

Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
Міністерство освіти і науки України  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова праця  
на правах рукопису

**КОВАЛЕНКО МАРІЯ СЕРГІЇВНА**

УДК 581.1: 633.11:58.032.3+631.8

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**СТРЕТОЛЕРАНТНІСТЬ ДО ПОСУХИ РОСЛИН РОДУ *TRITICUM* L.  
ЗА ПАРАМЕТРАМИ БІОХІМІЧНОГО ФЕНОТИПУВАННЯ**

03.00.12 – фізіологія рослин

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук  
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_ Коваленко М.С.

Науковий керівник: д.б.н., проф. Мусієнко Микола Миколайович

Київ – 2019

## АНОТАЦІЯ

Коваленко М.С. Стрестолерантність до посухи рослин роду *Triticum* L. за параметрами біохімічного фенотипування. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.12 – фізіологія рослин. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН, Київ, 2019.

Дисертаційна робота присвячена вивченню стрестолерантності до посухи пшениці м'якої (*Triticum aestivum* L.) та пшениці двозернянки (*T. dicoccum* Schrank ex Schübl.) за параметрами біохімічного фенотипування. Здійснено скринінг сортів пшениці м'якої та двозернянки на стрестолерантність до посухи в умовах модельної системи осмотичного стресу. Виявлено, що відібрані за результатами скринінгу генотипи пшениці, проявляють різну реакцію на вплив стресового чинника за характеристиками окисного гомеостазу, специфікою накопичення дегідринів, активністю хітиназ та  $\beta$ -1,3-глюканаз. Зокрема, у пшениці м'якої сорту Трипільська розвивалися окиснювальні процеси, пригнічення активності антиоксидантних ензимів, зниження вмісту дегідринів з молекулярною масою 57 та 30 кДа за умов поліетиленгліколь-індукованого осмотичного стресу, що свідчить про чутливість цього сорту до посухи. Пшениця м'яка сорту Фаворитка виявила вищу толерантність до короткотривалого осмотичного стресу, вірогідно, завдяки накопиченню осмотично активних сполук, зокрема, проліну та дегідринів з молекулярною масою 57 кДа. Разом з тим, у сорту Фаворитка спостерігали пригнічення активності каталази за умов пролонгованого осмотичного стресу, що може опосередковувати розвиток окиснювальних процесів внаслідок накопичення надлишку пероксиду водню.

Аналіз отриманих результатів свідчить про реалізацію генетично-закладеного потенціалу толерантності до посухи пшениці двозернянки сорту Голіковська, у якого розвитку окиснювальних процесів та інгібування систем антиоксидантного захисту за умов довготривало впливу стресора не виявлено.

Підтримка редокс-гомеостазу пшениці двозернянки за умов осмотичного стресу, ймовірно, забезпечується ефективною осморегуляцією та функціонуванням захисних сполук, що опосередковують стабільність білкових молекул та плазматичної мембрани. Про це свідчить накопичення проліну, індукція активності  $\beta$ -1,3-глюканаз з молекулярною масою 23 кДа та дегідринів з молекулярною масою 30 кДа.

Результати дослідження вказують на різні стратегії осмотичної регуляції досліджуваних видів за умов пролонгованого осмотичного стресу, що проявляється, зокрема, на рівні акумуляції проліну. Виявлено, що у підземній та надземній частинах проростків пшениці двозернянки пролін накопичується рівномірно, тоді як вміст проліну у проростках пшениці м'якої незбалансований, зі значним превалюванням у коренях. Характер розподілу проліну в проростках пшениці двозернянки може свідчити про більш досконалий механізм захисту рослин за умов посухи.

Показано індукцію ензиматичної активності хітиназ у сортів пшениці м'якої за умов осмотичного стресу, що свідчить про їхню участь у формуванні захисних реакцій рослин за посухи, ймовірно, шляхом регуляції еластичності та оводненості клітинної стінки завдяки потенційній здатності розщеплювати арабіногалактанові протеїни. Разом з тим, у пшениці двозернянки спостерігали підвищення активності лише у ізоформи з молекулярною масою 73 кДа, а активність хітиназ 41 та 34 кДа пригнічувалась. Така реакція може свідчити про різну спеціалізацію окремих ізоформ хітиназ у формуванні адаптивних реакцій рослин пшениці двозернянки.

Виявлено, що  $\beta$ -1,3-глюканази беруть участь у адаптаційних реакціях рослин за умов лімітованого водозабезпечення, про що свідчить двократне збільшення активності ензиму з молекулярною масою 23 кДа у пшениці двозернянки сорту Голіковська. Зміни активності  $\beta$ -1,3-глюканаз можуть свідчити про їх участь у регуляції накопичення калози та підтримці метаболізму глюкози в організмі рослин за умов стресу.

Результати дослідження показали, що за умов осмотичного стресу відбувається накопичення дегідринів з молекулярною масою 57 кДа у проростках пшениці м'якої сорту Фаворитка та дегідринів 30 кДа у пшениці двозернянки сорту Голіковська. У пшениці м'якої сорту Трипільська вміст зазначених протеїнів знижувався, що може свідчити про окиснення та/або нижчу швидкість синтезу цих протеїнів за умов стресу та, як результат, про вищу чутливість до осмотичного стресу порівняно з іншими досліджуваними сортами.

Дослідження фізіолого-біохімічних реакцій рослин на рівні захисних білків, зокрема, хітиназ,  $\beta$ -1,3-глюканаз та дегідринів, за умов осмотичного стресу, свідчить про різні адаптаційні стратегії *T. aestivum* та *T. dicoccum*. Разом з тим, порівняльний аналіз контрастних за посухостійкістю сортів пшениці м'якої дозволив також оцінити участь кожної з цих захисних систем у формуванні стрестолерантності рослин до посухи.

