,94$) та рослин у фазі кушіння ($r = 0,90$). Застосування таких інтегральних показників стану антиоксидантної системи і розрахунок кореляцій між цими показниками і морозостійкістю озимих злаків можуть використовуватися для розробки нових методів оцінки матеріалу при селекції на морозостійкість. При цьому однак, зважаючи на істотні видові відмінності, може бути доцільним визначення певного набору маркерів функціонування кріопротекторної системи для кожного виду злаків окремо.

Зміни стану антиоксидантної та осмопротекторної систем можуть стати критеріями для оцінки ефективності дії екзогенних стрес-протекторів як сполук, здатних підвищувати стійкість рослин до гіпотермії і зокрема кріостресу.

Нами вперше проведено порівняльне дослідження впливу екзогенного H_2S на морозостійкість видів, що відрізняються за функціонуванням антиоксидантної системи – пшениці і жита. Показано, що H_2S спричиняв підвищення базової морозостійкості і посилював ефект холодового загартування у двох видів злаків. При цьому більш помітним був його вплив на проростки пшениці, що відрізнялися меншим рівнем морозостійкості. Захисні ефекти екзогенного сірководню, ймовірно, значною мірою зумовлені модифікацією осмопротекторної системи. Під впливом донора сірководню в проростках злаків обох видів за оптимальної температури і в умовах загартування відзначалося підвищення вмісту цукрів і проліну. Напевно, важливою для реалізації захисних ефектів H_2S є спричинювана ним активація вторинного метаболізму, що виявлялася в підвищенні активності фенілаланінамонійліази у контрольних умовах і на фоні

загартування у пшениці і жита (Горелова и др., 2018; Kolupaev et al., 2018). Вміст антоціанів при обробці NaHS зростає лише у проростків пшениці, хоча у жита під впливом екзогенного сірководню збільшувався вміст безбарвних флавоноїдів, що поглинають в області УФ-В. H₂S також спричиняв підвищення активності каталази і пероксидази в проростках обох видів. Ймовірно, праймуванням рослин із застосуванням сірководню можна досягти підвищення їх стійкості до стресорів різної природи (ефекту перехресної стійкості). Це засвідчують, зокрема, результати інших експериментів із зерновими злаками. Так, обробка NaHS спричиняла підвищення стійкості проростків пшениці до осмотичного стресу, створюваного ПЕГ 6000 (Колупаєв та ін., 2018). Фоліарна обробка зелених рослин пшениці гідросульфідом натрію також підвищувала їх стійкість до ґрунтової посухи (Kolupaev et al., 2019). В обох випадках під впливом екзогенного сірководню відзначалися зміни активності антиоксидантних ферментів і підвищення вмісту проліну та антоціанів в рослинних об'єктах.

Істотне посилення спричинюваного холододим загартуванням розвитку морозостійкості проростків злаків викликала і передпосівна обробка насіння донором NO НПН. Як і у випадку з дією донора сірководню, можна припустити, що захисний вплив НПН зумовлений активацією антиоксидантної та осмопротекторної систем. Водночас виявлено певні відмінності в ефектах донорів двох різних газотрансмітерів на складові антиоксидантної системи. Так, під впливом як H₂S, так і NO спостерігалось підвищення в проростках злаків вмісту цукрів, проліну, антоціанів і флавоноїдів, що поглинають в УФ-В. У них також спостерігали збільшення активності пероксидази. Водночас вплив обробки донором H₂S на активність СОД в проростках був значно менш істотним, ніж NO. Праймування насіння НПН, як і обробка проростків NaHS, запобігала значному накопиченню продукту ПОЛ МДА після проморожування.

В цілому, можна припустити, що екзогенні впливи як H₂S, так і NO, спричиняють активацію сигнальної мережі, що посилює формування адаптивних реакцій. Як відомо, сигнальні функції газотрансмітерів значною мірою визначаються їх взаємодією між собою (Kolupaev et al, 2019). Один з основних

механізмів такої взаємодії зумовлений наявністю у них спільних сайтів взаємодії з білковими мішенями. Основною мішенню для багатьох реактивних молекул є тіолові групи білків. Зокрема, NO може змінювати такі групи шляхом S-нітрозилювання (Hancock, 2019). Також тіолові групи можуть бути персульфідовані дією сірководню. Таким чином, доля функціональних груп і в кінцевому підсумку активності білка буде визначатися ймовірністю таких взаємодій з газотрансмітерами та іншими молекулами сигнальної мережі і залежати від локальних концентрацій активних молекул (Hancock, 2019).

Ще один механізм функціональної взаємодії газотрансмітерів полягає в їх впливі на синтез один одного. Наприклад, сірководень може реагувати з ферментами, які генерують оксид азоту (Hancock, 2019). У ряді робіт повідомляється про те, що дія оксиду азоту може бути опосередкована сірководнем і навпаки (Li, 2013; Li et al., 2013; da-Silva et al., 2013). Так чи інакше, екзогенна дія газотрансмітерів в певних дозах спричиняє формування сигналів, що активують ключові протекторні системи, в тому числі антиоксидантну.

В останні роки розширюється спектр застосування саліцилової кислоти як індуктора стійкості рослин не лише до біотичних, а й абіотичних стресорів, включно з гіпотермією. Зокрема, було показано, що екзогенна саліцилова кислота підвищує стійкість молодих рослин пшениці до низьких позитивних температур, що виражалось в запобіганні прояви ефектів окиснювального стресу (Ignatenko et al., 2019). При цьому під впливом саліцилату відбувалося накопичення транскриптів генів антиоксидантних ферментів (СОД, каталази, пероксидази) і підвищувалася їх активність. Також за обробки СК зафіксовано підвищення кількості проліну в проростках (Ignatenko et al., 2019). Нами досліджено ефект обробки СК не вегетуючих рослин, а праймування її розчином насіння пшениці (Горелова и др., 2020). Такий метод є більш прийнятним для практичного застосування з метою підвищення стійкості рослин до стресових чинників, принаймні, на ранніх фазах розвитку. Встановлено, що обробка насіння саліциловою кислотою, спричиняла підвищення активності СОД, каталази і пероксидази, вмісту проліну та цукрів у тканинах проростків. Водночас за дії

саліцилової кислоти підвищувалася виживаність проростків після дії від'ємних температур.

Нами показано, що при сумісному використанні саліцилової кислоти і НПН в проростках відзначалося додаткове підвищення активності СОД і вмісту цукрів (Горелова и др., 2020). Отже, за комбінованого праймування насіння саліциловою кислотою і донором NO їх стрес-протекторні ефекти посилюються.

В літературі є відомості щодо складного впливу передпосівної обробки насіння саліциловою кислотою на гормональний баланс рослин пшениці не лише на ранній, а й на пізніх стадіях розвитку, включно з репродуктивними (Шакирова, 2001). Можливо, праймування насіння, змінюючи гормональний баланс на початкових фазах розвитку рослин, запускає певний «набір фізіологічних програм», що реалізується впродовж онотогенезу. Можна припустити, що обробка сигнальними посередниками, які можуть виступати індукторами гормональних змін у рослинному організмі, також здатна впливати на довготривалі фізіологічні програми рослин. Проте це питання виходить далеко за межі тематики нашої роботи і потребує спеціальних досліджень.

В цілому отримані результати засвідчують тісний зв'язок між станом антиоксидантної і осмопротекторної систем зернових злаків і їх морозостійкістю, а також можливість посилення розвитку морозостійкості екзогенними фізіологічно активними речовинами (донорами газотрансмітерів оксиду азоту і сірководню, фітогормоном саліциловою кислотою), дія яких спрямована, зокрема, на активацію антиоксидантної і осмопротекторної систем. Слід відзначити, що обробка донорами оксиду азоту і сірководню, а також екзогенною саліциловою кислотою особливо помітно посилювала накопичення низькомолекулярних сполук з мультифункціональною (осмопротекторною, мембранозахисною і антиоксидантною) дією – проліну, цукрів і вторинних метаболітів.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі показано важливе значення компонентів антиоксидантної та осмопротекторної систем у жита, пшениці і тритикале в їх адаптації до низьких температур, встановлено видові та сортові особливості функціонування цих систем і показана можливість їх активації та підвищення морозостійкості рослин шляхом застосування екзогенних газотрансмітерів (сірководню і оксиду азоту) та фітогормону саліцилової кислоти.

1. Виявлено відмінності у морозостійкості проростків жита, пшениці і тритикале. Встановлено, що конститутивну морозостійкість проявляють лише проростки жита. Показано, що під впливом низьких позитивних температур розвивається морозостійкість всіх досліджуваних злаків, при цьому зростає стійкість до окиснювального стресу, що свідчить про роль антиоксидантної системи у формуванні морозостійкості.
2. Показано, що в захист жита від негативного впливу гіпотермії більший внесок роблять висока активність пероксидази, вміст проліну та антоціанів, а у тритикале – підвищений вміст флавоноїдів і цукрів. Водночас у пшениці під час холодового загартування більше змінювалася активність антиоксидантних ферментів – СОД і каталази.
3. Показано істотні відмінності у функціонуванні компонентів антиоксидантної і осмопротекторної систем проростків тритикале з різною морозостійкістю при холодовому загартуванні. Внесок різних компонентів протекторної системи (антиоксидантних ферментів, проліну, цукрів, вторинних метаболітів) в захист від низькотемпературних ушкоджень істотно залежав від сортових особливостей.
4. Кореляція між окремими показниками антиоксидантної та осмопротекторної систем і морозостійкістю загартованих проростків або дорослих рослин є низькою. Водночас виявлено високу вірогідну кореляцію між інтегральним

нормованим показником функціонування антиоксидантної системи (суми нормованих величин активності антиоксидантних ферментів та вмісту низькомолекулярних протекторів) у загартованих проростків і морозостійкістю як проростків ($r = 0,94, P \leq 0,01$), так і дорослих рослин у фазі кущіння ($r = 0,90, P \leq 0,05$).

