МОН УКРАЇНИ
УМАНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ САДІВНИЦТВА
(УНУС)

Факультет плодоовочівництва, екології та захисту рослин
Кафедра біології

Допущено до захисту
„_____” _____ 2023 р.
Зав. кафедри к. с.–г. н., доцент
_____Лариса РОЗБОРСЬКА

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
ступеня вищої освіти магістр

ІНДУКУВАННЯ РОЗВИТКУ МОРОЗОСТІЙКОСТІ ЗЛАКІВ ЕКЗОГЕННИМИ СИГНАЛЬНИМИ СПОЛУКАМИ

Виконав: студент ІІ курсу, групи 21 м-б
Освітньої програми Агробіологія
Спеціальності 091 Біологія
ЛУТ Євгеній Русланович

Керівник: Жиляк І.Д., канд. хім. наук, доцент

Умань – 2023

ЗМІСТ

Вступ	3
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	7
1.1.Актуальність проблеми морозостійкості злаків в контексті сучасних змін клімату	7
1.2.Реакції рослин на дію низьких температур	9
1.2.1.Ефекти низьких температур на субклітинному і клітинному рівнях.	9
1.2.2.Посилення утворення АФК (вторинний окислювальний стрес) у рослин за умов гіпотермії.	11
1.2.3.Сприйняття і передача холодового сигналу.	14
Висновки до розділу 1	20
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛ, УМОВИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	21
2.1.Коротка характеристика об’єктів досліджень	21
Пророщування зернівок і умови холодового загартування такріострес рослин	22
2.3.Обробка рослинного матеріалу екзогенними індукторами стійкості (донорами H_2S, NO, саліциловою кислотою)	23
2.4.Біохімічні показники	24
2.4.1.Антиоксидантні ферменти.	24
2.4.2.Аналіз активності фенілаланінамонійліази (ФАЛ).	24
2.4.3.Вміст білків.	25
2.4.4.Низькомолекулярні сполуки.	25
2.4.5.Інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ).	26
2.5.Повторення і статистична обробка результатів експериментів	27
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	28
3.1. Вплив донора сірководню NaHS на стан антиоксидантної і осмопротекторної систем проростків жита і пшениці	28
3.1.1. Морозостійкість проростків злаків.	29
3.1.2.Вміст МДА.	31
3.1.3.Активність антиоксидантних ферментів.	31
3.1.4.Вміст низькомолекулярних протекторів.	33
3.1.5.Вторинний метаболізм.	34
3.1.6.Можливі механізми стрес-протекторної дії екзогенного сірководню на проростки пшениці і жита за умов гіпотермії.	38
3.2.Вплив донора NO нітропрусиду натрію на стан антиоксидантної іосмопротекторної систем проростків	41
3.2.2.Морозостійкість проростків.	42
3.2.3.Вміст МДА	43
3.2.4.Активність антиоксидантних ферментів.	44
3.2.5.Вміст сумісних осмолітів	45
3.2.6.Вміст вторинних метаболітів.	46
Висновки до розділу 3	48
ВИСНОВКИ	50
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	52
ДОДАТКИ	57

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.

Останніми роками як одну з причин низькотемпературних пошкоджень рослин розглядають окиснювальний стрес. Його виникнення може бути пов'язане пов'язане з порушеннями метаболізму, зумовленим температурним фазовим переходом ліпідів біомембран. За дії нарослини 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. У багатьох дослідженнях виявлена її активація при загартуванні і помірному холодовому стресі . 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. 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. 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. Як перспективні праймувальні агенти нині розглядаються донори сигнальних молекул – газотрансмітерів – оксиду азоту (NO) і сірководню (H_2S), а також стресовий фітогормон саліцилова кислота. Однак їх вплив на морозостійкість рослин і

перебіг процесу холодового 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 і пшениці в їх адаптації до низьких температур та дослідження індукування цих систем дією донорів газотрансмітерів (NO і H_2S) і саліцилової кислоти.

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 холодового загартування.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше проведено комплексне порівняльне дослідження антиоксидантної системи озимих жита і пшениці у фізіологічно нормальних умовах і за холодового 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.

Особистий внесок здобувача полягає у виконанні досліджень, аналізі експериментального матеріалу, статистичній обробці даних, опрацюванні наукової літератури.

Апробація результатів досліджень. Основні результати кваліфікаційної роботи доповідались і обговорювались на засіданнях гуртка кафедри біології та

наукових студентських конференціях (додаток А.).

Структура та обсяг. Загальний обсяг дипломної роботи складає 62 сторінки комп'ютерного тексту. Містить всі необхідні розділи, налічує 1 додаток, включає 5 таблиць та 13 рисунків. Список використаної літератури нараховує 48 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. 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°С, в помірних зонах до -20-40°С. На північ від цих районів розташована зона вічної мерзлоти, де температура ще нижча. 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 [1].

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 прогнозуються аномально холодні зими з різкими перепадами температур і відсутністю снігового покриву [2].

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 кущіння, абсолютні мінімуми при цьому не перекривалися. Також кліматологи припускають небезпеку несподіваного глобального похолодання [3]. 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°С) [4], що може посилити ризик потрапляння рослин під заморозки у фазі цвітіння – на дуже уразливому етапі онтогенезу.

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. Отримано відомості про ключову роль у формуванні стійкості до гіпотермії підвищення ненасиченості жирних кислот у складі ліпідів мембран [5], накопичення кріопротекторів [6], синтезу різних стресових білків, активації антиоксидантної системи [7].

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, досягнуто прогресу в розумінні механізмів сприйняття рослинною клітиною холодового впливу і трансдукції низькотемпературного сигналу в генетичний апарат [8].

Дещо 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.

Зрештою, змінилися і уявлення про внесок окремих стрес-протекторних систем в конститутивну та індуковану стійкість рослин до гіпотермії. Зокрема, в останні роки значно розширилися відомості про роль таких класичних протекторів, як цукри [8] і пролін [9], 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). Зміни у мембранах, напевно, є найбільш ранньою реакцієюрослин 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. 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 спостерігалося [10]. 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. 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 (рис. 1.1).