Проведено дослідження функціонального стану ензиматичної ланки антиоксидантного захисту, зокрема активностей супероксиддисмутази, каталази, аскорбатпероксидази та гваяколпероксидази у пшениці м'якої за пролонгованої посухи у фазу цвітіння. Продемонстровано перспективність визначення вмісту пероксисом за допомогою високочутливого флуоресцентного зонду N-BODIPY для здійснення комплексного аналізу ефективності регуляції редокс-системи рослин за умов стресу. Зазначений метод дозволив оцінити стрестолерантність до посухи 6 генотипів пшениці м'якої. Зокрема, виявлено, що сорт Поліська 90 не здатний подолати наслідки окиснювальних пошкоджень, викликаних посухою, оскільки незважаючи на залучення всіх досліджуваних ензиматичних систем до знешкодження активних форм кисню відбувалося накопичення тіобарбітурат (ТБК)-активних продуктів. Показано, що перекисне окиснення ліпідів може бути ймовірною причиною зниження вмісту пероксисом у листках сорту Поліська 90 та свідчить про чутливість до дії стресора. Підвищення вмісту перекису водню ( $H_2O_2$ ) та зниження активності каталази (КАТ) у прапорцевих листках сорту

Наталка за посухи, ймовірно, пов'язані з деградацією пероксисом, оскільки більшість внутрішньоклітинного вмісту каталази локалізована саме у цьому компартменті. Різкі зміни вмісту пероксисом у відповідь на дію стресора, ймовірно, є наслідком дестабілізації внутрішньоклітинних редокс-систем та можуть вказувати на чутливість цих сортів до посухи. Сорт Астарта за досліджуваними параметрами можна охарактеризувати як найбільш толерантний до пролонгованої дії посухи.

Показано, що визначення вмісту пероксисом, є перспективним для оцінки стану системи антиоксидантного захисту за умов посухи та може бути використаним для фенотипування та визначення ступеню толерантності рослин до дії різних несприятливих факторів довкілля, в т.ч. посухи.

Кореляційний аналіз між компонентами редокс-системи та фотосинтетичними параметрами дозволив виявити стійкий взаємозв'язок вмісту пероксисом,  $H_2O_2$  та ТБК-активних продуктів, що узгоджується з гіпотезою АФК-індукованої проліферації пероксисом. Виявлено позитивну кореляцію між вмістом пероксисом та вмістом ТБК-активних продуктів за дії посухи, що свідчить про розвиток окиснювальних процесів внутрішньоклітинних структур та, можливо, пероксисом безпосередньо. Важливу роль у знешкодженні  $H_2O_2$  у прапорцевих листках пшениці за умов пролонгованої дії посухи, ймовірно, відіграють пероксидази III класу, про що свідчить стійка негативна кореляція між активністю гваяколпероксидази та вмістом  $H_2O_2$ , вмістом ТБК-активних продуктів, а також вмістом пероксисом.

Продемонстровано перспективність застосування колоїдних розчинів наночастинок біогенних металів для корекції фенотипових проявів адаптивних реакцій рослин. Виявлено, що обробка розчином наночастинок металів сприяє індукції захисних реакцій рослин, зокрема антиоксидантної системи, за умов стресу. За результатами дослідження стану редокс-системи проростків пшениці м'якої та двозернянки в умовах модельованого осмотичного стресу показано, що передпосівна обробка наночастинками металів спричиняє протекторний ефект та сприяє відновленню активності КАТ в коренях сортів

Трипільська та Фаворитка до рівня контрольного варіанту, нівелюючи інгібіторний ефект дії стресора. Показано, що застосування колоїдних розчинів наночастинок металів сприяє підтриманню гомеостазу рослин в умовах агроценозу шляхом індукції ензиматичної ланки системи антиоксидантного захисту, підтримки стану фотосинтетичного апарату рослин та, в результаті, призводить до підвищення продуктивності та урожайності зернових культур.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., *Triticum dicoccum* Schrank ex Schübl., стрестолерантність, посуха, фенотипування, антиоксидантний захист, дегідрини,  $\beta$ -1,3-глюканаза, хітиназа, пероксисоми, наночастинки металів.

## SUMMARY

Kovalenko M.S. Drought stress tolerance of *Triticum* L. plants by the parameters of biochemical phenotyping. – Manuscript.

The thesis for candidate of biological sciences degree, specialty 03.00.12 – plant physiology. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2019.

The thesis is focused on the biochemical phenotyping of drought stress tolerance of common wheat (*Triticum aestivum* L.) and emmer (*T. dicoccum* Schrank ex Schübl.) plants. The screening of drought stress tolerance of common wheat and emmer cultivars using osmotic stress model system was performed. It was established, that selected wheat genotypes have a different reaction on stress varying in the oxidative homeostasis characteristics, the specifics of the dehydrin accumulation, the activity of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase enzymes. In particular, development of oxidative processes, the inhibition of antioxidant enzymes activities and the decrease of the dehydrin content with a molecular weight of 57 and 30 kDa were observed in common wheat of cv. Trypilska under the stress induced by polyethylene glycol, indicating on the drought sensitivity of given cultivar. Common wheat of cv. Favorytka had a higher tolerance to short-term osmotic stress, probably

due to the accumulation of osmotically active compounds, in particular, proline and dehydrin with a molecular weight of 57 kDa. At the same time, inhibition of the catalase activity in the cv. Favorytka was observed under the prolonged stress conditions which may contribute to the development of oxidative processes due to the accumulation of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ). The obtained results show the implementation of the genetic potential of drought tolerance of the emmer of cv. Holikovska, where development of oxidation processes and inhibition of antioxidant defense systems under prolonged stress conditions were not detected. Support for redox homeostasis in emmer plants under osmotic stress is likely to be provided by effective osmoregulation and the functioning of proteins that mediate the stability of protein molecules and plasma membranes. This is confirmed by the accumulation of proline, 30 kDa dehydrin and the induction of 23 kDa  $\beta$ -1,3-glucanase activity.

Studied cultivars had expressed different strategies of osmotic regulation under prolonged osmotic stress, which is confirmed, in particular, at the level of proline accumulation. It was established that proline was equally distributed in the leaves and roots of emmer seedlings, whereas the content of proline in the bread wheat seedlings is unbalanced, with a significant predominance in the roots. The nature of the proline distribution in emmer seedlings can indicate a more perfect mechanism of plants protection under drought conditions.

The induction of the chitinase enzymes activity in common wheat cultivars was shown under osmotic stress conditions, indicating the involvement of these enzymes in the plant protective responses under drought, probably by regulating the elasticity and water content of the cell wall due to the potential for arabinogalactan proteins cleavage. At the same time, the increase of the activity of the chitinase enzyme only with molecular weight 73 kDa was observed in emmer plants, while the activity of chitinases 41 and 34 kDa was suppressed. This reaction may indicate a different specialization of the individual chitinase isoforms in the adaptive reaction of emmer plants.

It was established, that  $\beta$ -1,3-glucanases are involved in the adaptation reactions of plants under limited water supply conditions, as evidenced by a two-

fold increase in the activity of the enzyme with a molecular weight of 23 kDa in emmer of cv. Holikovska. Changes in the activity of  $\beta$ -1,3-glucanases may indicate their involvement in the regulation of callose accumulation and maintenance of glucose metabolism in plants under drought stress.