5. Показано, що обробка проростків жита та пшениці донором сірководню NaHS викликає підвищення їх морозостійкості за відсутності загартування і посилює ефект холодового загартування. Під впливом NaHS в проростках обох видів відзначалося підвищення вмісту цукрів і проліну, активностей пероксидази і каталази. Також обробка донором сірководню спричиняла активацію вторинного метаболізму, що виявлялося в підвищенні активності фенілаланінамонійліази в обох видів. У проростків пшениці за обробки NaHS зростав вміст антоціанів, а у проростків жита – флавоноїдів, що поглинають в УФ-В.
6. Праймування насіння озимих жита і пшениці донором оксиду азоту нітропрусидом натрію (НПН) підвищувало здатність проростків до холодового загартування. При цьому відзначалося підвищення вмісту в проростках обох видів злаків цукрів, проліну, антоціанів і флавоноїдів, що поглинають в УФ-В та активності СОД і пероксидази. Праймування насіння НПН запобігало розвитку окиснювального стресу у проростках після їх проморожування.
7. Виявлено підвищення морозостійкості проростків пшениці під впливом праймування насіння саліциловою кислотою і посилення захисного ефекту при комбінованій обробці саліциловою кислотою з НПН. Обробка насіння саліциловою кислотою спричиняла підвищення активності СОД, каталази і пероксидази, вмісту проліну та цукрів у тканинах проростків, а при комбінованому використанні саліцилової кислоти та НПН в проростках відзначалося додаткове підвищення активності СОД і вмісту цукрів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- Адамовская, В. Г., Молодченкова, О. О., Цисельская, Л. Й., Безкровная, Л. Я. (2007). Изменение активности фенилаланин-аммиак-лиазы, суммарного содержания фенольных соединений и лигнина в проростках ярового ячменя при действии фузариозной инфекции и салициловой кислоты. *Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія*, 1 (10), 50-58.
- Белявская, Н. А., Федюк, О. М., Золотарева, Е. К. (2020). Растворимые углеводы и холодостойкая акклимация растений. *Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія*, 2(50), 6-34.
- Будыкина, Н. П., Шиббаева, Т. Г., & Титов, А. Ф. (2012). Влияние эпина экстра – синтетического аналога 24-эпибрассинолида на стрессоустойчивость и продуктивность растений огурца (*Cucumis sativus* L.). *Труды Карельского научного центра РАН*, 2, 47–55.
- Будыкина, Н. П., Шиббаева, Т. Г., & Титов А.Ф. (2013). Эффективность препарата Эпин-экстра при выращивании сладкого перца (*Capsicum annuum* L.) в защищенном грунте в условиях северо-запада России. *Агробиология*, 11, 38-44.
- Васюкова, Н. И., Озерецковская, О. Л. (2009). Жасмонат-зависимая защитная сигнализация в тканях растений. *Физиология растений*, 56,(5), 643–653.
- Войников, В.К. (2013). Энергетическая и информационная системы растительных клеток при гипотермии. *Новосибирск: Наука*, 212.
- Горелова, Е. И., Швиденко, Н. В., Рябчун, Н.И., & Колупаев, Ю.Е. (2018) Вторичный метаболизм проростков *Secale cereale* при действии донора сероводорода и холодостойкого закалывания. *Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту Сер. Біологія*, 3(45), 59-68.
- Горелова, Е. И., Шкляревский, М. А., Рябчун, Н. И., Кабашникова, Л. Ф., & Колупаев, Ю.Е. (2020). Комбинированное влияние салициловой кислоты и донора оксида азота на развитие индуцированной закалыванием

- морозоустойчивости проростков пшеницы. *Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту Сер. Біологія*, 2 (50), 93-104.
- Горелова, О. І., Рябчун, Н. І., Шклярєвський, М. А., Рєзнік, А. М., & Колупаєв, Ю. Е. (2020). Морозостійкість злаків корелює з інтегрованими показниками вмісту низькомолекулярних протекторних сполук і активності антиоксидантних ферментів. *Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту Сер. Біологія*, 3 (51), 71-76.
- Грабовская, Н. И., Бабенко, О. Н. (2020). Протекторное действие на растения препаратов, содержащих брассиностероиды, в условиях загрязнения среды свинцом (обзор). *Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология*. 13 (2), 129-163.
- Дьяченко, Л. Ф., Тоцкий, В. Н., Файт, В. И., & Топтиков, В. А. (2007). Экспрессивность некоторых ферментов у рекомбинантных линий Одесская 16/Безостая 1 при адаптации растений к низким температурам. *Вісн. Одеськ. нац. ун-ту. Біологія*. 129 (5), 103-111.
- Запрометов, М.Н. (1971). Фенольные соединения и методы их исследования. *В кн.: Биохимические методы в физиологии растений*. Москва: Наука, 185-207.
- Иванисов, М. М., Ионова, Е. В. (2016). Морозостойкость сортов и линий озимой мягкой пшеницы. *Международный научно-исследовательский журнал*. 9-3 (51), 110-113.
- Игнатенко, А. А., Репкина, Н. С., Титов, А. Ф., Таланова, В. В. (2016). Реакция растений огурца на низкотемпературные воздействия разной интенсивности. *Труды Карельского научного центра РАН*, 11, 57-67.
- Игнатенко, А. А., Таланова, В. В., Репкина, Н. С., & Титов, А. Ф. (2020). Влияние метилжасмоната на устойчивость растений огурца, подвергнутых действию низкой повреждающей температуры. *Труды Карельского научного центра РАН*, 3, 121-129.
- Иващенко, О. О., Иващенко, О. О. (2008). Шляхи адаптації землеробства в умовах змін клімату. *Збірн. наук. праць Нац. наукового центру «Інститут землеробства УААН»*. – К.: ВД «ЕКМО», 15-21.

- Катышева, Н. Б., Поморцев, А. В., Дорофеев, Н. В., Пешкова, А. А., Рудиковская Е. Г. (2015). Динамика содержания пролина в узлах кущения озимых зерновых культур в течение осенне-весеннего периода. *Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту Сер. Біологія. Вип. 3 (36)*, 45-53.
- Козеко, Л.Е. (2010). Белки теплового шока 90 кДа: разнообразие, структура и функции. *Цитология. 52 (11)*, 893–909.
- Колесниченко, А.В., Войников, В.К. (2003). Белки низкотемпературного стресса растений. – *Иркутск: Артпресс*, 196.
- Колупаев, Ю. Е., Горелова, Е. И., Ястреб, Т. О. (2018). Механизмы адаптации растений к гипотермии: роль антиоксидантной системы. *Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія, 1 (43)*, 6–33.
- Колупаев, Ю. Е., Карпец, Ю. В. (2019). Активные формы кислорода, антиоксиданты и устойчивость растений к действию стрессоров. Киев: Логос, 277.
- Колупаев, Ю.Е., Трунова, Т.И. (1992). Особенности метаболизма и защитные функции углеводов растений в условиях стресса. *Физиология и биохимия культ. растений, 24*, 523-532.
- Колупаев, Ю. Е., Ястреб, Т. О. (2019). Сероводород и адаптация растений к действию абиотических стрессоров. *Вестн. Томск. гос. ун-та. Биология. (48)*, 158–190.
- Колупаев, Ю. Є., Карпець, Ю. В., & Поляков, О. К. (2020). Індукування стійкості рослин до дії абіотичних стресорів екзогенними брасиностероїдами. *Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія, 3 (51)*, 6-36.
- Колупаев, Ю. Є., Фірсова, К. М., Швиденко, М. В., & Ястреб, Т. О. (2018). Вплив донора сірководню на стан антиоксидантної системи проростків пшениці за осмотичного стресу, *Физиология растений и генетика, 50(1.)*, 29-38.
- Косаковская, И. В. (2008). Стрессовые белки растений. Київ: Український фітосоціологічний центр, 151.

- Кошкин, Е. И., Андреева, И. В., & Гусейнов, Г. Г. (2019). Влияние глобальных изменений климата на продуктивность и устойчивость сельскохозяйственных культур к стрессорам. *Агрoхимия*, № 12, 83-96.
- Кравец, В.С., Кретинин, С. В., Деревянчук, М. В., Драч, С. В., Литвиновская Р. П., & Хрипач, В. А. (2011). Влияние низких температур на уровень эндогенных brassinosteroidов. *Доповiдi НАН України*, 8, 155-159.
- Левитт, Дж. (1983). Повреждения и выживание после замораживания и связь с другими повреждающими воздействиями. *Холодоустойчивость растений / Пер. С англ.. Г.Н. Зверевой. М.М. Тюриной. Под ред. и с предисл. Г.А. Самыгина.* – М.: Колос, С. 10-36.
- Лось Д.А. (2005). Молекулярные механизмы холодоустойчивости растений. *Вестник РАН*. 75 (4), 338-345.
- Лось, Д. А. (2010). Сенсорные системы цианобактерий. М.: Научный мир, 218 с.
- Лукаткин, А. С. (2002). *Холодовое повреждение теплолюбивых растений и окислительный стресс*, Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 208 с.
- Майор, П. С., Захарова, В. П., & Великожон, Л. Г. (2011). Активність деяких антиоксидантних ферментів у рослинах озимої пшениці за природних умов загартування. *Физиология и биохимия культ. растений*. 43(6), 507-512.
- Моргун, В.В., Майор, П.С. (2009). Зимо- і морозостійкість озимих злакових культур. *Фізіологія рослин: проблеми та перспективи розвитку*. К.: Логос, Т. 2. – С. 105-165.
- Поморцев, А. В. (2013). Физиологические и биохимические процессы, определяющие зимостойкость озимых зерновых культур в условиях Восточной Сибири: *Автореферат канд. дис. Иркутск* : 22 с.
- Рибалка, О. І., Моргун, В. В., Моргун, Б. В., Починок, В. М.(2015) Агрономічний потенціал і перспективи тритикале. *Физиология растений и генетика*. 47, 2, 95–111.
- Рябчун, Н. И., Колупаев, Ю. Е., Вайнер, А. А., Ястреб, Т. О., Обозный, А. И., Четверик, А. Н. (2015). Компоненты антиоксидантной системы генотипов

- проростков озимой пшеницы, различающихся по морозоустойчивости. *Агрохимия, № 1*. С. 73-81.
- Самыгин, Г.А. (1967). Быстрое определение относительной морозостойкости образцов пшеницы путем промораживания проросших семян // *Методы определения морозостойкости растений*. М.: Наука, С. 77–84.
- Самыгин, Г.А. (1974). *Причины вымерзания растений*. М., 196.
- Скатерная, Т. Д., Харченко, О. В., Кретинин, С. В., Копыч, В. Н., Литвиновская, Р. П., Чащина, Н. М.,...Кравец, В. С. (2012). Влияние 24-эпибрассинолида на биосинтез белка в проростках кукурузы при холодовом стрессе. *Доклады НАН Беларуси*. 56 (2), 63-68.
- Сукманский, О. И, Реутов, В. П. (2016). Газотрансмиттеры: физиологическая роль и участие в патогенезе заболеваний. *Успехи физиологических наук.*, 47(3), 30–58.
- Суринов, А., Мхитарян, В., Агапова Г., Миронкина Ю., & Луппов А. (2018). *Статистика*. Ч. 1. Москва: 249 с.
- Тараховский, Ю.С., Ким, Ю.А., Абдрасилов, Б.С., & Музафаров, Е.Н. (2013). *Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина*. – Пушкино: Synchronobook.
- Тарчевский И.А.(2002).Сигнальные системы клеток растений. – М.: Наука, 294.
- Титов, А. Ф., Акимова, Т. В., Таланова, В. В., & Топчиева, Л. В. (2006). *Устойчивость растений в начальный период действия неблагоприятных температур*. М.: Наука.
- Трунова, Т. И. (2007). *Растение и низкотемпературный стресс: 64-е Тимиряз. чт.* Москва: Наука.
- Шакирова, Ф. М. (2001). *Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция*. Уфа, Гилем.
- Agarwal, S., Sairam, R.K., Srivastava, G.C., & Meena, R.C. (2005). Changes in antioxidant enzymes activity and oxidative stress by abscisic acid and salicylic acid in wheat genotypes. *Biol. Plant.* 49, 541-550.