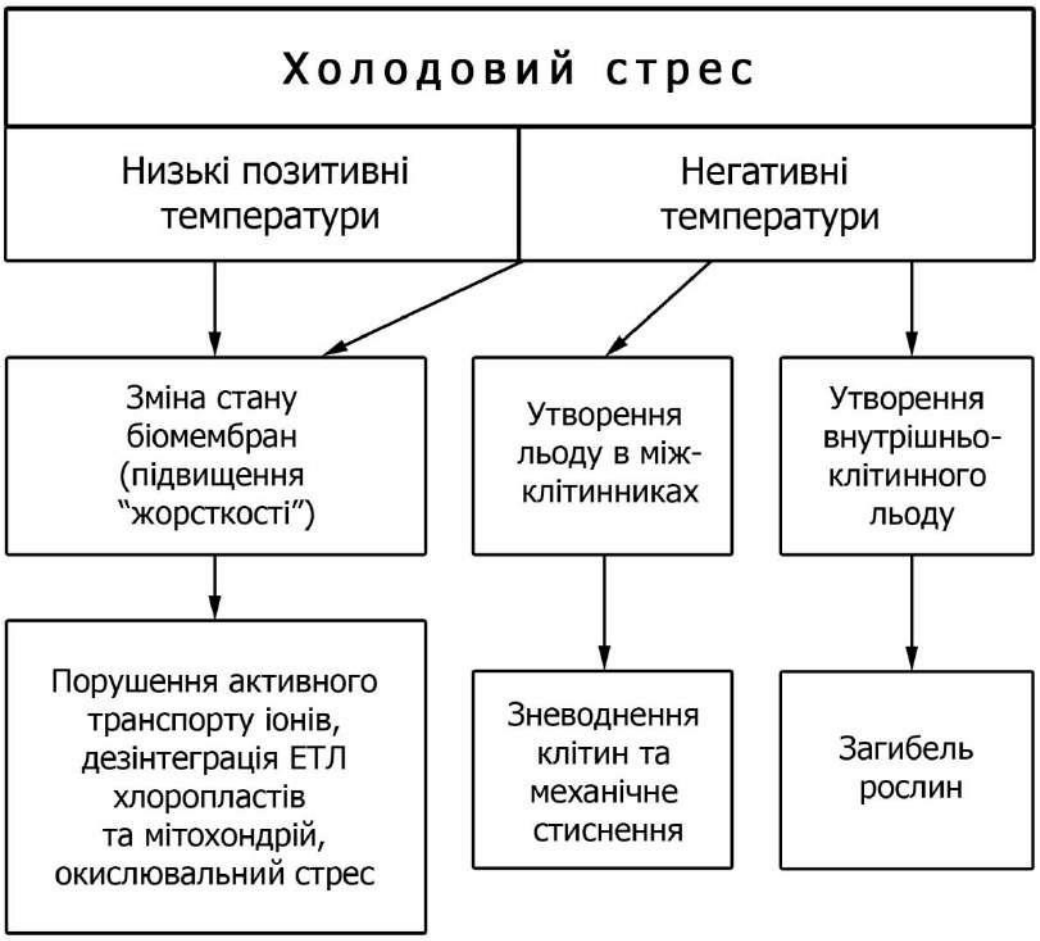


Рис 1.1. Основні причини пошкоджень рослин при холодовому стресі.

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 [11]. 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.

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 міжклітниках 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. Озимі злаки менш стійкі до зневоднення порівняно з деревними рослинами і при заморожуванні витримують тільки 50%-ну втрату води.

Зневоднення протоплазми є переважною причиною загибелі незагартованих рослин, загартовані найчастіше гинуть через механічні пошкодження.

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 [12, 13]

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 ($O_2^{\bullet -}$), гідроксильний радикал ($OH^{\bullet}$), пероксидні радикали ($RO_2^{\bullet -}$та ін.) і нейтральні молекули, такі як пероксид водню (H_2O_2), синглетний кисень ($^1O_2$) тощо [14]. 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 [15]. Більш сильна генерація АФК може викликати програмовану клітинну загибель. Нарешті, масштабне стохастичне утворення АФК може призвести до неконтрольованих клітиною деструктивних змін.

Ще в 80-90 рр. XX 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 [16]. 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 холодовому 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 $O_2^{\bullet-}$ [17]. 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.

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.

Вплив низьких пошкоджуючих температур на рослини викликає як стохастичне посилення генерації АФК, так і ферментативне, пов'язане з активацією НАДФН-оксидази [18, 19]. Цей ефект може бути складовою тпередачі холодового сигналу в генетичний апарат таіндукувати 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 [20].

1.2.3. Сприйняття і передача холодового сигналу. Питання про холодові 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. 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 флуктуаціїтемператури [21].

У даний час як кандидати на роль термосенсора розглядаються біомембрани, елементи цитоскелету, хроматин, фітохроми, нуклеїнові кислоти і певні білки. 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. 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 сигнальної мережею, у ціанобактерій є гістидинкіназа Hik33. Сенсорна гістидинкіназа мембранної локалізації Hik33 сприймає зниження температури (ймовірно, через фізичне стискання цитоплазматичної мембрани) і автофосфорилюється. Вона переносить фосфат на регуляторний елемент Pre26, здатний зв'язуватися з промоторними ділянками генів і активувати їх транскрипцію. У той же час припускають, що у ціанобактерій крім Hik33 існує додатковий низькотемпературний сенсор (а можливо декілька сенсорів), оскільки не всі гени, які індукуються холодом, перебувають під контролем Hik33.

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 (рис. 1.3).