The obtained results showed accumulation of 57 kDa dehydrins in the seedlings of common wheat of cv. Favorytka and 30 kDa dehydrins in the emmer of cv. Holikovska under osmotic stress. In common wheat plants of cv. Trypilska, the dehydrins content had decreased, which may indicate oxidation and/or a lower rate of synthesis of these proteins under stress and, as a result, a higher susceptibility to osmotic stress compared to other studied varieties.

Studies of physiological and biochemical reactions of plants at the protein level, in particular, chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanases and dehydrins, under osmotic stress conditions, indicate on various adaptation strategies of *T. aestivum* and *T. dicoccum* plants. At the same time, comparative analysis of contrasting to drought tolerance common wheat cultivars allowed also to assess the participation of each of these protective systems in the drought stress tolerance of plants.

The functional state of antioxidant defense enzymes, in particular, superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase activity in common wheat, was studied under the prolonged drought stress on the flowering stage. The prospect of determining the peroxisome abundance using a high-sensitivity fluorescence probe N-BODIPY for a comprehensive analysis of the efficiency of redox system regulation of plants under drought stress has been demonstrated. The indicated method allowed measuring the drought tolerance of 6 genotypes of common wheat. It was established, that Poliska 90 cultivar is unable to overcome the effects of oxidative damages caused by drought since, despite the involvement of all investigated enzymatic systems to neutralize the reactive oxygen species, the accumulation of thiobarbituric acid (TBA)-reactive substances took place. It was shown that lipid peroxidation may be a potential cause of a peroxisome abundance reduction in the leaves of the Poliska 90 cultivar and indicates its sensitivity to drought stress. Increased content of  $H_2O_2$  and decreasing the activity of

catalase in Nataka flag leaves under drought, probably due to degradation of peroxisomes, since most of the intracellular catalase content is localized precisely in this compartment. Sharp changes in peroxisome abundance in stress response are probably due to the destabilization of intracellular redox systems and may indicate the sensitivity of these varieties to drought. The Astarta cultivar can be described as the most tolerant to prolonged drought by the parameters studied.

It has been shown that determination of peroxisome abundance is promising for assessing the state of the antioxidant protection system under drought conditions and can be used for phenotyping and determining the plant tolerance to the various adverse environmental factors, including drought.

Correlation analysis between components of the redox system and photosynthetic parameters allowed to reveal a stable relationship between the peroxisome abundance,  $H_2O_2$  content and TBA-reactive substances, consistent with the hypothesis of the ROS-induced proliferation of peroxisomes. A positive correlation was found between contents of  $H_2O_2$  and the TBA-reactive substances under drought, indicating the development of the oxidative processes of intracellular structures and, probably, peroxisomes directly. An important role in the scavenging of  $H_2O_2$  in common wheat flag leaves under prolonged drought conditions is likely to be played by class III peroxidase, as evidenced by the stable negative correlation between guaiacol peroxidase activity and content of  $H_2O_2$ , TBA-reactive substances, and peroxisomes.

The prospect of application of colloidal solutions of biogenic nanoparticles for the correction of phenotypic manifestations of adaptive reactions of plants is demonstrated. It was found that plant treatment with a solution of metal nanoparticles contributes to the induction of plant protective reactions, in particular, the antioxidant system, under stress conditions. According to the study of the redox system state of common wheat seedlings and emmer under modeling osmotic stress conditions, it has been shown that seeds pretreatment treatment with nanoparticles of metals causes a tread effect and promotes the restoration of the catalase activity in the roots of Trypilska and Favorytka cultivars to the control variant level, leveling

the inhibitory effect of the stressor. It was shown that the application of colloidal solutions of nanoparticles of metals contributes to maintaining homeostasis of plants in agrocenosis conditions by inducing an antioxidant system at the enzymatic level, maintaining the state of the photosynthetic apparatus of plants, and, as a result, increases the productivity of grain crops.

Keywords: *Triticum aestivum* L., *Triticum dicoccum* Schrank ex Schübl., stress tolerance, drought, antioxidant defense, dehydrins,  $\beta$ -1,3-glucanase, chitinase, peroxisome abundance, phenotyping, metal nanoparticles.

## ПЕРЕЛІК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Статті у наукових фахових виданнях України:

1. Мусієнко ММ, Стороженко ВО, Бацманова ЛМ, Серга ОІ, Грудіна НС, Макаренко ВІ, **Коваленко МС**, Артюшенко АП. Скринінг сортів пшениці озимої для пошуку генотипів із підвищеним адаптаційним потенціалом. Вісник аграрної науки. 2016; 11: 38-42..

2. Рязанова МЄ, Бацманова ЛМ, **Коваленко МС**, Михальська ЛМ, Швартау ВВ. Вплив іонів міді та рН середовища на антиоксидантну активність у тканинах коренів проростків озимої пшениці. Физиология растений и генетика. 2015; 47(6): 497-504.

### Статті у наукових фахових виданнях України,

#### які входять до міжнародних наукометричних баз даних:

1. Конотоп ЄО, **Коваленко МС**, Улинець ВЗ, Мелешко АО, Бацманова ЛМ, Таран НЮ. Дослідження фітотоксичності колоїдних розчинів металовмісних наночастинок. Цитология и генетика. 2014; 48(2): 37-42.

### Статті в іноземних виданнях:

1. Konotop Y, **Kovalenko M**, Batsmanova L, Taran N, Matušíková I. Proline application triggers temporal redox imbalance, but alleviates cadmium stress in wheat seedlings. Pakistan Journal of Botany. 2017; 49(6): 2145-2151.

2. Taran N, Storozhenko V, Svetlova N, Batsmanova L, Shvartau V., **Kovalenko M**. Effect of Zinc and Copper Nanoparticles on Drought Resistance of Wheat Seedlings. Nanoscale Research Letters. 2017; 12(1): 60.

3. Taran N, Batsmanova L, **Kovalenko M**, Okanenko A. Impact of Metal Nanoform Colloidal Solution on the Adaptive Potential of Plants. Nanoscale research letters. 2016; 11(1): 89.

4. Taran N, Batsmanova L, Kosyk O, Smirnov O, **Kovalenko M**, Honchar L, Okanenko A. Colloidal Nanomolybdenum Influence upon the Antioxidative

Reaction of Chickpea Plants (*Cicer arietinum* L.). *Nanoscale research letters*. 2016; 11(1): 476.

### Тези наукових доповідей:

1. **Kovalenko M**, Gregorová Z, Matušíková I. The chitinase and 1,3- $\beta$ -glucanase activity of wheat (*Triticum aestivum* L.) and emmer (*Triticum dicoccum* Schrank ex Schübl.) under osmotic stress. Proceedings of the 11th International Conference "Plant Functioning Under Environmental Stress"; 2018 September 12-15; Cracow, Poland, p. 28.