- Aghaee, A., Moradi, F., Zare-Maivan, H., Zarinkamar, F., Pour Irandoost, H., & Sharifi, P. (2011). Physiological responses of two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes to chilling stress at seedling stage. *Afr. J. Biotechnol*, *10*,(39), 7617-7621.
- Ahmad, P., Jaleel, C.A., Sharma, S. (2010). Antioxidant defense system, lipid peroxidation, proline-metabolizing enzymes, and biochemical activities in two *Morus alba* genotypes subjected to NaCl stress. *Russ. J. Plant Physiol.* *57*(4),509-517.
- Alavi, S. M. N., Arvin, M. J., Kalantari, K. M. (2014). Salicylic acid and nitric oxide alleviate osmotic stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *J. Plant Interact.* *9* (1), 683-688.
- Ali, M. S., Baek, K.-H. (2020). Jasmonic Acid Signaling Pathway in Response to Abiotic Stresses in Plants. *Int. J. Mol. Sci.*,*21*(2), Art. 621. <https://doi.org/10.3390/ijms21020621>
- Alscher, R. G., Erturk, N., Heath, L. S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* *53*, 1331-1341.
- Amtmann, A. (2009). Learning from evolution: Thellungiella. *Mol. Plant.*, *2*, 3-12.
- Ao, P. X., Li, Z. G., Gong, M. (2013). Involvement of compatible solutes in chill hardening-induced chilling tolerance in *Jatropha curcas* seedlings. *Acta Physiol. Plant.*, *35*, 3457-3464.
- Apostolova, P., Yordanova, R., Popova, L. (2008). Response of antioxidative defence system to low temperature stress in two wheat cultivars. *Gen. Appl. Plant Physiol.*, *34*, 281-294.
- Arora, D., Jain, P., Singh, N., Kaur, H., & Bhatla, S.C. (2016). Mechanisms of nitric oxide crosstalk with reactive oxygen species scavenging enzymes during abiotic stress tolerance in plants. *Free Radical Res*, *50*, 291-303.
- Asada, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, *50*, 601-639.

- Asadi-Sanam, S., Pirdashti, H., Hashempour, A., Zavareh, M., Nematzadeh, G. A., & Yaghoobian, Y. (2015). The Physiological and biochemical responses of eastern purple coneflower to freezing stress, *Rus. J. Plant Physiol.*, 62, 515-523.
- Awasthi, R., Bhandari, K., Nayyar, H. (2015) Temperature stress and redox homeostasis in agricultural crops. *Front. Environ. Sci.* V. 3:11.
- Babenko, L.M., Romanenko, K.O., Kosakivska, I.V., Smirnov, O.E., Trunova, O.K. (2019). Phenolic compounds in plants: Biogenesis and functions. *The Ukrainian Biochemical Journal.*, 91 (3), 5-18.
- Babenko, L.M., Romanenko, K.O., Kosakivska, I.V. (2020). Stress temperature and soil drought effects on amino acid composition in winter wheat. *Доповіди Національної Академії наук України*, 2, 87-92.
- Baek, K. H., Skinner, D. Z. (2003). Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines. *Plant Sci.* 165, 1221-1227.
- Bajguz, A. (2011). Brassinosteroids – occurrence and chemical structures in plants. In: Brassinosteroids: A Class of Plant Hormone (eds. Hayat S., Ahmad A.) *Springer Science+Business Media B.V.*, pp. 1-28.
- Bancal, P., Gaudillere, J. P. (1989). Oligofructan separation and quantification by high performance liquid chromatography. Application to Asparagus of-ficinalis and Triticum aestivum. *Plant Physiol. Biochem.* 27, 745-750.
- Bartwal, A., Arora, S. (2020). Brassinosteroids: molecules with myriad roles. In: *Coevolution of Secondary Metabolites* (eds. Mérillon J.-M., Ramawat K.G.). *Springer Nature Switzerland A.G.*, pp. 869-895.
- Bates, L.S., Walden, R.P., Tear, G.D. (1973.). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil.* 39: 205-210.
- Baudouin, E., Jeandroz S. (2015). Nitric oxide as a mediator of cold stress response: a transcriptional point of view. In: Nitric Oxide Action in Abiotic Stress Responses in Plants. Eds. Khan M.N. et al. *Switzerland: Springer International Publishing* : 129-139.

- Bibi, A., Majid, S. A., Ulfat, A., Khatoon, S., Munir, A., & Javed, G. (2017). Effect of nitric oxide seed priming on chilling induced water related physiological attributes in germinating wheat. *J Animal Plant Sci.* 27: 186-191.
- Borovik, O. A., Grabelnych, O. I., Koroleva, N. A., Pobezhimova, T. P., & Voinikov, V.K. (2014). The influence of carbohydrate status and low temperature on the respiratory metabolism of mitochondria from etiolated leaves of winter wheat. *J. Stress Physiol. Biochem.* 10(4): 118-130.
- Bradford, M., (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brush, R. A, Griffith, M, Mlynarz, A. (1994). Characterization and quantification of intrinsic ice nucleators in winter rye (*Secale cereale*) Leaves. *Plant Physiol.* 104., 725-735.
- Burbulis, N., Jonytiene, V., Kupriene, R., & Blinstrubiene, A. (2011). Changes in proline and soluble sugars content during cold acclimation of winter rapeseed shoots in vitro. *J. Food Agricult. Environ*, 9, 371-374.
- Cacela, C., Hinch, D. K. (2006). Low amounts of sucrose are sufficient to depress the phase transition temperature of dry phosphatidylcholine, but not for lyoprotection of liposomes. *Biophys. J.* 90, 2831-2842.
- Carvalho, K., Campos, M.K., Domingues, D.S., Pereira, L.F., & Vieira, L.G. (2013) The accumulation of endogenous proline induces changes in gene expression of several antioxidant enzymes in leaves of transgenic Swingle citrumelo. *Mol. Biol. Rep.*, 40, 3269-3279.
- Cheeseman, J. (2007) M. Hydrogen peroxide and plant stress: a challenging relationship. *Plant Stress*, 1, (1), 4-15.
- Chen, J., Shang, Y.T., Wang, W.H. Chen, X.Y., He, E.M., Zheng, H.L., & Shanguan, Z. (2016). Hydrogen sulfide-mediated polyamines and sugar changes are involved in hydrogen sulfide-induced drought tolerance in *Spinacia oleracea* seedlings. *Front. Plant Sci.*, 7:1173. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01173>

- Chen, Y., Jiang, J., Chang, Q., Gu, C., Song, A., Chen, S., ...Chen, F. (2014). Cold acclimation induces freezing tolerance via antioxidative enzymes, proline metabolism and gene expression changes in two chrysanthemum species. *Mol. Biol. Rep.* 41, 815-822.
- Chen, Z.-Y., Wang, Y.-T., Pan, X.-B., Xi, & Z.-M. (2019). Amelioration of cold-induced oxidative stress by exogenous 24-epibrassinolide treatment in grapevine seedlings: toward regulating the ascorbate–glutathione cycle. *Sci Horticult.*, 244: 379-387.
- Christie, P. J., Alfenito, M. R., Walbot, V. (1994). Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings, *Planta.*, 194, 541-549.
- Colton-Gagnon, K., Ali-Benali, M. A., Mayer, B. F., Dionne, R., Bertrand, A., Do Carmo, S., & Charron J. B. (2014). Comparative analysis of the cold acclimation and freezing tolerance capacities of seven diploid *Brachypodium distachyon* accessions *Ann. Bot.*, 113 (4), 681-693. <https://doi.org/10.1093/aob/mct283>
- Corpas, F.J. and Barroso, J.B. (2017). Nitric oxide synthase-like activity in higher plants. *Nitric Oxide*, 1, 68, 5-6.
- Correa-Aragunde, N., Graziano, M. & Lamattina, L. (2004) Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta*, 218, 900-917.
- Costa , J.H., Mota, E.F., Cambursano, M.V., Lauxmann, M.A., de Oliveira, L.M., Silva Lima Mda, G., ...& Fernandes, de Melo D. (2010). Stress-induced co-expression of two alternative oxidase (VuAox1 and 2b) genes in *Vigna unguiculata*. *J. Plant Physiol.*, 167, 561-570.
- Couee, I., Sulmon, C., Gouesbet, G., Amrani, A. E. (2006). Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants, *J. Exp. Bot.*, 57, 449-459.
- Cvetkovska, M., Vanlerberghe, G.C.(2013). Alternative oxidase impacts the plant response to biotic stress by influencing the mitochondrial generation of reactive oxygen species. *Plant Cell Environ.*, 36.,721-732.

- da-Silva, C. J., Mollica, D.C.F., Vicente, M. H., Peres, L. E. P. & Modolo, L. V., (2018). NO, hydrogen sulfide does not come first during tomato response to high salinity. *Nitric Oxide.*, 76, 164–73.
- del Giudice, J., Cam, Y., Damiani, I. et al. (2011) Nitric oxide is required for an optimal establishment of the *Medicago truncatula* – *Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *New Phytologist*, 191, 405–417.
- Demin, I. N., Deryabin, A. N., Sinkevich, M. S., & Trunova, T. I. 9 (2008). Insertion of cyanobacterial desA gene coding for $\Delta 12$ -acyl-lipid desaturase increases potato plant resistance to oxidative stress induced by hypothermia. *Russ. J. Plant Physiol.* 55, 639-648.
- Durner, J, Wendehemme, D. & Klessig, D.F. (1998). Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 95, 10328–10333.
- Dubrovna, O.V., Stasik, O.O., Priadkina, G.O., Zborivska, O.V., & Sokolovska-Sergienko, O.G. (2020). Resistance of genetically modified wheat plants, containing a double-stranded RNA suppressor of the proline dehydrogenase gene, to soil moisture deficiency. *Agricultural Science and Practice.* 7 (2), 24-34.
- Engvild, K. C. (2003). A review of the risks of sudden global cooling and its effects on agriculture. *Agricult. Forest Meteorol.*, 115, 3-4., 127-137. doi.org/10.1016/S0168-1923 (02)00253-8.
- Eremina, M., Unterholzner, S.J., Rathnayake, A.I., Castellanos, M., Khan, M., Kugler K.G.,...Poppenberger B. (2017). Brassinosteroids participate in the control of basal and acquired freezing tolerance of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 114 (6) : 1038-1039.
- Esim, N., Atici, Ö. (2015). Effects of exogenous nitric oxide and salicylic acid on chilling-induced oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum*). *Front. Life Sci.* 8 (2) :124-130.
- Es-Safi, N. E., Ghidouche, S., Ducrot, P.H. (2007). Flavonoids: hemisynthesis, reactivity, characterization and free radical scavenging activity. *Molecules.*, 12, 2228-2258.