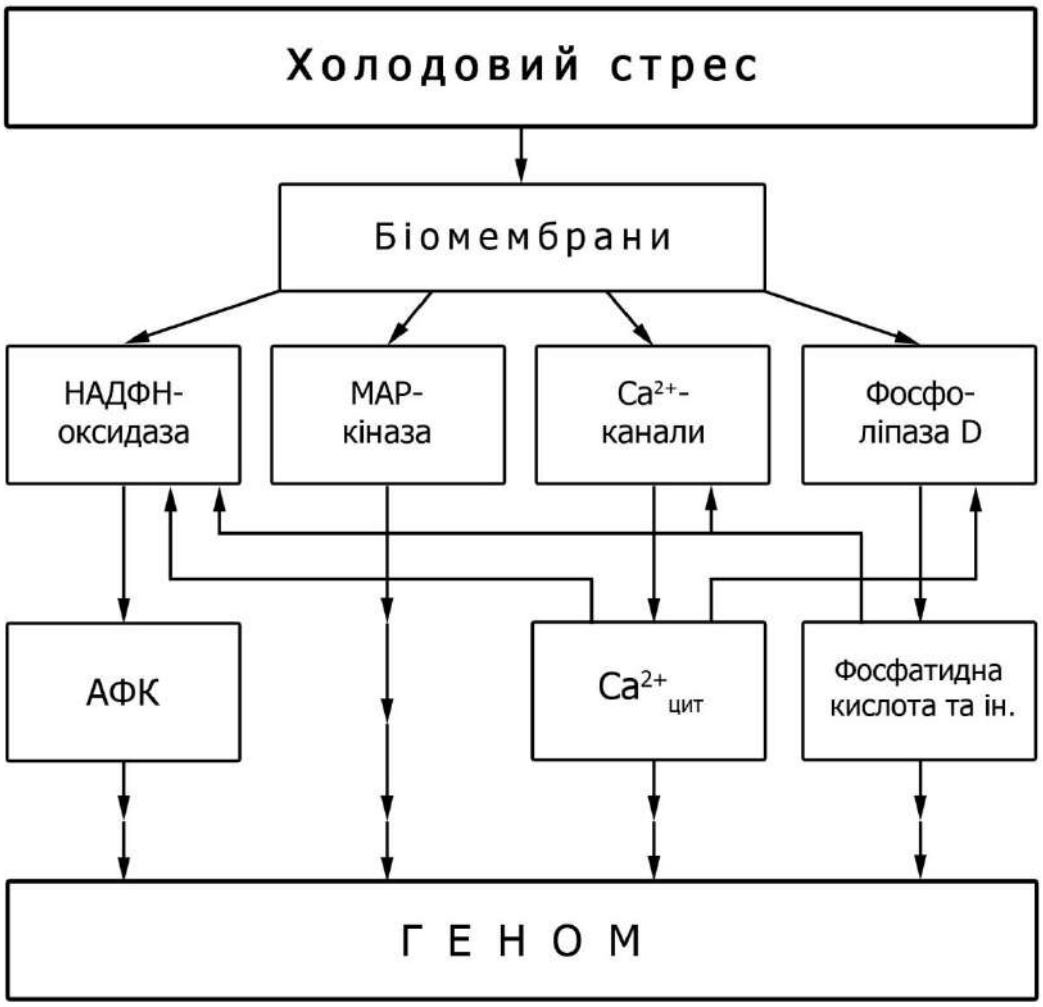


Рис 1.3. Можливі асоційовані з мембранами механізми сприйняття і передачі сигналу холодового стресу.

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 відкривання механочутуливих 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 [22, 23].

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 [24].

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 [25].

Крім зміни кальцієвого гомеостазу, однією з ранніх реакцій, зумовлених підвищенням жорсткості мембран при дії холоду, може бути активація чутливої до кальцію фосфоліпази D і підвищення вмісту фосфатидної кислоти, яка бере участь в ліпідному сигналінгу [26], 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 [27]. Підвищення активності НАДФН- оксидази і посилення утворення пероксиду водню зареєстровано як відповідь рослин кукурудзи на дію низьких позитивних температур. АФК, які генеруються на плазматичній мембрані, можуть впливати на стан кальцієвих каналів, гомеостаз оксиду азоту, а також на активність МАР-кіназ.

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 [28], які можуть виступати в ролі активаторів сигнальних шляхів.

Припускають, що у вищих рослин в сприйнятті холодового сигналу можуть брати участь і МАР-кінази. МАР-кіназний каскад є позитивним регулятором холодового сигналінгу у арабідопсису. Так, рослини з надекспресією MKK2 (МАР кіназа кінази 2), задіяної в активації MPK4 і MPK6, відрізняються конститувною холодстійкістю, зумовленою активністю комплексу CBF/DREB1s, що регулює експресію генів відповіді на дегідратацію [29].

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.

Трансдукція холодового 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 холодовим 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).*

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 прогнозуються 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.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛ, УМОВИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Коротка характеристика об’єктів досліджень

Дослідження проводили у навчально-науковій лабораторії «Біонеорганічної хімії, якості і безпеки об’єктів сільськогосподарського виробництва» кафедри біології УНУС у 2023 році.

В основній частині досліджень використовували проростки пшениці м'якої (*Triticum aestivum* L., сорт Досконала), жита посівного (*Secale cereale* L., сорт Пам'ять Худоєрка), 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/).

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.

Жито посівне сорту Пам'ять Худоєрка. Сорт внесений до Державного реєстру сортів рослин, придатних для поширення в Україні у 2011 рік для Лісостепу, Степу та Полісся. Різновид – вульгаре (*vulgare*). Сорт середньостиглий. Висота рослин 100-130 см. Стійкість до вилягання, осипання та проростання зерна в колосі висока. Морозо- та зимостійкість висока (8-9 балів). Посухостійкість висока (7-8 балів). Толерантний до основних хвороб. Зерно крупне, овальне, сіро-зеленого кольору**.** Маса 1000 зерен 32-38 г. Вміст сирого протеїну - 12,4%. Число падіння 280–330 с. Хлібопекарські властивості добрі. Потенційна врожайність 8,5 т/га. Сорт не вибагливий до попередників, рекомендована норма висіву 4 млн. схожих насінин на 1 га. Особливості насінництва: просторова ізоляція для насіннєвих посівів 2000 м.

2.2. Пророщування зернівок і умови холодового загартування та кріостресу рослин

Зернівки досліджуваних злаків після 30-хвилинного знезараження в 6% розчині пероксиду водню пророщували протягом 3 діб при температурі 20°С 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°С [30].

Після закінчення загартування температуру у камері знижували зі швидкістю 1 градус/год і витримували проростки при температурах діапазону від -5 до -9°С протягом 5 годин. Надалі температуру підвищували зі швидкістю 1 градус/год до 2°С, потім проростки відрощували протягом 3 діб при температурі 20°С 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°С. 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 в 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°С, після чого їх переносили в теплицю, зрізали листки так, щоб залишились листкові пластинки довжиною 0,5 см, і відрощували за температури 20-22°С 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 ($ЛТ_{50}$).

2.3. Обробка рослинного матеріалу екзогенними індукторами стійкості (донорами H_2S, 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 [31]. Його одержували шляхом витримування 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 [32].

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 етіольовані проростки поміщали на 6-7 діб в холодильну камеру (без освітлення) з температурою 2-4°С, 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°С.

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 сирої 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), [33].

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°С, 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 (pH 8,8) і 2 мл 50 мМ L-фенілаланіну, інкубували в термостаті протягом 1 год при 37°C. Одразу після закінчення інкубації визначали оптичну густину при 290 нм. Оптичним контролем слугувала ідентична реакційна суміш з додаванням ферментної витяжки, інактивованої кип'ятінням. Активність ФАЛ виражали в нмоль *транс*-коричної кислоти/(мг білка × год). Для розрахунків використовували коефіцієнт екстинкції *транс*-коричної кислоти, що дорівнює 10000 $M^{-1} \times см^{-1}$ (Zucker 1965).

2.4.3. Вміст білків. Загальний вміст розчинних білків в пробах визначали за Bradford, використовуючи як стандарт бичачий сироватковий альбумін [34].

2.4.4. Низькомолекулярні сполуки. *Сумарний вміст цукрів* в проростках визначали методом Моріса-Рое з використанням антронового реактиву [35]. 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. [36] 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. 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 етіольованих 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 [37].