2. **Kovalenko MS**, Konotop YeO, Karpets L-AM, Smirnov OYe, Batsmanova LM, Taran NYu. Phytotoxicity of colloidal solutions of stabilized and non-stabilized nanoparticles of essential metals and their oxides. Proceedings of the International research and practice conference: Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2018); 2018 August 27-30; Kyiv, Ukraine, p. 89.

3. Stasik O, **Kovalenko M**, Sokolovska-Sergiienko O, Kiriziy D, Hickey K, Nazarov T, Taran N, Batsmanova L, Sytnyk S, Cuber K, Morgun B, Panchenko O, Smertenko A. Impact of drought on photosynthetic activity, ROS homeostasis and yield in winter wheat varieties. *Plant Biology* 2018; 2018 July 14-18; Montreal, Québec.

4. Зінченко АВ, **Коваленко МС**, Смірнов ОЄ. Вплив посухи на фотохімічні показники функціонування фотосинтетичного апарату різних сортів *Triticum aestivum* L. Матеріали XII Міжнародної конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери»; 2017 листопад 29 – грудень 1; м. Харків, Україна, с. 103-104.

5. **Kovalenko M**, Konotop Ye, Smirnov O, Koval Yu, Musienko M. Growth and water consumption parameters of wheat seedlings under osmotic stress. Біологічні студії (за матеріалами IV Міжнародної конференції "Онтогенез рослин у природному та трансформованому середовищі. Фізіолого-біохімічні та екологічні аспекти" (4-6 жовтня 2017р., м. Львів)); 2017:11(3-4):65.

6. Карпець Л-А, Зінченко А, **Коваленко М**, Смірнов О, Белава В. Зміни вмісту фотосинтетичних пігментів проростків пшениці за дії посухи. Матеріали Міжнародної конференції молодих учених «Актуальні проблеми ботаніки та екології»; 2017 вересень 5-10; Луцьк, Україна, с. 72.

7. **Kovalenko MS**, Konotop YeO, Sviatlova NB, Storozhenko VO, Koval YuA. Effect of metal nanoparticles on the antioxidant activity of *Triticum* sp. plants under drought conditions. Proceedings of the International research and practice conference: Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2017); 2017 August 23-26; Chernivtsi, Ukraine, p. 99.

8. Коваль Ю, **Коваленко М**, Світлова Н, Таран Н. Вплив поліетиленгліколь-індукованої посухи на ростові процеси пшениці на ранніх етапах онтогенезу. Збірник тез XIII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології»; 2017 квітня 25-27; м. Львів, Україна, с. 283-4.

9. Taran N, Batsmanova L, Kosyk O, Smirnov O, **Kovalenko M**, Gonchar L, Okanenko A. Colloidal nanomolybdenum influence upon the antioxidative reaction of chickpeas plants (*Cicer arietinum* L.). Proceedings of the International research and practice conference: Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2016); 2016 August 24-27; Lviv, Ukraine, p. 507.

10. Taran NYu, Batsmanova LM, **Kovalenko MS**, Konotop YeO, Gonchar LM. Nanomolybdenum impact on chickpeas plant adaptation reaction development. Proceedings of the Ukrainian-German Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology; 2015 September 21-25; Kyiv, Ukraine, p. 247.

11. Taran NY, Batsmanova LM, **Kovalenko MS**, Konotop EO, Kosyk OI, Nowicki NV, Kalensky SM. Impact of nanoform biogenic metal colloidal solution on the adaptive potential of plants. Proceedings of the International research and practice conference: Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2015); 2015 August 26-29; Lviv, Ukraine, p. 440.

12. Taran NYu, Batsmanova LM, Konotop YeO, **Kovalenko MS**, Ulynets VZ, Volkogon MV, Meleshko AO. Physiological responses of plants to non-ionic colloidal solution of metal nanoparticles. Proceedings of the International research and practice conference: Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2014); 2014 August 22-23; Yaremche-Lviv, Ukraine, p. 577.

## ЗМІСТ

|   |    |
|---|----|
| ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....  | 17 |
| ВСТУП.....  | 18 |
| РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....   | 24 |
| 1.1. Окисно-відновний гомеостаз клітин рослин за умов посухи.....   | 26 |
| 1.2. Накопичення осмолітів як захисна реакція на дію посухи.....  | 31 |
| 1.3. Роль пероксисом у захисті рослин за умов посухи.....   | 32 |
| 1.4. Роль стрес-індукованих захисних білків у формуванні посухостійкості рослин.....                                      | 35 |
| 1.5. Перспективи застосування біохімічного фенотипування у визначенні стійкості рослин до посухи.....                     | 43 |
| 1.6. Наночастинки металів у регуляції адаптивних реакцій рослин.....  | 45 |
| РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....   | 50 |
| 2.1. Матеріал досліджень.....   | 50 |
| 2.2. Підготовка рослинного матеріалу в умовах лабораторного експерименту та моделювання осмотичного стресу.....           | 50 |
| 2.3. Визначення біохімічних показників.....   | 53 |
| 2.4. Умови проведення вегетаційного дослідження.....  | 59 |
| 2.5. Умови проведення польових досліджень.....  | 60 |
| 2.6. Обробка розчинами наночастинок металів.....  | 61 |
| 2.7. Статистичний аналіз отриманих результатів.....   | 63 |
| РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....  | 64 |
| РОЗДІЛ 3. Скринінг сортів на стрестолерантність до посухи в умовах модельної системи осмотичного стресу.....              | 64 |
| РОЗДІЛ 4. Стан антиоксидантної системи на ранніх етапах розвитку рослин за умов ПЕГ-модельованого осмотичного стресу..... | 71 |
| 4.1. Вплив короткотривалого осмотичного стресу на фізіологічний стан рослин.....  | 71 |

|   |     |
|---|-----|
| 4.2. Вплив довготривалого ПЕГ-модельованого осмотичного стресу на параметри окиснювального гомеостазу проростків пшениці м'якої та пшениці двозернянки..... | 74  |
| РОЗДІЛ 5. Роль захисних протеїнів (дегідринів, хітиназ, $\beta$ -1,3-глюканаз) у формуванні посухотолерантності різних видів роду <i>Triticum</i> L.....    | 82  |
| 5.1. Вплив осмотичного стресу на активність хітиназ.....  | 82  |
| 5.2. Вплив осмотичного стресу на активність $\beta$ -1,3-глюканаз.....  | 85  |
| 5.3. Роль дегідринів за умов осмотичного стресу.....  | 87  |
| РОЗДІЛ 6. Оцінка стрестолерантності до посухи сортів пшениці за параметрами окиснювального гомеостазу та вмістом пероксисом.....                            | 92  |
| РОЗДІЛ 7. Регуляція адаптивних реакцій рослин нанорозмірними елементами мінерального живлення.....  | 102 |
| АНАЛІЗ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ ТА ЇХ УЗАГАЛЬНЕННЯ.....  | 117 |
| ВИСНОВКИ.....   | 124 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....   | 126 |
| ДОДАТОК 1. Перелік опублікованих праць за темою дисертації та відомості про апробацію результатів дисертації.....   | 161 |