- Fan, J., Chen, K., Amombo, E. (2015). Physiological and molecular mechanism of nitric oxide (NO) involved in bermudagrass response to cold stress. *Plos ONE*.
- Fancy, N. N., Bahlmann, A. K. & Loake, G. J. (2017). Nitric oxide function in plant abiotic stress. *Plant, Cell & Environment*, 40 (4), 462–472.
- Farnese, F.S., Menezes-Silva, P.E., Gusman, G.S. & Oliveira, J.A. (2016). When bad guys become good ones: the key role of reactive oxygen species and nitric oxide in the plant responses to abiotic stress. *Front. Plant Sci.*, 7, 471.
- Farooq, M., Aziz, T., Basra, S.M.A., Cheema, M.A., & Rehman, H. (2008). Chilling tolerance in hybrid maize induced by seed priming with salicylic acid. *J. Agron. Crop Sci.* 194: 161-168.
- Fazlieva, E. R., Kiseleva, I. S., Zhuikova, T. V. (2012). 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.* 59 (3), 333-338.
- Feussner, I.; Wasternack, C. (2002). The lipoxygenase pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 275-297.
- Floryszak-Wieczorek, J., Milczarek, G., Arasimowicz, M., & Ciszewski, A. (2006). Do nitric oxide donors mimic endogenous NO-related response in plants? *Planta*. 224(6), 1363–1372.
- Foyer, C.H., Noctor, G. (2009). Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications , *Antioxid. Redox Signal*, 11, 861-906.
- Fu, P.N., Wang, W.J., Hou, L.X., & Liu, X.(2013). Hydrogen sulfide is involved in the chilling stress response in *Vitis vinifera* L. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 82, 295–302.
- Galiba, G., Vanková, R., Tari, I., Bánfalvi, Z., Poór, P., Dobrev...Kocsy G. (2013) Hormones, NO, antioxidants and metabolites as key players in plant cold acclimation. *Plant and Microbe Adaptations to Cold in a Changing World* / Eds. R. Imai et al. *New York: Springer Science+Business Media*,73-87.
- Gawronska, K., Gołbiowska-Pikania, G. (2016). The effects of cold-hardening and *Microdochium nivale* infection on oxidative stress and antioxidative protection of

- the two contrasting genotypes of winter triticale. *Eur. Food Res. Technol.* 242, 1267-1276.
- Gill, S.S., Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 909-930.
- Gimalov, F. R., Baymiev, A. Kh., Matniyazov, R. T., Chemeris, A. V., Vakhitov, V. A. (2004). Initial stages of low-temperature induction of cabbage cold shock protein gene *csp5*. *Biochemistry (Mosc.)*. 69(5): 575-579.
- Golebiowska, G., Wedzony, M., Plazek, A. (2011). The responses of pro- and antioxidative systems to cold-hardening and pathogenesis differ in triticale (× *Triticosecale* Wittm.) Seedlings Susceptible or Resistant to Pink Snow Mould (*Microdochium nivale* Fr., Samuels & Hallett). *J. Phytopathol.*, 159, 19-27.
- Grabelnych, O.I., Borovik, O.A., Pobezhimova, T.P., Koroleva, N.A., Lyubushkina, I.V., Zabanova, N.S., & Voinikov, V.K. (2016). Change of AOX1a expression, encoding mitochondrial alternative oxidase, influence on the frost-resistance of arabidopsis plants. *J. Stress Physiol. Biochem.* 12(4), 78-90.
- Grabelnych, O.I., Borovik, O.A., Tauson, E.L., Pobezhimova, T.P., Katyshev, A.I., Pavlovskaya, N.S...Voinikov, V.K. (2014). Mitochondrial energy-dissipating systems (alternative oxidase, uncoupling proteins, and external NADH dehydrogenase) are involved in development of frost-resistance of winter wheat seedlings. *Biochemistry (Mosc.)*, 79(6), 506-519.
- Grabelnych, O.I., Pobezhimova, T.P., Korzun, A.M., Voznenko, S.A., Koroleva, N.A., Pavlovskaya, N.S...Voinikov, V.K. (2011). The participation of cyanide-resistant respiration in heat generation and antioxidative defense of cell in winter wheat shoots under cold influence. *J. Stress Physiol. Biochem.*, 7(4), 446-456.
- Guan, L.M., Scandalios, J.G. (2000). Hydrogen peroxide-mediated catalase gene expression in response to wounding. *Free Radical Biol. Med.* 28, 1182-1190.
- Guo, H, Xiao, T, Zhou, H, Xie, Y, & Shen, W (2016). Hydrogen sulfide: a versatile regulator of environmental stress in plants. *Acta Physiol Plant* 38,16.

- Guo, Z., Ou, W., Lu S., Zhong, Q. (2006). Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. *Plant Physiol. Biochem*, 44, 828-836.
- Gupta, S., Webb, P.R., Holaday, A.S., & Allen R.D. (1993). Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress (Induction of ascorbate peroxidase in superoxide dismutase-overexpressing plants). *Plant Physiol*, 103, 1067-1073.
- Gusta, L.V., Wisniewski, M. (2013). Understanding plant cold hardiness: an opinion. *Physiol. Plant*, 147(1), 4-14. Doi: 10.1111/j.1399-3054.2012.01611.x.
- Guy, C., Kaplan, F., Kopka, J., Selbig, J., & Hinch, D. K. (2008). Metabolomics of temperature stress. *Physiol Plant.*, 132, 220-235.
- Hale, H. B. (1969). *Cross adaptation. Environm. Res.*, 2, (2), 323-334.
- Hancock, J.T., Whiteman, M. (2014). Hydrogen sulfide and cell signaling: Team player or referee? *Plant Physiol. Biochem.*, 78., 37-42.
- Hancock, J.T. (2019). Hydrogen sulfide and environmental stresses. *Environ Exp Bot* 161: 50-56.
- Hashempour, A., Ghasemnezhad, M., Fotouhi Ghazvini, R., & Sohani, M.M. (2014). The physiological and biochemical responses to freezing stress of olive plants treated with salicylic acid. *Russ. J. Plant Physiol.* 61 (4): 443-450.
- Hassan, N. S., Shaaban, L. D., Hashem, E.-S.A., Seleem E.E. (2004). In vitro selection for water stress tolerant callus line of *Helianthus annuus* L. cv. Myak. *Int. J. Agr. Biol.* 1, 13-18.
- Havaux, M., Kloppstech, K. (2001). The protective functions of carotenoid and flavonoids pigments against excess visible radiation at chilling temperature investigated in *Arabidopsis npq* and *tt* mutants. *Planta*, 213, 953-966.
- Hayat, S., Hayat, Q., Ahamd, A. (2012). Role of proline under changing environments. *Plant Signal. Behav.* 7, 1456-1466.
- He, H., Garcia-Mata, C., He, L.-F. (2019). Interaction between hydrogen sulfide and hormones in plant physiological responses. *Plant Growth Regulation* 87:175–186.

- Ho, L. H., Giraud, E., Uggalla, V., Lister, R., Clifton, R., Glen, A...Whelan, J. (2008). Identification of regulatory pathways controlling gene expression of stress-responsive mitochondrial proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, *147*, 1858-1873.
- Horvath, E., Szalai, G., Janda, T. (2007). Induction of abi-otic stress tolerance by salicylic acid signaling. *J. Plant Growth Regul.*, *26*, 290-300.
- Hossain, M. A., Hoque, M. A., Burritt, D. J., Fujita, M. (2014). Proline protects plants against abiotic oxidative stress: biochemical and molecular mechanisms. In: Oxidative Damage to Plants Antioxidant Networks and Signaling. *Academic Press is an imprint of Elsevier*, 477-521.
- Hu, Y., Jiang, Y., Han, X., Wang, H., Pan, J., & Yu, D. (2017). Jasmonate regulates leaf senescence and tolerance to cold stress: crosstalk with other phytohormones. *J. Exp. Bot.*, *68*, 1361–1369.
- Huang, S., Millar, A. H. (2013). Succinate dehydrogenase: the complex roles of a simple enzyme. *Curr. Opin. Plant Biol.* *16*, (3), 344-349.
- Ignatenko, A., Talanova, V., Repkina, N., & Titov, A. (2019). Exogenous salicylic acid treatment induces cold tolerance in wheat through promotion of antioxidant enzyme activity and proline accumulation. *Acta Physiologiae Plantarum*, *41*, 80.
- Islam, M., Hoque, A., Okuma, E., Banu, M.N., Shimoishi, Y., Nakamura, & Y., Murata, Y. (2009). Exogenous proline and glycinebetaine increase antioxidant enzyme activities and confer tolerance to cadmium stress in cultured tobacco cells. *J. Plant Physiol.*, *166*, 1587-1597.
- Janda, T., Gondor, O. K., Yordanova, R., Szalai, G., & Pal, M. (2014). Salicylic acid and photosynthesis: signaling and effects. *Acta Physiologiae Plantarum*. *36*(10), 2537-2546.
- Janda, T., Szalai, G., Leskó, K., Yordanova, R., Apostol, S., & Popova, L.P., (2007). Factors contributing to enhanced freezing tolerance in wheat during frost hardening in the light. *Phytochem*, *68*, 1674-1682.