2.4.5. Інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ). Інтенсивність ПОЛ в тканинах проростків визначали за кількістю продуктів, що реагують з 2-тіобарбітурової кислотою (в основному це малоновий діальдегід – МДА) [38]. 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:

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

де y (x) – нормований показник значення x, x_{min} і x_{max} – мінімальні та максимальні значення перетворюваних 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

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

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 H_2S 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 H_2S 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 [39].

Використання H_2S та NO як агентів для праймування може бути перспективним у зв'язку з наявністю їх недорогих донорів.

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

3.1. 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 [40].

Показано транзиторне підвищення ендогенного вмісту сірководню і посилення експресії генів ключових ферментів його синтезу – L-/D-цістеїндесульфгідраз – при дії температури 4°С у рослин винограду (Fu et al., 2013). Такий же ефект виявлено і у рослин арабідопсису з використанням мутантів, дефектних за генами цистеїндесульфгідраз, показана роль сірководню в активації холодочутливих генів *COR15* і *CBF3*. 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°С) [41].

В цілому, дія H_2S 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 H_2S на рослини різних таксономічних груп, взагалі відсутні. У зв'язку з цим було доцільним вивчити вплив H_2S на стійкість до гіпотермії і процес холодового загартування проростків пшениці і жита, які, як зазначалося, відрізняються між собою особливостями функціонування антиоксидантної та осмопротекторної систем.

3.1.1. 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 конститувна 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. 3.1). Найбільш ефективними, як і в випадку з проростками пшениці, були концентрації 0,1 і 0,5 мМ.

Таблиця 3.1.

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

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

Примітка. 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°С і 30-45% після проморожування при -9°С (табл. 3.1). В обох випадках попередня обробка NaHS сприяла збільшенню виживаності проростків.

Морозостійкість проростків жита під впливом загартування також істотно підвищувалася. Після проморожування при -5°С в усіх варіантах досліду близько 90% проростків залишалися живими. У зв'язку з цим значного впливу обробки NaHS зафіксувати не вдалося (табл. 3.1).

Після проморожування при –9 °С 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.

3.1.2. 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. 3.2). У той же час після холодового загартування проростків ці величини були нижчими порівняно з контролем.

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

Через 1 добу після проморожування загартованих проростків пшениці і жита при температурі –5°С візуальні їх пошкодження не виявлялися, що дозволило визначити в них вміст МДА. Цей показник зростав у обох видів, але більш істотно у пшениці (табл. 3.2). Обробка NaHS знижувала спричинюване кріостресом накопичення МДА в пагонах загартованих проростків пшениці і жита.

Таблиця 3.2.

Вміст МДА (нмоль/г сухої маси) в проростках пшениці і жита післязагартування і проморожування.

Варіант	Вміст МДА в проростках, нмоль/г сухої маси		
	Без загартування	Після загартування (7 діб при2–4°С)	Після проморожування загартованих проростків (4 год при –5°С
Пшениця			
Контроль	70,6 ± 2,2[a]	58,8 ± 2,0[a]	142,2 ± 3,2[b]
NaHS (0,1 мМ)	71,7 ± 1,9[a]	42,4 ± 2,2[a]	123,0 ± 2,8[a]
NaHS (0,5 мМ)	74,5 ± 2,6[a]	43,9 ± 1,9[a]	116,4 ± 4,2[a]
Жито			
Контроль	147,8 ± 2,6[a]	129,5 ± 3,6[a]	189,8 ± 7,6[a]
NaHS (0,1 мМ)	145,7± 3,3[a]	109,0 ± 2,8[b]	116,4 ± 4,2[a]
NaHS (0,5 мМ)	150 ± 2,5[a]	113,3 ± 3,3[a]	149,9 ± 5,6[a]

3.1.3. Активність антиоксидантних ферментів. При обробці NaHS активність СОД в проростках пшениці за контрольних температурних умов істотно не змінювалася (рис. 3.1). 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.

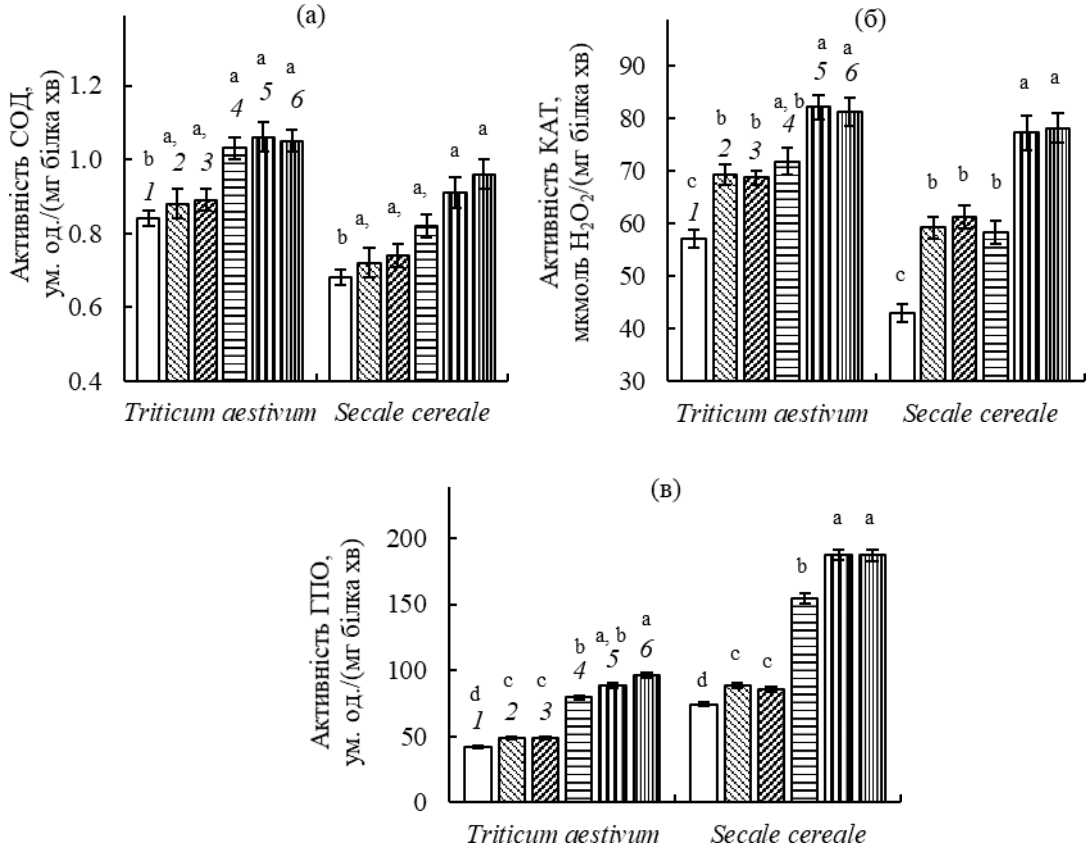


Рис. 3.1. Активність СОД (а), каталази (б) і пероксидази (в) в проростках пшениці і жита при дії донора сіроводню і холодового загартування. *1* – контроль; *2* – NaHS (0,1 мМ); *3* – NaHS (0,5 мМ); *4* – загартування; *5* – загартування + NaHS (0,1 мМ); *6* – загартування + NaHS (0,5 мМ).