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

|              |   |  |
|--------------|---|--|
| АБК          | – | абсцизова кислота  |
| АПО          | – | аскорбатпероксидаза  |
| АФК          | – | активні форми кисню  |
| ГПО          | – | гваяколпероксидаза   |
| ДСН          | – | додецилсульфат натрію  |
| ЕДТА         | – | етилендіамінтетраоцтова кислота                                |
| КАТ          | – | каталаза   |
| МДА          | – | малоновий діальдегід   |
| НСТ          | – | нітротетразолій синій  |
| ПЕГ          | – | поліетиленгліколь  |
| ПО           | – | пероксидаза  |
| СОД          | – | супероксиддисмутаза  |
| ТБК          | – | тіобарбітурова кислота   |
| HSPs         | – | протеїни теплового шоку  |
| LEA-протеїни | – | протеїни пізнього ембріогенезу                                 |
| pR-білки     | – | білки, пов'язані з патогенезом (pathogenesis related proteins) |

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Серед викликів, що постають перед людством в контексті глобальних змін клімату та демографічних проблем, дослідження сформованих в процесі еволюції механізмів адаптації рослин до зростання за умов посухи є надзвичайно актуальними [1, 2]. Увага провідних фітофізіологів зосереджена на проблемі прогнозування та підвищення стрестолерантності рослин до посухи впродовж багатьох років [3–7], оскільки цей потужний стресовий фактор спричиняє серйозні порушення метаболізму рослин, що призводить до зниження вегетативної та генеративної продуктивності [8–10]. Адаптація рослин в умовах посухи являє собою складну та скоординовану відповідь за участі сотень генів [11–13], в той час як продуктивність та врожай визначаються ефектами взаємодії генотип-середовище та реалізуються в межах фенотипової пластичності [14, 15]. Для всебічного дослідження комплексу ознак, пов'язаних з процесами росту та розвитку рослин, а також формуванням резистентності, екологічної пластичності та продуктивності, широкого розповсюдження набуває фенотипування, оскільки прогнозування прояву фенотипових змін є можливим лише за умов дослідження фізіологічних реакцій, які є зв'язуючою ланкою між генотипом та фенотипом [16–18]. Підхід, що лежить в основі біохімічного фенотипування, передбачає здійснення інтеграційного дослідження морфологічних або анатомічних перетворень, фізіологічних механізмів на рівні біохімічних процесів і новоутворення низькомолекулярних стрес-протекторних сполук, а також захисних макромолекул [19, 20]. Перспективним напрямком у дослідженні стрес-індукованих змін редокс гомеостазу є визначення проліферації пероксисом, що відображає ефективність функціонування системи антиоксидантного захисту та дозволяє здійснити оцінку ступеню окиснювального стресу [21].

Сучасні технології раціонального природокористування схиляються до практичного застосування новітніх досягнень наноіндустрії та використання нанорозмірних біогенних металів для мобілізації і реалізації біологічного потенціалу рослин шляхом індукції ендогенних захисних механізмів, підвищення стрестолерантності рослин та продуктивності [21, 22].

З огляду на нестачу наявних даних літератури із дослідження засобів реалізації адаптивного потенціалу сортів пшениці актуальним є проведення фенотипування за біохімічними параметрами з подальшим скринінгом стрестолерантності сортів пшениці, а також з'ясування регуляторної дії наночастинок металів за умов посухи.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дисертаційна робота виконана в рамках бюджетних тем «Збереження біорізноманіття та комплексне дослідження стратегій адаптації фіто-, зоо- та віробіоти України з використанням біоінформаційних технологій» (№ д/р 0111U004649, 2011-2015 рр.), «З'ясування закономірностей формування та інтеграції механізмів стрестолерантності рослин для прогнозування та управління їх функціонуванням за екстремальних умов» (№ д/р 0116U004779, 2015-2018 рр.), гранту Президента України за конкурсним проектом №Ф75/170-2018 Державного фонду фундаментальних досліджень «Адаптивний потенціал зернових та бобових культур та його корекція нанорозмірними елементами мінерального живлення», спільного українсько-американського науково-дослідного проекту за підтримки Фонду цивільних досліджень та розвитку США (CRDF Global) «Розробка високопродуктивних технологій оцінки АФК-стресу у рослин на основі фенотайпінгу пероксисом» (№ OISE-16-62764-0).

Тема дисертації затверджена Вченою радою ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (протокол № 10 від 11 квітня 2016 р.)

**Мета і завдання дослідження.** Мета роботи – з'ясування фізіолого-біохімічних особливостей стрестолерантності до посухи злакових культур

роду *Triticum* L. за характеристиками окисного гомеостазу, вмісту пероксисом та захисних протеїнів.

Відповідно до мети було поставлено наступні завдання:

- розробити модельну систему осмотичного стресу та провести скринінг сортів пшениці на стрестолерантність до посухи;
- дослідити особливості реакції антиоксидантної системи на ранніх етапах розвитку рослин за умов поліетиленгліколь (ПЕГ)-модельованого осмотичного стресу видів *Triticum*, на прикладі пшениці м'якої (*T. aestivum* L.) та пшениці двозернянки (*T. dicoccum* Schrank ex Schübl);
- з'ясувати роль захисних білків (дегідринів, хітиназ,  $\beta$ -1,3-глюканаз) у формуванні посухотолерантності різних видів *Triticum*;
- оцінити стрестолерантність сучасних сортів пшениці на основі аналізу параметрів окиснювального гомеостазу, вмісту пероксисом за умов посухи;
- з'ясувати особливості регуляції посухостійкості рослин нанорозмірними елементами мінерального живлення в умовах агроценозу.

**Об'єкт дослідження:** фізіолого-біохімічні процеси формування стрестолерантності рослин до посухи.

**Предмет дослідження:** системи антиоксидантного захисту, пероксисоми як компартменти АФК, захисні білки (дегідрини, хітинази,  $\beta$ -1,3-глюканази) в оцінці толерантності рослин до посухи.