- Janda, T., Szalai, G., Rios-Gonzalez, K., Veisz, O., & Páldi, E. (2003). Comparative study of frost tolerance and antioxidant activity in cereals. *Plant Sci.* 164: 301-306.
- Jang G., Yoon Y., Choi Y.D. (2020). Crosstalk with Jasmonic Acid Integrates Multiple Responses in Plant Development. *Int. J. Mol. Sci.*, 21, 305.
- Janicka, M., Reda, M., Czyżewska, K., & Kabała, K. (2018). Involvement of signalling molecules NO, H₂O₂ and H₂S in modification of plasma membrane proton pump in cucumber roots subjected to salt or low temperature stress. *Funct. Plant Biol.* 45. 428–439.
- Janmohammadi, M., Enayati, V., Sabaghnia, N. (2012). Impact of cold acclimation, de-acclimation and re-acclimation on carbohydrate content and antioxidant enzyme activities in spring and winter wheat. *Icel. Agric. Sci.*, 25, 3-11.
- Javadian, N., Karimzadeh, G., Mahfoozi, S., & Ghanati, F. (2010). Cold-induced changes of enzymes, proline, carbohydrates, and chlorophyll in wheat. *Russ. J. Plant Physiol.*, 57(4), 540-547.
- Jian, L.C., Li, P.H., Sun, L.H., & Chen, T.H.H. (1997). Alterations in ultrastructure and subcellular localization of Ca²⁺ in poplar apical bud cells during the induction of dormancy, *J. Exp. Bot.*, 48, 1195-1207.
- John, R., Anjum, N.A., Sopory, S.K., Akram, N.A., & Ashraf, M. (2016). Some key physiological and molecular processes of cold acclimation. *Biol. Plant.* 60, 603-618.
- Kamata, T., Uemura, M. (2004). Solute accumulation in heat seedlings during cold acclimation: Contribution to increased freezing tolerance. *Cryo Letters.* 25: 311-322.
- Kaplan, F., Kopka, J., Sung, D.Y., Zhao, W., Popp M., Porat R., & Guy C.L. (2007). Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of Arabidopsis reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content. *Plant J.* 50, 967-981.
- Karpets, Yu. V. & Kolupaev, Yu. E. (2018) Participation of nitric oxide in 24-epibrassinolide-induced heat resistance of wheat coleoptiles: Functional

- interactions of nitric oxide with reactive oxygen species and Ca ions. *Russian Journal of Plant Physiology*, 65 (2), 177–185.
- Kaur, N., Gupta, A. K. (2005). Signal transduction pathways under abiotic stresses in plant. *Current Science* 88,1771–80.
- Kaur, R., Nayyar, H. (2014). Ascorbic acid a potent defender against environmental stresses. *Oxidative Damage to Plants Antioxidant Networks and Signaling* / Ed. P. Ahmad. – *Academic Press is an imprint of Elsevier*, 235-287.
- Kaur-Sawhney R., Tiburcio A. F., Altabella T., & Galston A.W. (2003) Polyamines in plants: An overview. *J. Cell Mol. Biol.*, 2.,1-12.
- Kavi, Kishor, P.B., Sreenivasulu, N. (2014). Is proline accumulation per se correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue. *Plant Cell Environ.* 37, 300-311.
- Khlestkina, E.K. (2013). The adaptive role of flavonoids: emphasis on cereals. *Cereal Res. Commun.* 41, 185-198.
- Kim, Y. S., Park, S., Gilmour, S. J., Thomashow, M. F. (2013). Roles of CAMTA transcription factors and salicylic acid in configuring the low-temperature transcriptome and freezing tolerance of Arabidopsis. *Plant J.* 75, 364-376.
- Klíma, M., Vítámvás, P., Zelenková, S., Vyvadilová, M. and Prášil, I. T., (2012). Dehydrin and proline content in Brassica napus and B. Carinata under cold stress at two irradiances. *Biol. Plant.*, 56, 157-161.
- Klimov, S. V., Burakhanova, E. A., Dubinina, I. M., Alieva, G. P., Sal'nikova, E. B. Olenichenko, N. A., Zagorskina, N.V., & Trunova ,T. I. (2008). Suppression of the source activity affects carbon distribution and frost hardiness of vegetating winter wheat plants. *Russ. J. Plant Physiol.* 55 (3), 308-314.
- Knight, M. R., Campbell, A. K., Smith, S. M., Trewavas, A. J. (1991). Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature*, 352, 524-526.
- Kocsy, G., Simon-Sarkadi L., Kovács, Z., Boldizsár, Á., Sovány, C., Kirsch, K., & Galiba G. (2011). Regulation of free amino acid and polyamine levels during cold acclimation in wheat. *Acta Biol Szeged*, 55, 91-93.

- Kolupaev, Yu. E., Firsova, E. N., Yastreb, T. O., Ryabchun, N. I., & Kirichenko, V. V. (2019). Effect of Hydrogen Sulfide Donor on Antioxidant State of Wheat Plants and Their Resistance to Soil Drought. *Russian Journal of Plant Physiology*, *66*, 59-68.
- Kolupaev, Yu. E., Karpets, Yu., V., Beschasniy, S. P. & Dmitriev, A. P. (2019). Gasotransmitters and their role in adaptive reactions of plant cells, *Cytology and Genetics* *53*, 392-406.
- Kolupaev, Yu. E., Yastreb, T. O. (2021). Jasmonate signaling and plant adaptation to abiotic stressors (Review), *Applied Biochemistry and Microbiology*, *57*, 1-19.
- Kolupaev, Yu. E., Horielova, E.I., Yastreb, T.O., Popov, Yu. V., & Rybchun, N.I. (2018). Phenylalanine ammonia - lyase activity and content of flavonoid compounds in wheat seedlings at the action of hypothermia and hydrogen sulfide donor. *J. Ukr.Biochem.*, *90(6)*, 12-20.
- Kolupaev, Yu. E., Karpets, Yu. V., Kabashnikova, L. F. (2019). Antioxidative system of plants: cellular compartmentation, protective and signaling functions, mechanisms of regulation (Review). *Appl. Biochem. Microbiol.*, *55*, 441–459.
- Kolupaev, Yu. E., Karpets, Yu. V., Yastreb, T. O., & Lugovaya, A. A. (2018). Combined effect of salicylic acid and nitrogen oxide donor on stress-protective system of wheat plants under drought conditions. *Appl. Biochem. Microbiol.* *54* (4), 418-424.
- Kolupaev, Yu. E., Oboznyi, A. I., Shvidenko, N. V. (2013). Role of hydrogen peroxide in generation of a signal inducing heat tolerance of wheat seedlings. *Russ. J. Plant Physiol.* *60(2)*, 227-234.
- Kolupaev, Yu. E., Ryabchun, N. I., Vayner, A. A., Yastreb, T. O., & Oboznyi, A. I. (2015). Antioxidant enzyme activity and osmolyte content in winter cereal seedlings under hardening and cryostress. *Russ. J. Plant Physiol.* *62(4)*, 499-506.
- Kolupaev, Yu.E., Trunova, T.I. (1994). Hypothermia and salt stress influence on invertase activity and carbohydrate content in wheat coleoptiles. *Russ. J. Plant Physiol.* *41* (4): 485-489.

- Kolupaev, Yu. E., Yastreb, T. O., Oboznyi, A. I., Ryabchun, N. I., & Kirichenko V.V. (2016). Constitutive and cold-induced resistance of rye and wheat seedlings to oxidative stress. *Russ. J. Plant Physiol.* 63 (3): 346-358.
- Konstantinova, T., Parvanova, D., Atanassov, A., Djilianov, D. (2002). Freezing Tolerant Tobacco, Transformed to Accumulate Osmoprotectants. *Plant Sci.*, 163, 157-164.
- Koster, K.L., Lynch, D.V. (1992). Solute accumulation and compartmentation during the cold acclimation of puma rye. *Plant Physiol.* 98: 108-113.
- Kozloff, L.M., Turner, M.A., Arellano, F.J. (1991). Formation of bacterial membrane ice-nucleating lipoglycoprotein complexes. *Bacteriol.*, 173., 6528-6536.
- Krasylenko, Y.A., Yemets, A.I. & Blume, Y.B. (2010) Functional role of nitric oxide in plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 57 (4), 451–461.
- Kurimoto, K., Millar, A.H., Lambers, H., Day, D. A., & Noguchi, K. (2004). Maintenance of growth rate at low temperature in rice and wheat cultivars with a high degree of respiratory homeostasis is associated with a high efficiency of respiratory ATP production. *Plant Cell Physiol.* V. 45, 1015-1022.
- Lai, D.W., Mao, Y., Zhou, H., Li, F., Wu, M., Zhang, J., Xie, Y. (2014). Endogenous hydrogen sulfide enhances salt tolerance by coupling the reestablishment of redox homeostasis and preventing salt-induced K⁺ loss in seedlings of *Medicago sativa*. *Plant Sci.*, 225., 117–129.
- Lyons J.M. (1973). Chilling injury in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24, 445 – 466.
- Lei, T., Feng, H., Sun, X., Dai, Q.L., Zhang, F., Liang, H.G., & Lin, H.H. (2010). The alternative pathway in cucumber seedlings under low temperature stress was enhanced by salicylic acid. *Plant Growth Regulation*, 60, 35-42.
- Levitt, J. (1980). Responses of plants to environmental stresses. – *London etc: Acad. Press*, 1., 497
- Li, H., Ye, K., Shi, Y., Cheng, J., Zhang, X., Yang, S. (2017). BZR1 Positively regulates freezing tolerance via CBF-dependent and CBF-independent pathways in arabidopsis. *Mol. Plant.* 10 (4): 545-559.

- Li, J., Zhang, K., Meng, Y., Hu, J., Ding, M., Bian, J., Zhou, M. (2018). Jasmonic acid/ethylene signaling coordinates hydroxycinnamic acid amides biosynthesis through ORA59 transcription factor. *Plant J.V.* 95 (3), 444–457.
- Li, Q., Wang, Z., Zhao, Y., Zhang, X., Zhang, S., Bo, L...An, L. (2016). Putrescine protects hullless barley from damage due to UV-B stress via H₂S- and H₂O₂-mediated signaling pathways. *Plant Cell Rep.*, 35(5),1155-1168.
- Li, S. P, Hu, K. D, Hu, L. Y, Li, Y. H, Jiang, A. M, Xiao, F...Zhang H. (2014). Hydrogen sulfide alleviates postharvest senescence of broccoli by modulating antioxidant defense and senescence-related gene expression. *J Agric Food Chem.* 62(5),1119-1129.
- Li, Z. G (2013). Hydrogen sulfide: a multifunctional gaseous molecule in plants. *Russ J Plant Physiol.* 60,733–40.
- Li, Z.G (2015). Synergistic effect of antioxidant system and osmolyte in hydrogen sulfide and salicylic acid crosstalk-induced heat tolerance in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Plant Signal Behav* 10:9. E1051278.
- Li, Z. G., Yang, S. Z., Long, W. B., Yang, G. X. & Shen, Z. Z., (2013). Hydrogen sulfide may be a novel downstream signal molecule in nitric oxide-induced heat tolerance of maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Plant Cell Environ.*, 36, 1564–1572.
- Liang, X., Zhang, L., Natarajan, S.K., Becker D.F. (2013) Proline mechanisms of stress survival, *Antioxid. Redox Signal.*, 19, 998-1011.
- Lisjak, M., Teklic, T., Wilson, I. D., Whiteman, M., & Hancock, J.T. (2013). Hydrogen sulfide: environmental factor or signalling molecule? *Plant Cell Environ*, 36, 1607–1616.
- Liu, W., Yu, K., He, T., Li, F., Zhang, D., & Liu, J. (2013).The low temperature induced physiological responses of *Avena nuda* L., a cold-tolerant plant species , *Sci. World J. V. Article ID 658793.* <https://doi.org/10.1155/2013/658793>.
- Liu, Z, Li Y, Cao, C, Liang, S, Ma, Y, Liu, X, & Pei, Y (2019). The role of H₂S in low temperature-induced cucurbitacin C increases in cucumber. *Plant Mol Biol* 99:535–44.