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. 3.1). 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. 3.1). 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. 3.1). При поєднанні загартування з обробкою 0,1 або 0,5 мМ NaHS відзначалося 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. 3.1). 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. 3.1). 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.

3.1.4. Вміст низькомолекулярних протекторів. Обробка незагартованих проростків пшениці NaHS в концентраціях 0,1 і 0,5 мМ сприяла підвищенню в них вмісту цукрів (рис. 3.2). 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 гідросульфіду натрію в концентрації 0,5 мМ. Обробка проростків жита донором сірководню за фізіологічно нормальної температури сприяла підвищенню їх вмісту (рис. 3.2).

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

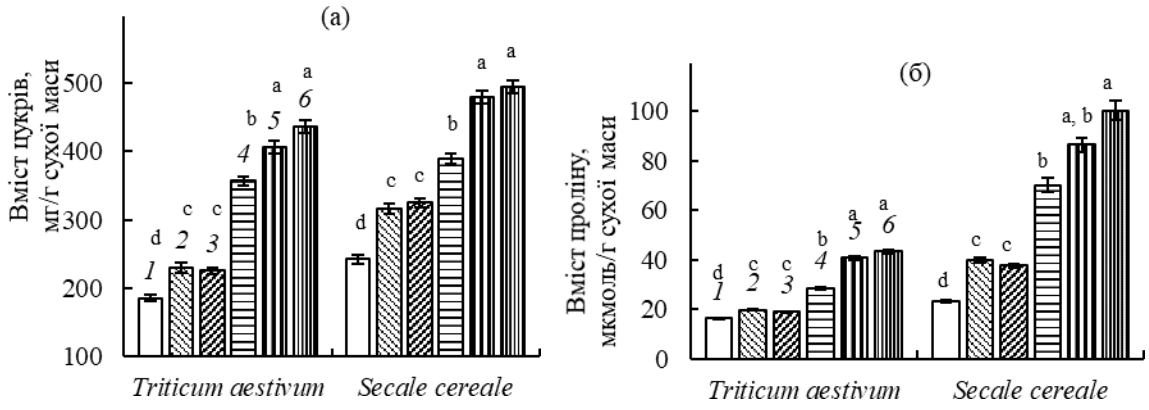


Рис 3.2. Вміст цукрів (а), проліну (б) в проростках пшениці і жита при дії донора сірководню і холодового загартування. *1* – контроль; *2* – NaHS (0,1 мМ); *3* – NaHS (0,5 мМ); *4* – загартування; *5* – загартування + NaHS (0,1 мМ); *6* – загартування + NaHS (0,5 мМ).

Під впливом обробки проростків пшениці NaHS за фізіологічно нормальної температури підвищувався вміст проліну (рис. 3.2). Ще більш істотно його кількість в пагонах збільшувалася після загартування при 2-4°С. Поєднання загартування з обробкою NaHS викликало підвищення вмісту проліну до 40-43 мкмоль/г сухої маси, що більш ніж в 2,5 рази перевищувало значення контролю.

Обробка проростків жита NaHS в контрольних умовах індукувала істотне збільшення кількості проліну у пагонах (рис. 3.2). 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.

3.1.5. Вторинний метаболізм. Як уже зазначалося, до важливих низькомолекулярних антиоксидантів належать флавоноїди. Показано підвищення їх загального вмісту та кількості антоціанів за низькотемпературної адаптації пшениці. Однак вплив H_2S 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). ФАЛ, що перетворює *L*- фенілаланін на *транс*-коричну кислоту, яка є попередником більшості вторинних метаболітів, вважається стартовим ферментом в складних процесах синтезу флавоноїдів. Водночас показано, що при обробці NaHS рослин брокколі за умов низькотемпературного зберіганнявідзначалося зниження активності ФАЛ і вмісту антоціанів, хоча при цьому відбувалося деяке збільшення загального вмісту флавоноїдів [42]. В роботі Li et al. (2015) [43], виконаній на проростках кукурудзи, не виявлено суттєвих змін активності ФАЛ під впливом обробки NaHS, яка індукувала розвиток теплостійкості. Таким чином, відомості про вплив H_2S 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. 3.3).

Таблиця 3.3.

Активність ФАЛ (% до величини в контролі без загартування) впроростках 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 рази (табл. 3.4).

Таблиця 3.4.

Активність ФАЛ (% від величини в контролі без загартування) впроростках жита за дії холодового 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. 3.4).

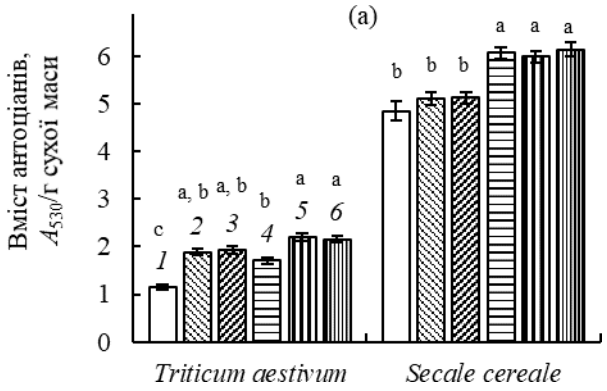


Рис 3.3. Вміст антоціанів в проростках злаків за обробки NaHS і загартування. *1* – контроль; *2* – NaHS (0,1 мМ); *3* – NaHS (0,5 мМ); *4* – загартування; *5* – загартування + NaHS (0,1 мМ); *6* – загартування + NaHS (0,5 мМ).

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. 3.3). 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.Ці флавоноїди також вирізняються високою антиоксидантною активністю. Зважаючи на це, в окремій серії дослідів оцінювали вплив загартуванняі 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. 3.4). В процесі холодового 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 рази.

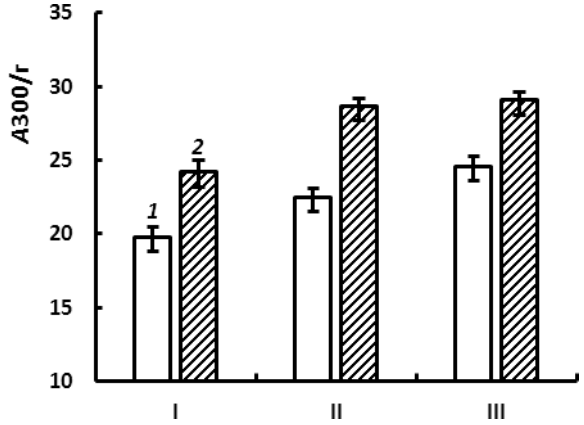


Рис 3.4. Вміст флавоноїдів, що поглинають в області УФ-В (A_{300}/г сухої речовини) в проростках жита за дії донора сірководню і холодового загартування. I – без загартування, II и III – через 4 и 7 діб загартування при 3°С; *1* – контроль, *2* – NaHS (0,1 мМ).