**Методи дослідження:** у дослідженнях використані лабораторні методи скринінгу сортів за морфометричними параметрами ростових процесів, як інтегральних показників фізіологічного стану рослин; біохімічного фенотипування з використанням спектрофотометричного вимірювання активності ензимів антиоксидантної системи, вмісту прооксидантів, продуктів вільнорадикального окиснення ліпідів, вмісту водорозчинного протеїну; спектрофлуориметричного визначення вмісту пероксисом з використанням флуоресцентного зонду N-BODIPY, електрофоретичного аналізу протеїнів в поліакриламідному гелі (визначення активності хітиназ та  $\beta$ -1,3-глюканаз) та

вестерн-блот аналіз (визначення вмісту дегідринів), методи вегетаційного та польового дослідження, а також методи математичної статистики.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Встановлено особливості формування стрестолерантності до посухи за параметрами біохімічного фенотипування (станом антиоксидантної системи, специфікою накопичення стрес-індукованих протеїнів дегідринів, активністю хітиназ та  $\beta$ -1,3-глюканаз) генотипів *T. aestivum* та *T. dicoccum* на ранніх етапах розвитку та за вмістом пероксисом у фазу формування генеративних органів. На основі проведеного комплексного фізіолого-біохімічного аналізу з'ясовано тенденції формування осмотичної толерантності досліджуваних видів. Досліджено вплив наночастинок металів на редокс-гомеостаз рослин та можливість їх використання як адаптогенів до дії посухи. Отримані експериментальні дані поглиблюють теоретичні уявлення про стратегію формування стрестолерантності рослин на рівні фенотипових проявів адаптивних реакцій генотипів та способів їх корекції з використанням новітніх нанотехнологій.

**Практичне значення одержаних результатів.** Результати проведених досліджень вказують на різновекторність формування стрестолерантності у сортів *T. aestivum* та *T. dicoccum* за дії посухи і можуть слугувати основою оптимізації технології вирощування зернових культур шляхом активації ендогенних механізмів неспецифічної стійкості для екологізації рослинництва за умов глобальних змін клімату. Запропонована модельна система осмотичного стресу є перспективною для ранжування сортів/видів за стрестолерантністю до дії широкого спектру абіотичних факторів, що є причиною осмотичного стресу рослин (посуха, засолення, дія важких металів, тощо). Отримані результати свідчать, що визначення стрестолерантності рослин за параметрами біохімічного фенотипування дає можливість для розуміння складних взаємозв'язків на різних рівнях організації рослинного організму. Результати досліджень доповнюють фізіологічну основу використання наночастинок металів для підвищення продуктивності зернових та бобових культур за несприятливих умов довкілля.

**Особистий внесок здобувача.** Інформаційний пошук, проведення експерименту та аналіз результатів дослідження виконані дисертантом особисто. Формування ідеї роботи, планування та розробка методичних підходів до виконання комплексу лабораторних досліджень, узагальнення отриманих результатів проведено за участю наукового керівника д.б.н., проф. Мусієнка М.М., зав. кафедри біології рослин д.б.н., проф. Таран Н.Ю., зав. науково-дослідної лабораторії «Фізіологічних основ продуктивності рослин» к.б.н., с.н.с. Бацманової Л.М. Допомогу в проведенні біохімічних досліджень надавали м.н.с., к.б.н. Конотоп Є.О, с.н.с., к.б.н. Светлова Н.Б. та н.с., к.б.н. Стороженко В.О., що відображається у спільних публікаціях. Допомогу у розробці модельної системи осмотичного стресу надавав с.н.с., к.б.н. Косян А.М. Електрофоретичне розділення протеїнів та вестерн-блот аналіз були проведені спільно з доц. І. Матушиковою, Ph.D., та асист. З. Грегоровою, Ph.D., на базі кафедри екохімії та радіоекології Університету св. Кирила та Мефордія м. Трнава, Словаччина, в межах Національної стипендійної програми Словацької Республіки з підтримки мобільності студентів, аспірантів, викладачів ВУЗів та наукових співробітників. Дослідження за параметрами біохімічного фенотипування проведені в лабораторії к.б.н., доц. А.П. Смертенка Інституту біологічної хімії Університету штату Вашингтон, м. Пулман, США, в межах спільного українсько-американського науково-дослідного проекту за підтримки Фонду цивільних досліджень та розвитку США (CRDF Global). Дослідження в умовах вегетаційного досліду проведені спільно з д.б.н. Стасиком О.О. та с.н.с. Соколовською-Сергієнко О.Г. на базі відділу фізіології та екології фотосинтезу Інституту фізіології рослин та генетики НАН України. Допомогу у проведенні польових досліджень надавали співробітники кафедри рослинництва Агробіологічного факультету Національного університету біоресурсів та природокористування України.

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати дисертаційної роботи доповідалися та обговорювалися на: 11 міжнародній конференції «Plant Functioning Under Environmental Stress» (Краків, Польща, 2018); З'їзді

американського товариства біологів рослин «Plant Biology 2018» (Монреаль, Канада, 2018); IV Міжнародній конференції “Онтогенез рослин у природному та трансформованому середовищі. Фізіолого-біохімічні та екологічні аспекти” (Львів, 2017); XIII Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2017); Міжнародних науково-практичних конференціях «Nanotechnology and nanomaterials» (Львів, 2015, 2016; Чернівці, 2017; Київ, 2018).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 19 наукових праць, з них 7 статей у фахових періодичних наукових виданнях (з яких 5 – у виданнях, що входять до міжнародної наукометричної бази даних SCOPUS, 2 - у фахових виданнях України) та 12 тез доповідей у матеріалах міжнародних наукових конференцій та з’їздів.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів роботи та їх обговорення, аналізу й узагальнення результатів, висновків та списку використаних джерел (309 найменувань, з них 18 українською та російською, 291 – іноземними мовами), 1 додатку. Матеріали дисертаційної роботи викладені на 164 сторінках (з яких основна частина займає 110 сторінок), ілюстрована 3 таблицями та 24 рисунками.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Посуха, як потужний стресовий фактор, спричиняє серйозні порушення метаболізму рослин, що призводить до зниження вегетативної та генеративної продуктивності [8–10]. Негативна дія посухи здебільшого обумовлена дефіцитом води, що виникає внаслідок зниження вологості повітря та ґрунту за тривалої відсутності опадів. Розвиток пшениці м'якої (*T. aestivum*) за умов водного дефіциту значно впливає на показники якості насіння [24], що завдає значних збитків виробникам сільськогосподарської продукції. Водний дефіцит може призводити до зниження вмісту крохмалю насіння зернових культур до 40%, та, як результат, вкрай негативно вплинути на його склад, структуру та функціональні властивості [25]. Дослідження свідчать, що водний дефіцит сприяє зниженню вмісту амілози у насінні пшениці, що може супроводжуватися змінами розміру та співвідношення різних типів гранул крохмалю [26–28]. Характер цих змін також залежить і від тривалості дії стресу [29].