- Livingston, III D.P., Henson, C.A. (1998). Apoplastic sugars, fructan exohydro-lase and invertase in winter oat: responses to second phase cold hardening. *Plant Physiol.* 116: 403-408.
- Luo, Y., Tang, H. Zhang, Y. (2011). Production of reactive oxygen species and antioxidant metabolism about strawberry leaves to low temperatures. *J. Agr. Sci.* V. 3, 89-96.
- Luo, Z, Li D, Du, R, Mou, W (2015). Hydrogen sulfide alleviates chilling injury of banana fruit by enhanced antioxidant system and proline content. *Sci Hortic* 183,144–51.
- Majláth, I., Szalai, G., Janda, T. (2011). Exploration of cold signalling related to ascorbate and salicylic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Acta Biol. Szeged.* 55 (1): 117-118.
- Mamaeva, A. S., Fomenkov, A. A., Nosov, A. V. et al. (2015). Regulatory role of nitric oxide in plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 62 (4), 427 - 440.
- Markovskaya, E. F., Sherudilo, E. G., Galibina, N. A., & Sysoeva, M. I. (2010). The role of carbohydrates in the responses of chilling-sensitive plants to short- and long-term low-temperature treatments. *Russ. J. Plant Physiol.* 57(5),641-647.
- Markovskaya, E. F., Shibaeva, T. G. (2017). Low temperature sensors in plants: Hypotheses and assumptions. *Biology Bulletin.*, 44(2): 150-158.
- Matos, A. R., Hourton-Cabassa, C., Çiçek, D., Rezé, N., Arrabaça, J.D., Zachowski, A., & Moreau, F. (2007). Alternative oxidase involvement in cold stress response of *Arabidopsis thaliana* FAD2 and FAD³⁺ cell suspensions altered in membrane lipid composition. *Plant Cell Physiol.*, 48, 856-865.
- Matsumura, T., Tabayashi, N., Kamagata, Y., Souma, C., & Saruyama, H. (2002). Wheat catalase expressed in transgenic rice can improve tolerance against low temperature stress. *Physiol. Plant.*, 116, 317-327.
- McKersie, B.D., Senaratna, T., Walker, M.A., Kendall, E.J. & Hetherington, P.R. (1988) Deterioration of membranes during aging in plants: evidence for free radical mediation. *Senescence and Aging in Plants*. Eds L.D. Nooden, A.C. Leopold. – *Academic Press*, P. 441-464.

- Medvedev, S.S. (2005). Calcium signaling system in plants. *Russ. J. Plant Physiol.* 52(2), 249-270.
- Mehla, N., Sindhi, V., Josula, D., Bisht, P., & Wani, S.H. (2017). An introduction to antioxidants and their roles in plant stress tolerance, Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation under Abiotic Stress. Eds. M.I.R. Khan, N.A. Khan. – *Springer Nature Singapore Pte Ltd.*, P. 1-24.
- Mei, Y., Song, S. (2010). Response to temperature stress of reactive oxygen species scavenging enzymes in the cross-tolerance of barley seed germination. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.*,11, 965-972.
- Min, K., Showman, L., Perera, A., Arora, R. (2018). Salicylic acid-induced freezing tolerance in spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves explored through metabolite profiling. *Environ. Exp. Bot.* 156 : 214-227.
- Mishra, S., Dubey, R. S. (2006). Inhibition of ribonuclease and protease activities in arsenic exposed rice seedlings: role of proline as enzyme protectant. *J. Plant Physiol.* 163, 927-936.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405-410.
- Miura, K., Furumoto, T. (2013). Cold signaling and cold response in plants. *Int. J. Mol. Sci.*, 6;14(3), 5312-37. doi: 10.3390/ijms14035312.
- Miura, K., Tada, Y. (2014). Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Front. Plant Sci.* 5, 4.
- Mizuno, N., Sugie, A., Kobayashi, F., Takumi, S. (2008). Mitochondrial alternative pathway is associated with development of freezing tolerance in common wheat. *Plant Physiol.*, 165, 462-467.
- Molinari, H. B. C., Marura, C. J., Daros, E., De Campos , M. K. F., De Carvalho, J.F.R.P., Filho, J. C. B.,...Vieira, L. G. E. (2007). Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. *Physiol. Plant.*, 130, 218-229.

- Moller, I. M., Sweetlove, L.J. (2010). ROS signaling-specificity is required. *Trends Plant Sci.*, 15, 370-374.
- Morelli, R., Russo-Volpe, S., Bruno, N., Lo, Scalzo R. (2003). Fenton-dependent damage to carbohydrates: free radical scavenging activity of some simple sugars, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 7418-7425.
- Mostofa, M.G., Fujita, M., Tran, L.S.P. (2015). Nitric oxide mediates hydrogen peroxide -and salicylic acid-induced salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Plant Grow. Regul.* 77: 265-277.
- Munne-Bosch, S., Alegre, L. (2002). The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21: 31-57.
- Ndong, C., Danyluk, J., Huner, N.P., Sarhan, F. (2001). Survey of gene expression in winter rye during changes in growth temperature, irradiance or excitation pressure. *Plant Mol. Biol.*, 45, 691-703.
- Neill, S. O., Gould, K. S. (2003). Anthocyanins in leaves: light attenuators or antioxidants? *Functional Plant Biol.* 30: 865-873.
- Neill, S., Barros, R., Bright, J., Desikan, R., Hancock, J., Harrison, J...Wilson, I., (2008). Nitric oxide, stomatal closure and abiotic stress. *J. Exp. Bot.*, 59, 165–76.
- Nogues, S., Baker, N.R. (2000). Effects of drouht on photosynthesis in Mediterranean plants grown under UV-B radiation. *J. Exp. Bot.*, 51, 1309–1317.
- Olenichenko, N.A., Zagoskina, N.V., Astakhova, N.V., Trunova, T.I., & Kuznetsov Yu.V. (2008). Primary and secondary metabolism of winter wheat under cold hardening and treatment with antioxidants. *Appl Biochem Microbiol.* 44 (5), 535-540.
- Orvar, B.L., Sangwan , V., Omann, F., Dhindsa, R.S. (2000). Early steps in cold sensing by plant cells: The role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant J. V.* 23, 785-794.
- Oz, M.T., Eyidogan, F., Yucel, M. and Oktem, H.A. (2015). Functional role of nitric oxide under abiotic stress conditions, in Nitric Oxide in Plants: Metabolism and Role in Stress Physiology (eds M. Khan et al.), *Springer International Publishing Switzerland*, pp. 21-42.

- Ozden, M., Demirel, U., Kahraman, A. (2009). Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) exposed to oxidative stress by H₂O₂. *Sci. Horticult.*, 119, 163-168.
- Paciolla, C., Paradiso, A., de Pinto, M.C. (2016). Cellular redox homeostasis as central modulator in plant stress response. Redox State as a Central Regulator of Plant-Cell Stress Responses. Eds. D.K. Gupta et al. *Springer International Publishing Switzerland*, 1-23.
- Pan, D. Y, Fu, X., Zhang, X.W., Liu, F.J., Bi, H.G., & Ai, X.Z. (2020). Hydrogen sulfide is required for salicylic acid-induced chilling tolerance of cucumber seedlings. *Protoplasma*. 257, 1543-1557.
- Pennycooke, J. C., Jones, M. L., Stushnoff, C. (2003). Down-regulating alpha-galactosidase enhances freezing tolerance in transgenic petunia. *Plant Physiol* 133, 901-909.
- Petrov, V., Hille, J., Mueller-Roeber, B., Gechev, T.S. (2015). ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. *Front. Plant Sci.* 6:69.
- Piotrovskii, M.S., Shevyreva, T.A., Zhestkova, I.M., Trofimova, M.S. (2011). Activation of plasmalemmal NADPH oxidase in etiolated maize seedlings exposed to chilling temperatures, *Russ. J. Plant Physiol.* 58(2), 290-298.
- Planas-Riverola, A., Gupta, A., Betegon-Putze, I., Bosch, N., Ibanes, M., & Cano-Delgado, A.I. (2019). Brassinosteroid signaling in plant development and adaptation to stress. *Development*. 146. dev151894.
- Puyaubert, J., Baudouin, E. (2014). New clues for a cold case: nitric oxide response to low temperature. *Plant Cell Environ.* 37, 2623-2630.
- Radyuk, M. S., Domanskaya, I. N., Shcherbakov, R. A., & Shalygo, N. V. (2009). Effect of low above-zero temperature on the content of low-molecular antioxidants and activities of antioxidant enzymes in green barley leaves. *Russ. J. Plant Physiol.* 56(2), 175-180.
- Radyukina, N.L., Shashukova, A.V., Makarova, S.S., & Kuznetsov, V.I.V. (2011). Exogenous proline modifies differential expression of superoxide dismutase

- genes in UV-B-irradiated *Salvia officinalis* plants. *Russ. J. Plant Physiol.* 58(1), 51-59.
- Radyukina, N.L., Toaima, V.I.M., Zaripova, N.R. (2012). The involvement of low-molecular antioxidants in cross-adaptation of medicine plants to successive action of UV-B radiation and salinity. *Russ. J. Plant Physiol.* 59(1), 71-78.
- Ramel, F., Sulmon, C., Bogard, M., Couée, I., & Gouesbet, (2009). G. Differential patterns of reactive oxygen species and antioxidative mechanisms during atrazine injury and sucrose-induced tolerance in *Arabidopsis thaliana* plantlets. *BMC Plant Biol.*, 9:28.
- Rasheed, R., Wahid A., Ashraf M., & Basra S.M.A. (2010). Role of proline and glycinebetaine in improving chilling stress tolerance in sugarcane buds at sprouting. *Int. J. Agr. Biol.* 12, 1-8.
- Rhoads D.M., Umbach A.L., Subbaiah C.C., & Siedow J.N. (2006). Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. *Plant Physiol*, 141, 357 - 366.
- Ribas-Carbo M., Aroca R., Conzalez-Meler M.A., Irigoyen J.J., & Sanchezdiaz M. (2000). The electron partitioning between the cytochrome and alternative respiratory pathways during chilling recovery in two cultivars of maize different in chilling sensitivity. *Plant Physiol.*, 122, 199-204.
- Rogov, A. G., Zvyagilskaya, R. A. (2015). Physiological role of alternative oxidase (from yeasts to plants). *Biochemistry (Mosc.)*, 80(4), 400-407.
- Romero, L. C, García, I, Gotor, C. (2013). L-cysteine desulphydrase 1 modulates the generation of the signaling molecule sulfide in plant cytosol. *Plant Signal Behav*, 8, 4621–4634.
- Roszer, T. (2014). Biosynthesis of nitric oxide in plants. In: *Nitric Oxide in Plants: Metabolism and Role in Stress Physiology* (ed. M.N. Khan et al.), 17–32. Switzerland: Springer International Publishing.
- Ruelland, E., Zachowski, A. (2010). How plants sense temperature. *Envir. Exp. Bot.*, V. 69, 225-232.