3.1.6. 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 холодового загартування сприяла додатковому приросту морозостійкості (табл. 3.1). 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. 3.2). Такі результати в цілому узгоджуються з даними, отриманими на рослинах бермудської трави [44].

Зменшення окиснювальних пошкоджень проростків пшениці і жита при проморожуванні в результаті їх попередньої обробки NaHS вказує на активацію H_2S 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. 3.1). 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. 3.1).

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 холодового 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. Можна припустити, що вплив H_2S на протекторні системи зелених і етіольованих об'єктів дещо відрізняється. У

випадку з етіольованими 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. 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.

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. 3.2). 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. Примітно, що в наших дослідах NaHS, підвищуючи вміст цукрів (рис. 3.2), не чинив позитивного впливу на активність СОД (рис. 3.1).

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. 3.2). 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 [45] та у проростків шпинату за умовпосухи [46] З іншого боку, у рослин пшениці, оброблених NaHS,

вміст проліну в умовах ґрунтової посухи підвищувався більш істотно в порівнянні з необробленими. 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.

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 відзначлося підвищення активності ФАЛ – ключового ферменту синтезу флавоноїдів (табл. 3.3, 3.4). 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. 3.4). 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. Показано підвищення під дією NaHS загального змісту флавоноїдів і кількості антоціанів при низькотемпературному зберіганні плодів глоду. При зберіганні коренів лотоса (*Nelumbo nucifer*a Gaertn.) за низької температури під впливом H_2S підвищувалися активність ФАЛ і вміст фенольних сполук.

Таким чином, екзогенний H_2S, ймовірно, індукує багато складових первинного і вторинного метаболізму, необхідних для розвитку стійкості рослин до гіпотермії.

3.2. 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°С) вихід електролітів з тканин і підвищення в клітинах вмісту продуктів ПОЛ. 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°С), що виявлялося в зменшенні проявів индукованого холодом окиснювального стресу і підвищенні активності антиоксидантних ферментів [47] . 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°С протягом 6 год [48].

У той же час практично недослідженим залишається значення NO для стійкості рослин до дії від'ємних температур. Зокрема, дотепер не вивчався плив 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.

3.2.2. 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. 3.5). 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. 3.5).

Таблиця 3.5.

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

Варіант	Виживаність проростків, %		
	Проморожування незагартованих проростків (5 год при –6°С)	Проморожування загартованих проростків (5 год при –6°С)	Проморожування загартованих проростків (5 год при –8°С)
Жито			
Контроль	23,4 ± 2,0	48,2 ± 3,0	40,6 ± 2,8
НПН (0,1 мМ)	24,7 ± 2,3	64,8 ± 2,4	55,2 ± 2,6
НПН (0,2 мМ)	27,2 ± 1,8	71,6 ± 2,6	60,6 ± 2,2
НПН (0,5 мМ)	25,9 ± 2,1	59,1 ± 3,1	51,6 ± 2,8
НПН (2,0 мМ)	23,2 ± 1,8	43,3 ± 3,3	46,2 ± 3,0
Пшениця			
Контроль	0	34,2 ± 2,8	19,6 ± 2,4
НПН (0,1 мМ)	0	58,8 ± 3,2	34,9 ± 2,7
НПН (0,2 мМ)	0	59,6 ± 3,4	35,8 ± 2,9
НПН (0,5 мМ)	0	41,3 ± 2,7	26,3 ± 2,8
НПН (2,0 мМ)	0	31,7 ± 2,9	24,2 ± 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. 3.5). Така закономірність виявлялася при проморожуванні проростків як при -6, так і при -8°С. 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 сввітлоіндукованого розкладання НПН не чинила вірогідного впливу на морозостійкість проростків (рис. 3.5), що дає підстави пов'язувати ефекти НПН з його дією як донора NO.

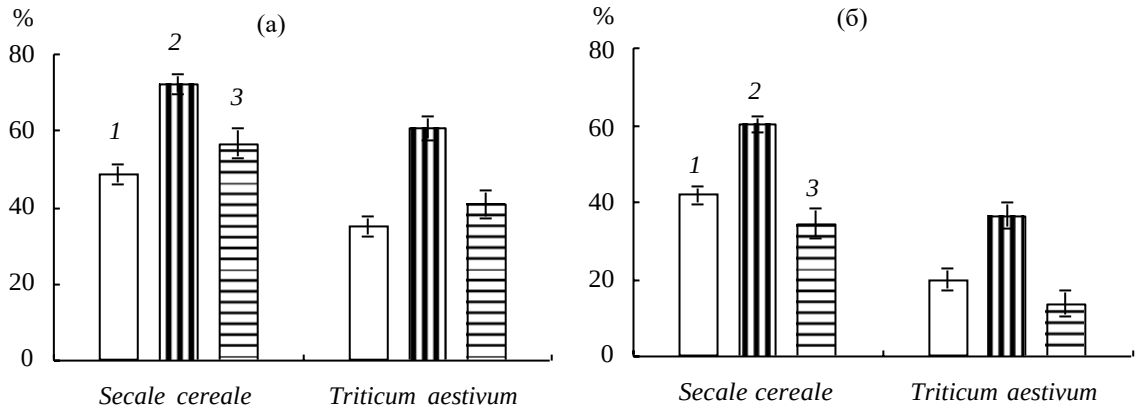


Рис. 3.5. Порівняння впливу свіжоприготованого і «виснаженого» НПН на виживаність (%) проростків жита і пшениці після 5-годинного проморожування при -6°С (а) і -8°С (б). *1* – контроль; *2* – НПН (0,2 мМ); 3 – «виснажений» НПН (0,2 мМ).

3.2.3. Вміст МДА. Під впливом праймування НПН в проростках жита і пшениці у фізіологчно 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. 3.6).