Чутливість сучасних сортів пшениці м'якої до впливу стресорів докільля пов'язують з генетичною ерозією, що спостерігається у багатьох культурних рослин [30], а залучення до селекційних програм предкових видів для поліпшення внутрішньовидового генетичного різноманіття видається перспективним [31]. Серед ймовірних донорів генів сільськогосподарсько цінних ознак надзвичайний інтерес представляє пшениця двозернянка (*T. dicoccum*), що характеризується високою пластичністю та невимогливістю до умов вирощування, а також демонструє високий потенціал для отримання високоякісного врожаю, оскільки насіння цієї культури містить високий вміст протеїну та клейковини [32]. Зазначений вид виник в процесі доместикації дикого виду пшениці двозернянковидної *T. dicoccoides* (Körn. ex Asch. &

Graebn.) Schweinf. та є генетично близьким до пшениці твердої (*T. durum* Desf.) [33, 34]. Схрещування пшениці двозернянки та егілопсу Тауша (*Aegilops tauschii* Coss.) призвело до утворення пшениці м'якої (*T. aestivum* L.), частка якої у світовому виробництві пшениці на сьогодні складає 95% [33]. Станом на 2018 рік Державний реєстр сортів рослин [35] включав лише два сорти пшениці двозернянки, придатні для поширення в Україні. Попри те, що посівні площі двозернянки значно поступаються іншим представникам родини Злакових, в останні роки попит на цю культуру зростає [34], що обумовлено загальними світовими тенденціями до збагачення агробіорізноманіття та органічного землеробства [36]. Незважаючи на давню історію вирощування пшениці двозернянки, дослідження механізмів адаптації цієї культури до впливів несприятливих факторів довкілля, зокрема посухи, в науковій літературі представлені недостатньо.

Зміни умов водопостачання, зумовлені впливом кліматичних факторів, супроводжують рослини впродовж всього життєвого циклу [37–39]. За умов дефіциту води, що є функціонально важливим компонентом рослинних клітин та залучена до всіх фізіологічних та біохімічних процесів, спостерігається індукція певних молекулярних реакцій, пов'язаних зі сприйняттям стресу та трансдукцією стресового сигналу [40], що призводить до морфологічних, фізіологічних і клітинних змін. Ці зміни включають пригнічення клітинного росту і фотосинтезу, закриття продихів, накопичення специфічних осмолітів і протеїнів [41, 42], та можуть посилюватися або послаблюватися у випадку сумісної дії посухи та інших типів абіотичних чи біотичних стресорів [43–45]. Реакція рослин на дію посухи також залежить від стадії розвитку, інтенсивності та тривалості стресу [46, 47].

Стрестолерантність розглядають як одну зі стратегій стійкості вищих рослин до посухи [48], що обумовлюється розвитком генетично детермінованих адаптивних механізмів та являє собою складну та скоординовану відповідь за участі сотень генів [11–13]. Стрестолерантність передбачає підтримку певного рівня фізіологічної активності за умов

зниження вродженості тканин завдяки осморегуляції та підвищенню протоплазматичної стійкості [39]. Важливу роль у формуванні стретолерантності рослин до посухи відіграє ефективна регуляція окисно-відновних реакцій, запобігання розвитку окиснювальних процесів та забезпечення стабільності структурних компонентів клітин [49, 50].

### 1.1. Окисно-відновний гомеостаз клітин рослин за умов посухи

Посуха сприяє швидкому виробництву фітогормону абсцизової кислоти (АБК), що, в свою чергу, є індуктором експресії широкого діапазону генів (РАВ), білкові продукти яких беруть участь у захисті клітин від дегідратації за умов стресу [51]. АБК зумовлює закриття продихів для зменшення втрат води рослиною. Внаслідок закриття продихів відбувається й обмеження газообміну та фіксації  $\text{CO}_2$  [52]. Дисбаланс між утворенням та використанням електронів, спричинений водним дефіцитом, призводить до гальмування фотосинтетичної активності та посилення утворення активних форм кисню (АФК) у клітинах рослин, таких як перекис водню ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) і гідроксильні радикали [53, 54].

АФК відіграють велику кількість сигнальних ролей у різних організмах [44, 55, 56, 50, 57]. Певний час вони вважалися токсичними побічними продуктами аеробного метаболізму, але сучасна наукова література визнає АФК ключовими учасниками складної мережі передачі сигналів клітин [44, 56, 58, 59]. У дослідженнях з використанням рослин арабідопсису (*Arabidopsis thaliana* (L.) Neunh.) було показано, що такі сигнали можуть поширюватися зі швидкістю до 8,4 см/хв [60].

АФК представлені вільнорадикальними та нерадикальними молекулами, що значно відрізняються за своїми властивостями [50]. Зокрема,  $\text{H}_2\text{O}_2$  є важливою відносно стійкою нерадикальною АФК [61], що не має заряду [62].  $\text{H}_2\text{O}_2$  утворюється в хлоропластах та пероксисомах фотосинтезуючих клітин [55], під час фотосинтетичного циклу окиснення вуглецю та, меншою мірою, під час фотодихання, а також у дихальному електрон-транспортному ланцюзі

мітохондрій [58]. Інша форма АФК – супероксид аніон-радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ) – є зарядженою молекулою та не може пасивно переміщатися через мембрану. Однак,  $O_2^{\cdot-}$  легко перетворюється в  $H_2O_2$ , який здатен вільно дифундувати через мембрани або водні канали [54].  $O_2^{\cdot-}$  та  $H_2O_2$  опосередковують утворення розчинних в мембрані пероксидів ліпідів.

АФК сигналінг тісно пов'язаний з клітинним гомеостазом та метаболізмом. Майже будь-яка зміна клітинного гомеостазу може призвести до зміни стаціонарного рівня АФК в певному компартменті. Фізіологічні умови, що сприяють фотодиханню, можуть, наприклад, викликати посилення виробництва АФК у пероксисомах [63]. Встановлено, що екзогенний  $H_2O_2$  в низьких концентраціях сприяє індукції синтезу сполук, характерних для низькотемпературного стресу, підвищуючи, таким чином, стійкість до дії несприятливих факторів навколишнього середовища [64]. Дослідження, проведене з використанням технології ДНК-мікрочіпів, показало, що  $H_2O_2$  впливає на рівень експресії 175 генів рослин арабідопсису, серед яких гени протеїнів, що проявляють антиоксидантну активність, беруть участь у реакціях захисту на дію стресорів або функціонують як сигнальні білки [65]. Сучасна наукова література відзначає важливу роль  $H_2O_2$  у активації генів, що залучені до адаптації, стрестолерантності та інших реакцій захисту рослин [58, 66].