- Sadras, V. O., Monzon, J. P. (2006). Modelled wheat phenology captures rising temperature trends: shortened time to flowering and maturity in Australia and Argentina. *Field Crops Res.*, 99, 136–146.
- Saleem, M, Fariduddin, Q, Janda, T. (2020). Multifaceted role of salicylic acid in combating cold stress in plants: A review. *Journal of Plant Growth Regulation*.
- Sami, F., Faizan, M., Faraz, A., Siddiqui H. (2018). Nitric oxide mediated integrative alterations in plant metabolism to confer abiotic stress tolerance, NO crosstalk with phytohormones and NO-mediated post translational modifications in modulating diverse plant stress. *Nitric Oxide.*;73:22-38.
- Sangwan, V., Foulds, I., Singh, J., & Dhindsa, R. S. (2001). Cold-Activation of Brassica napus BN115 promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires Ca²⁺ influx. *Plant J.* 27, 1-12.
- Savvides A., Ali S., Tester M., & Fotopoulos V. (2016) Chemical priming of plants against multiple abiotic stresses: mission possible?. *Trends Plant Sci.*, 21, 329–340.
- Scandalios J.G. (2002) .The rise of ROS. *Trends Biochem. Sci.* 27, 483-486.
- Searle, S.Y., Thomas, S., Griffin, K.L., Horton, T., Kornfeld, A., Yakir, D., Hurry, V., & Turnbull, M. H. (2011). Leaf respiration and alternative oxidase in field-grown alpine grasses respond to natural changes in temperature and light, *New Phytol.* 189, 1027-1039.
- Shakirova, F. M., Allagulova, Ch. R., Bezrukova, M. V., Aval'baev, A. M., & Gimalov, F. R. (2009). The role of endogenous ABA in cold-induced expression of the TADHN dehydrin gene in wheat seedlings. *Russ. J. Plant Physiol.* 56(5), 720-723.
- Shen, B., Jensen, R.G., Bohnert, H.J. (1997). Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. *Plant Physiol.*, 115, 527-532.
- Shevyakova, N. I., Bakulina, E. A., and Kuznetsov, Vl. V. (2009). Proline antioxidant role in the common ice plant subjected to salinity and paraquat treatment inducing oxidative stress, *Russ. J. Plant Physiol.*, 56, 663–669.

- Shi H, Ye. T., Chan, Z. (2013). Exogenous application of hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide enhanced multiple abiotic stress tolerance in bermudagrass (*Cynodon dactylon* (L.). Pers.). *Plant Physiol Biochem* 71,226–234.
- 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* 57, 628–640.
- Shi H., Ye T., Chan Z. (2013). Exogenous application of hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide enhanced multiple abiotic stress tolerance in bermudagrass (*Cynodon dactylon* (L.). Pers. *Plant Physiol Biochem.*, 71, 226–234.
- Shi, K., Fu, L.J., Zhang, S., Li, X., Liao, Y.W.K., Xia, X.J...Yu, J.Q. (2013). Flexible change and cooperation between mitochondrial electron transport and cytosolic glycolysis as the basis for chilling tolerance in tomato plants. *Planta.*, 237, 589-601.
- Shichijo, C., Hamada, T., Hiraoka, M., Johnson, C.B., & Hashimoto T. (1993). Enhancement of red-light-induced anthocyanin synthesis in sorghum first internodes by moderate low temperature given in the pre-irradiation culture period. *Planta*. 191, 238-245.
- Shin, H., Min, K., Arora, R. (2018). Exogenous salicylic acid improves freezing tolerance of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. *Cryobiology*. 81, 192-200.
- Siddiqui, M. H., Mohammad, F. Khan M.N. (2009). Morphological and physiological and biochemical characterization of *Brassica juncea* L. Czern. & Coss. genotypes under salt stress. *Journal of Plant Interactions*, 4, 67–80.
- Sin'kevich, M. S., Deryabin, A. N., Trunova, T. I. (2009). Characteristics of oxidative stress in potato plants with modified carbohydrate metabolism, *Russ. J. Plant Physiol*, 56, 168-174.
- Singh S., Kumar V., Kapoor D., Kumar S., Singh S., Dhanjal D.S., & Singh J. (2020). Revealing on hydrogen sulfide and nitric oxide signals co-ordination for plant growth under stress conditions. *Physiol Plant*. 168, 301–17.
- Singh, V.P., Singh, S., Kumar, J., & Prasad, S.M. (2015). Hydrogen sulfide alleviates toxic effects of arsenate in pea seedlings through up-regulation of the ascorbate-

- glutathione cycle: possible involvement of nitric oxide. *J Plant Physiol* 181,20–29.
- Sinkevich, M. S., Naraykina, N. V., & Trunova, T. I. (2010). Involvement of sugars in the antioxidant defense against paraquat-induced oxidative stress in potato transformed with yeast invertase gene. *Doklady Biological Sciences*. 434: 338-340.
- Streb, P., Shang, W, Feierabend, J. (1999). Resistance of cold-hardened winter rye leaves (*Secale cereale* L.) to photo-oxidative stress. *Plant Cell Environ.*, 22, 1211-1223.
- Sugie A., Naydenov N., Mizuno N., Nakamura C., Takumi S. (2006). Overexpression of wheat alternative oxidase gene *Waoxla* alters respiration capacity and response to reactive oxygen species under low temperature in transgenic *Arabidopsis*. *Genes Genet. Syst*, 81, 349-354.
- Sun Y., Zhang W., Zeng T., Nie Q., Zhang F., & Zhu L. (2015). Hydrogen sulfide inhibits enzymatic browning of fresh-cut lotus root slices by regulating phenolic metabolism. *Food Chemistry*. 2015; 177: 376-381.
- Svenning, M. M., Rosnes, K., Junttila, O. (1997). Frost tolerance and biochemical changes during hardening and dehardening in contrasting white clover populations. *Physiol. Plant*. V. 101, 31-37.
- Szabados L., Savoure A. (2009). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci*, 15., 89-97.
- Liang X., Zhang L., Natarajan S.K., & Becker D.F. (2013). Proline mechanisms of stress survival. *Antioxid. Redox Signal.*, 19, 998-1011.
- Szechynska-Hebda, M., Hebdab, M., Mierzwinski, D., Kuczynskac, P., Mireka, M., Wedzonyd, M., van Lammerene, A., & Karpinski, S. (2013). Effect of cold-induced changes in physical and chemical leaf properties on the resistance of winter triticale (\times *Triticosecale*) to the fungal pathogen *Microdochium nivale*. *Plant Pathol*. 62: 867-878.

- Szollosi R. (2014). Superoxide dismutase (SOD) and abiotic stress tolerance in plants: an overview. oxidative damage to plants. *Antioxidant Networks and Signaling* / Ed P. Ahmad. *Elsevier Inc.*, 89-129.
- Taji T., Ohsumi C., Iuchi S., Seki M., Kasuga M., Kobayashi M., Yamaguchi-Shinozaki K., & Shinozaki K. (2002). Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 29, 417-426.
- Takumi, S., Tomioka, M., Eto, K., Naydenov, N., & Nakamura, C. (2002) Characterization of two non-homoeologous nuclear genes encoding mitochondrial alternative oxidase in common wheat. *Gen. Cenet. Syst.*, 77, 81-88.
- Tantau H., Balko C., Brettschneider B., Melz G., & Dorffling K. (2004). Improved frost tolerance and winter survival in winter barley (*Hordeum vulgare* L.) by in vitro selection of proline overaccumulating lines. *Euphytica*. 139, 19-32.
- Tasgin, E., Atici, O., Nalbantoglu, B. (2003). Effects of salicylic acid and cold on freezing tolerance in winter wheat leaves. *Plant Growth Regul.* 41, 231-236.
- Teige, M., Scheikl, E., Eulgem, T., Doczi, R., Ichimura, K., Shinozaki, K., & Hirt, H. (2004). The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*, *Mol. Cell.*, 15, 141-152.
- Thakur, P., Nayyar, H. (2013). Chapter 2. Facing the Cold Stress by Plants in the Changing Environment: Sensing, Signaling, and Defending Mechanisms // *Plant Acclimation to Environmental Stress*. Eds. N. Tuteja, S. Singh Gill., *New York: Springer Science+Business Media*, 29-69.
- Theocharis, A., Clement, C., Barka, E.A. (2012). Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. *Planta*. 235, 1091-1105.
- Tognolli, M., Penel, C., Greppin, H., & Simon, P. (2003). Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*. 288, 129-138.
- Trchounian, A., Petrosyan, M., Sahakyan, N. (2016). Plant cell redox homeostasis and reactive oxygen species // *Redox State as a Central Regulator of Plant-Cell Stress*

- Responses. Eds. D.K. Gupta et al. *Springer International Publishing Switzerland*, 25-50.
- Trischuk, R.G., Schilling, B.S., Wisniewski, M., & Gusta, L.V. (2006). Freezing stress: systems biology to study cold tolerance. *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*. Eds. K. Madhava Rao, A. Raghavendra, K. Janardhan Reddy. Dordrecht: *Springer*, 131-155.
- Vagujfalvi, A., Kerepesi, I., Galiba, G., Tischner, T., & Sutka, J. (1999). Frost hardiness depending on carbohydrate changes during cold acclimation in wheat. *Plant Sci.* *144*, 85–92.
- Vlot, A. C., Dempsey, D. A., & Klessig, D. F. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*, *47*, 177–206.
- Wang, J., Rajakulendran, N., Amirsadeghi, S., & Vanlerberghe, G.C. (2011). Impact of mitochondrial alternative oxidase expression on the response of *Nicotiana tabacum* to cold temperature. *Physiol. Plant.*, *142*, 339-351.
- Wang, L. J, Li, S. H. (2006). Salicylic acid-induced heat or cold tolerance in relation to Ca^{2+} homeostasis and antioxidant systems in young grape plants. *Plant Science.*; *170(4)*: 685-694.
- Wang W., Wang X., Huang M., Cai J., Zhou Q., Dai T., Cao W., & Jiang D. (2018). Hydrogen peroxide and abscisic acid mediate salicylic acid-induced freezing tolerance in wheat. *Front. Plant Sci.* *3 (9)*,1137.
- Wanner, L. A., Junttila, O. (1999). Cold-induced freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* *V. 120*, 391-399.
- Wasternack, C., Hause, B. Jasmonates:(2013). Biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Ann. Bot.* *111*, 1021–1058.
- Wingsle G., Karpinski S., Hällgren J.E. (1999). Low Temperature, high light stress and antioxidant defence mechanisms in higher plants. *Phyton (Austria)*, *39*, 253-268.
- Wong, C.E., Li Y., Whitty, B.R., Diaz-Camino, C., Akhter, S.R., Brandle, J.E. ...Griffith, M. (2005). Expressed sequence tags from the Yukon ecotype of