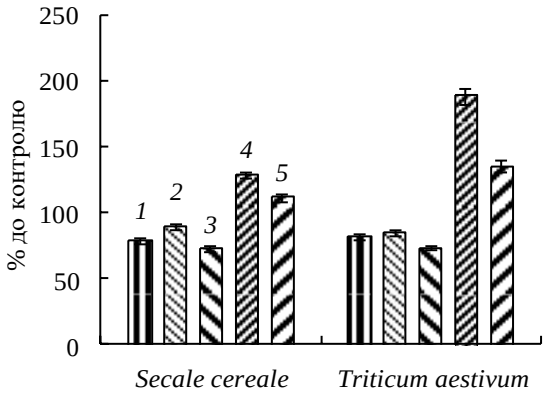


Рис. 3.6. Вміст МДА в проростках жита і пшениці за дії НПН, загартування (6 діб при 2–4°С) і проморожування (5 год при – 6°С). *1* – НПН (0,2 мМ); *2* – загартування; *3* – НПН (0,2 мМ) + загартування; *4* – загартування + проморожування; 5 – НПН (0,2 мМ) + загартування + проморожування.

3.2.4. 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 холодовогозагартування активність СОД підвищувалася в проростках обох видів. При цьому праймування насіння НПН сприяло збільшенню активності ферменту у проростках як жита, так і пшениці (рис. 3.7).

Активність каталази, як і СОД, в контролі була вищою у проростків пшениці (рис. 3.7). 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. 3.7).

Конститутивна активність пероксидази в проростках жита була вищою, ніж у проростках пшениці (рис. 3.7).

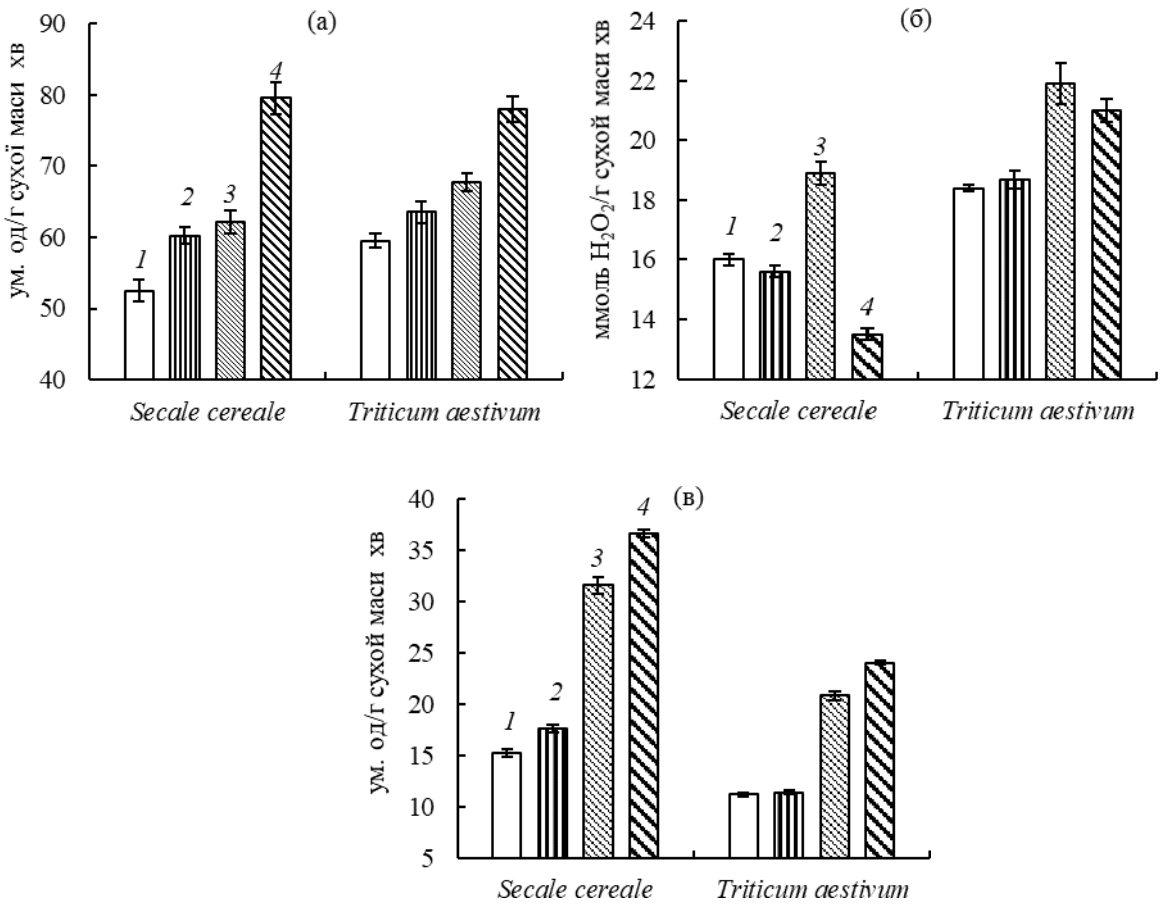


Рис. 3.7. Активність СОД (а), каталази (б) і пероксидази (в) в проростках жита і пшениці за дії НПН і холодового загартування (6 діб при 2–4 °С). *1* – НПН (0,2 мМ); *2* – загартовування; *3* – НПН (0,2 мМ) + загартування; *4* – загартування + проморожування; 5 – НПН (0,2 мМ) + загартування + проморожування

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.

3.2.5. 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. 3.8).

За відсутності загартування праймування НПН спричиняло вірогідне збільшення вмісту проліну тільки у проростків жита (рис. 3.8). 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. 3.8).

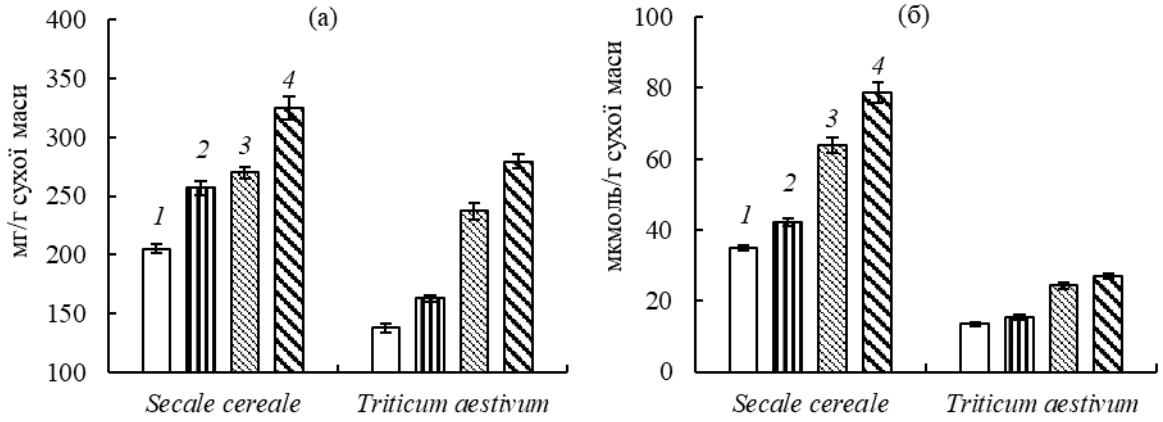


Рис. 3.8. Вміст цукрів (а), проліну (б), в проростках жита і пшениці за дії НПН і загартування (6 діб при 2–4 °С). *1* – контроль; *2* – НПН (0.2 мМ); *3* – загартування; *4* – НПН (0.2 мМ) + загартування.

3.2.6. 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. 3.9).

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. 3.9). 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.

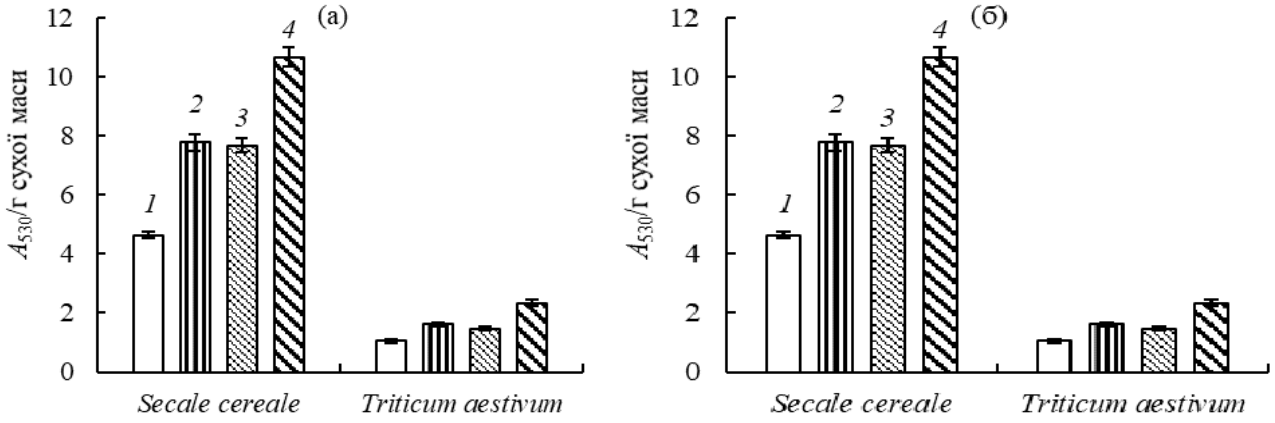


Рис. 3.9. Вміст антоціанів (а) і «безбарвних» флавоноїдів (б) в проростках жита і пшениці за дії НПН і холодового загартовування (6 діб при 2-4°С). *1* – контроль; *2* – НПН (0,2 мМ); *3* – загартування; *4* – НПН (0,2 мМ) + загартування.

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. 3.7-3.9). Про це свідчить менш виражений прояв окиснювальних пошкоджень після проморожування проростків жита і пшениці, вирощених з насіння, праймованого НПН (рис. 3.6).

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.

Висновки до розділу 3

Проведено порівняльне дослідження впливу донора сірководню гідросульфіду 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°С. Вплив NaHS в таких же концентраціях збільшував і виживаність загартованих при 2–4°С проростків обох видів після їх проморожування при –9°С. Під впливом NaHS в проростках обох видів за фізіологчно нормальної температури (20–22°С) і після холодового 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 холодового 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 адпатації рослин до холоду. Особливо слід відзначити здатність екзогенних газотрансмітерів і салцилової кислоти істотно посилювати накопичення в проростках злаків мультифункціональних протекторів, які є основними осмопротекторами – цукрів і проліну.

ВИСНОВКИ

У кваліфікаційній роботі показано важливе значення компонентів антиоксидантної та осмопротекторної систем у жита і пшениці 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 і пшениці. 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, 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.
4. 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.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. 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.
2. Іващенко, О. О., Іващенко, О. О. (2008). Шляхи адаптації землеробства в умовах змін клімату. *Збірн. наук. праць Нац. наукового центру «Інститут землеробства УААН». – К.: ВД «ЕКМО»,* 15-21.
3. 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.
4. 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.
5. Theocharis, A., Clement, C., Barka, E.A. (2012). Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. *Planta. 235,*1091-1105
6. 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.
7. Markovskaya, E. F., Shibaeva, T. G. (2017). Low temperature sensors in plants: Hypotheses and assumptions. *Biology Bulletin., 44(2):* 150-158.
8. 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.
9. Liang, X., Zhang, L., Natarajan, S.K., Becker D.F. (2013) Proline mechanisms of stress survival, *Antioxid. Redox Signal.,. 19,* 998-1011.
10. Lyons J.M. (1973). Chilling injury in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. 24,* 445 – 466.

*11.*Levitt, J. (1980). Responses of plants to environmental stresses. – *London etc: Acad. Press, 1.,* 497

12.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.

13.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.

14.Scandalios J.G. (2002) .The rise of ROS. *Trends Biochem. Sci. 27,* 483-486.

15.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 Speciesand 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.

16.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.

17.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.

18.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.

19.Awasthi, R., Bhandari, K., Nayyar, H. (2015) Temperature stress and redox homeostasisin agricultural crops. Front. *Environ. Sci.* V. 3:11.

20.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.

*21.*Ruelland, E., Zachowski, A. (2010). How plants sense temperature. *Envir. Exp. Bot.*, *V.69,* 225-232.

22.Orvar, B.L., Sangwan , V., Omann, F., Dhindsa, R.S. (2000). Early steps in cold sensingby plant cells: The role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant J. V. 23,* 785-794.

23.Sangwan, V., Foulds, I., Singh, J., & Dhindsa, R. S. (2001). Cold-Activation of Brassicanapus BN115 promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires Ca^{2+} influx. Plant *J. 27,* 1-12.

24.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.

25.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.

26.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.

27.Awasthi, R., Bhandari, K., Nayyar, H. (2015) Temperature stress and redox homeostasisin agricultural crops. Front. *Environ. Sci.* V. 3:11.

*28.*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.

29.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.

30.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.

31.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.

32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. Bates, L.S., Walden, R.P., Tear, G.D. (1973.). Rapid deter-mination of free proline for water stress studies. *Plant Soil. 39:* 205-210.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. Hancock, J.T., Whiteman, M. (2014). Hydrogen sulfide and cell signaling: Team player or referee? *Plant Physiol. Biochem., 78.,* 37-42.
41. 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.
42. 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.

43. 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.
44. 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.
45. 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.
46. 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.
47. 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.
48. Bibi, A., Majid, S. A., Ulfat, A., Khatoon, S., Munir, A., & Javed, G. (2017). Effect of nitric oxide seed priming on chilling inducedwater related physiological attributes in germinating wheat. *J Animal Plant Sci. 27:* 186-191.

ДОДАТКИ