- The llungiella reveal that gene expression in response to cold, drought and salinity shows little overlap. *Plant Mol. Biol.* 58, 561-574.
- Xu, J., Yin, H., Li, X. (2009). Protective effects of proline against cadmium toxicity in micropropagated hyperaccumulator, *Solanum nigrum* L. *Plant Cell Rep.* 28, 325-333.
- Yamasaki, H., Cohen, M.F. (2016). Biological consilience of hydrogen sulfide and nitric oxide in plants: Gases of primordial earth linking plant, microbial and animal physiologies. *Nitric Oxide* 55–56, 91–100.
- Yemets, A.I., Karpets, Yu. V., Kolupaev, Yu.E. & Blume, Ya. B. (2019). Emerging technologies for enhancing ROS/RNS homeostasis. In: *Reactive Oxygen, Nitrogen and Sulfur Species in Plants: Production, Metabolism, Signaling and Defense Mechanisms*, V. 2. Eds. Hasanuzzaman M. et al.). *John Wiley & Sons Ltd.*, 873-922.
- Yordanova, R., Popova, L. (2007). Effect of exogenous treatment with salicylic acid on photosynthetic activity and antioxidant capacity of chilled wheat plants. *Gen. Appl. Plant Physiol.* 33 (3-4), 155-170.
- Yoshida, M., Kawakami, A. (2013). Molecular analysis of fructan metabolism associated with freezing tolerance and snow mold resistance of winter wheat // *Plant and Microbe Adaptations to Cold in a Changing World*. Eds. R. Imai et al. – *New York Springer Science+Business Media*, 231-243.
- Yu, L., Zhang, C., Shang, H., Wang, X., Wei, M., Yang, F., & Shi, Q. (2013). Exogenous hydrogen sulfide enhanced antioxidant capacity, amylase activities and salt tolerance of cucumber hypocotyls and radicles. *J. Integr. Agricult.*, 12, 445–456.
- Zhang, X., Wang, K., Ervin, E.H., Waltz, C., & Murphy, T. (2011). Metabolic changes during cold acclimation and deacclimation in five bermudagrass varieties. I. Proline, total amino acid, protein, and dehydrin expression. *Crop Sci.*, 51, 838–846.

- Zhao, M.G., Chen, L., Zhang, L.L. & Zhang, W.H. (2009). Nitric reductase-dependent nitric oxide production is involved in cold acclimation and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *151*, 755–767.
- Zhong-Guang, L., Ming, G. (2011). Mechanical stimulation-induced cross-adaptation in plants: An overview. *J. Plant Biol*, *54*, 358-364.
- Zhou, J., Wang, J., Shi, K., Xia, X. J., Zhou, Y. H., & Yu, J. Q. (2012). Hydrogen peroxide is involved in the cold acclimation-induced chilling tolerance of tomato plants. *Plant Physiol. Biochem.* *60*, 141-149.
- Zucker, M.(1965). Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. *Plant Physiol.* *40* : 779-784.
- Zuther, E., Buchel, K., Hundertmark, M., Stitt, M., Hinch, D.K., & Heyer, A.G. (2004). The role of raffinose in the cold acclimation response of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* *576*, 169-173.

ДОДАТОК А

Список публікацій за темою дисертації та відомості про апробацію результатів дисертації

Статті у наукових виданнях, що індексовані у наукометричній базі:

Scopus:

1. Kolupaev Yu. E., Horielova E. I., Yastreb T. O., Popov Yu. V., & Rybchun N. I. (2018). Phenylalanine ammonia-lyase activity and content of flavonoid compounds in wheat seedlings at the action of hypothermia and hydrogen sulfide donor. *Ukr. Biochem. J.*, 90 (6), 12-20. (Особистий внесок дисертанта: проведення експериментів, обробка та інтерпретація результатів)

2. Kolupaev Yu. E., Horielova E. I., Yastreb T. O., & Ryabchun N. I. (2020). State of antioxidant system in triticale seedlings at cold hardening of varieties of different frost resistance. *Cereal Res. Commun*, 48 (2), 165-171. (Особистий внесок дисертанта: проведення експериментів, обробка та інтерпретація результатів)

Статті у наукових фахових виданнях України:

3. Колупаев Ю. Е., Горелова Е. И., Ястреб Т. О. (2018). Механизмы адаптации растений к гипотермии: роль антиоксидантной системы. *Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту Сер. Біологія*, 1 (43), 6-33. (Особистий внесок дисертанта: пошук та опрацювання джерел літератури)

4. Горелова Е. И., Колупаев Ю. Е., Ястреб Т. О., Швиденко Н. В., Попов Ю. В., Шкляревский М. А, Рябчун Н. И. (2018). Конститутивная и индуцированная холодным закаливанием антиоксидантная активность проростков озимых злаков. *Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія*, 2 (44), 59-68.

(Особистий внесок дисертанта: проведення експериментів, обробка та інтерпретація результатів, участь у написанні тексту статті)

5. Горелова Е. И., Швиденко Н. В., Рябчун Н. И., Колупаев Ю. Е. (2018). Вторичный метаболизм проростков *Secale cereale* при действии донора

сероводорода и холодового закаливання. *Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія*, 3(45), 59 – 68. (Особистий внесок дисертанта: проведення експериментів, обробка та інтерпретація результатів, участь у написанні тексту статті)

6. Горелова Е. И., Шкляревский М. А., Рябчун Н. И., Кабашникова Л. Ф., Колупаев Ю. Е. (2020). Комбинированное влияние салициловой кислоты и донора оксида азота на развитие индуцированной закаливанием морозоустойчивости проростков пшеницы. *Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту Сер. Біологія*, 2 (50), 93-104. (Особистий внесок дисертанта: проведення експериментів, обробка та інтерпретація результатів, участь у написанні тексту статті)

7. Горелова О. І., Шкляревський М. А., Колупаєв Ю. Є. (2020). Вміст вторинних метаболітів у проростках тритикале різних генотипів за умов холодового загартування. *Фізіологія рослин і генетика*, 52, (5), 401-411. (Особистий внесок дисертанта: проведення експериментів, обробка та інтерпретація результатів, участь у написанні тексту статті)

8. Горелова О. І., Рябчун Н. І., Шкляревський М. А., Резнік А. М., Колупаєв Ю. Є. (2020). Морозостійкість злаків корелює з інтегрованими показниками вмісту низькомолекулярних протекторних сполук і активності антиоксидантних ферментів. *Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту Сер. Біологія*, 3 (51), 71-86.

(Особистий внесок дисертанта: проведення експериментів, участь в обробці та інтерпретації результатів та написанні тексту статті)

9. Горелова О. І., Колупаєв Ю. Є. (2021). Регуляція холодо- і морозостійкості рослин дією екзогенних газотрансмітерів і фітогормонів. *Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту Сер. Біологія*, 1 (52), 32-51.

(Особистий внесок дисертанта: пошук та опрацювання джерел літератури, участь у написанні тексту)

Матеріали конференцій:

10. Горелова Е. И., Колупаев Ю. Е., Ястреб Т. О., Рябчун Н. И. (2018). Влияние донора сероводорода и холодового закаливания на активность фенилаланинаммонийлиазы и содержание флавоноидов в проростках озимых ржи и пшеницы. *Сучасна біологія рослин: теоретичні та прикладні аспекти: IV Міжнародна наукова конференція (м. Харків, Україна): Тези доповідей.* (С. 44-45). Харків.

11. Горелова О. І., Швиденко М. В., Рябчун Н. І., Колупаєв Ю. Є. (2020). Вплив донорів газотрансмітерів на холодове загартування проростків озимих злаків. *Сучасні проблеми генетики, біотехнології і біохімії сільськогосподарських рослин: Міжнародна наукова конференція (м. Одеса, Україна): Тези доповідей* (С. 86-87). Одеса.

12. Горелова О. І., Колупаєв Ю. Є., Шкляревський М. А., Рябчун Н. І. (2021). Пролін і стійкість злаків до агентів окиснювального стресу і гіпотермії. *Міжнародна наукова конференція «Стрес і адаптація рослин» (м. Харків, Україна): Матеріали конференції. Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. Спец. випуск* (С. 104–105).

13. Горелова О.І., Гавва К.М., Рябчун Н.І., Колупаєв Ю.Є. Індукування накопичення вторинних метаболітів *Triticum aestivum* і стійкості до зневоднення і кріостресу дією донора H₂S (2021). *Міжнародна наукова конференція «Стрес і адаптація рослин» (м. Харків, Україна): Матеріали конференції. Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. Спец. випуск.* (С. 102–103).

14. Горелова О. І., Резнік А. М., Рябчун Н. І., Колупаєв Ю. Є. (2021). Зв'язок морозостійкості озимих зернових культур зі станом антиоксидантної системи. *Селекція зернових та зернобобових культур в умовах змін клімату: напрями і пріоритети: тези доповідей Міжнародної наукової конференції (м. Одеса, Україна):* (С. 88–89). Одеса: СГІ–НЦНС.

Апробація результатів дисертації

Основні положення роботи викладено та обговорено на науково- практичних конференціях різного рівня:

1. IV Міжнародна наукова конференція «Сучасна біологія рослин: теоретичні та прикладні аспекти» (Харків, 9 - 10 жовтня 2018р., форма участі – усна доповідь).

2. Міжнародна наукова конференція «Сучасні проблеми генетики, біотехнології і біохімії сільськогосподарських рослин» (Одеса, 21 жовтня, 2020 форма участі – заочна).

3. Міжнародна наукова конференція «Стрес і адаптація рослин» (Харків, 25-26 лютого 2021 форма участі – усна доповідь).

4. Міжнародна наукова конференція «Селекція зернових та зернобобових культур в умовах змін клімату: напрями і пріоритети: тези доповідей Міжнародної наукової конференції (Одеса, 5 травня форма участі – заочна).