Окисно-відновний гомеостаз регулюється наявністю великих пулів клітинних антиоксидантів, які поглинають і зберігають у стані рівноваги відновники та окисники [67] та визначають тривалість та специфіку АФК-опосередкованої трансдукції сигналу. Рослинні клітини здатні ефективно справлятися з високими темпами утворення  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  та синглетного кисню ( $^1O_2$ ). За умов стресу інтенсивність утворення АФК може досягати критичного рівня, що призводить до т.з. «окиснювального вибуху» [50, 68], що зазвичай має два відмінні піки [69], та призводить до окиснювального пошкодження протеїнів, ДНК та ліпідів [70]. Зокрема, підвищення інтенсивності утворення  $H_2O_2$  в рослинному організмі спостерігається за абіотичного та біотичного стресу різного генезу, як, наприклад, біотичні інвазії, поранення,

ультрафіолетове опромінення, вплив інтенсивного освітлення, посуха, засолення і/або охолодження [50, 61].

Супероксид аніон радикал  $O_2^{\cdot-}$  є першою сполукою, що утворюється внаслідок відновлення молекулярного  $O_2$  головним чином в ЕТЛ хлоропластів та мітохондрій, а також у реакціях, що каталізуються пероксидазами (ПО), зв'язаними з клітинною стінкою, та НАДФ-оксидазами.  $O_2^{\cdot-}$  характеризується високою реакційною здатністю та коротким періодом існування, з подальшим перетворенням у  $H_2O_2$ . Цей процес може відбуватися спонтанно за низького рН середовища або за участі ензиму супероксиддисмутази (СОД), що представляє першу лінію захисту клітин від АФК [71]. Кофакторами СОД виступають метали Cu, Zn, Mn або Fe, що визначає її функції та локалізацію у клітині [70].

Залежно від природи стресора та ступеню стресового навантаження відповідь за участі СОД може мати відмінний характер. Ряд досліджень свідчить, що у рослин пшениці підвищується активність СОД на початку посухи та зазначається, що саме Mn-СОД може відігравати основну роль у знешкодженні  $O_2^{\cdot-}$  [72, 73].

Основними ензиматичними системами розщеплення  $H_2O_2$  в рослинному організмі є ПО та каталаза (КАТ). ПО об'єднують оксидоредуктази, здатні окиснювати хімічні сполуки за рахунок кисню, що входить до складу перекису водню, з утворенням проміжних комплексів. Аскорбат-пероксидаза (АПО) та глутатіонпероксидаза представляють I клас ПО. АПО каталізує першу реакцію аскорбат-глутатіонового циклу, або циклу Голівела-Асади-Фойер, де за участі аскорбату відбувається розщеплення  $H_2O_2$  з утворенням води [74]. Як і АПО, глутатіонпероксидаза також розщеплює  $H_2O_2$  до  $H_2O$ , але використовує глутатіон як відновник у цій реакції. До III класу ПО відносять секреторні рослинні ПО, що проявляють субстратну специфічність до багатьох фенольних сполук та ароматичних амінів [75].

ПО локалізовані в цитозолі або слабкозв'язані з клітинною стінкою. За умов стресу ПО залучаються до різних фізіологічних процесів, таких як

модифікація клітинної стінки шляхом полімеризації суберину, зшивання структурних неензиматичних протеїнів та розщеплення полісахаридів стінки клітин; вони можуть впливати на ріст фруктів, проростання та нодуляції [76]. Функціональне різноманіття ПО забезпечується великою кількістю їх ізоформ.

Баланс між ПО та КАТ має вирішальне значення у супресії токсичних рівнів  $H_2O_2$  у клітині [68], в т.ч. за умов індукованого посухою окиснювального стресу [54, 70]. Вважається, що АПО та глутатіонпероксидаза беруть участь у регуляції вмісту  $H_2O_2$  як сигнальної молекули, тоді як КАТ необхідна для детоксикації цього АФК, оскільки вона не потребує додаткових субстратів та безпосередньо взаємодіє з  $H_2O_2$  [77]. Про відповідний функціональний розподіл свідчить також те, що КАТ мають значно нижчу спорідненість до  $H_2O_2$ , ніж АПО та пероксиредоксини, а активність цього ензиму зростає майже лінійно разом з підвищенням вмісту  $H_2O_2$  [78, 79].

Зміни експресії антиоксидантних ензимів залежать від рівня толерантності рослин до дії стресорів [80, 81]. Висока активність КАТ у листках рослин за умов посухи, ймовірно, дозволяє видаляти надлишковий  $H_2O_2$ , що утворюється в процесі фотодихання, особливо за тривалого стресового навантаження. За таких умов фотодихання працює як енергетична мийка, що запобігає надмірному відновленню електрон-транспортного ланцюга хлоропластів та фотоінгібуванню [82], а КАТ, запобігаючи накопиченню АФК, виступає основним допоміжним компонентом фотосинтетичних процесів [83, 84].

Збільшення активності КАТ має позитивну кореляцію зі ступенем посухи [56, 85]. Показано, що у рослин посухостійкої пшениці [86], гороху [87], люцерни [88], кукурудзи [89] та рису [90] спостерігається висока активність КАТ, у той час як дефіцит КАТ призводить до накопичення АФК та підвищеної сприйнятливості за сильного стресового навантаження в листках тютюну [91]. Висока толерантність до посухи, ймовірно, забезпечується також підвищенням активності інших антиоксидантних ензимів, таких як СОД, ПО та АПО [87], а також накопиченням осмотично-активних сполук, про що

свідчать дослідження з використанням рослин посухостійкого виду – проса (*Panicum sumatrense* Roth ex Roem. & Schult.) [92]. Дослідження рослин пшениці м'якої за умов посухи демонструють інтенсифікацію окисно-відновного метаболізму та процесів розщеплення АФК шляхом збільшення кількості ізоформ СОД та КАТ, а також зменшення вмісту протеїнів, залучених до процесів фотосинтезу та в т.ч. циклу Кальвіна [12]. Варто зауважити, що у солестійких видів томатів і посухостійких сортів пшениці виявлено нижчий вміст  $H_2O_2$  і вищу активність КАТ, СОД та АПО, ніж у чутливих сортів [90, 93].

АПО відіграє ключову роль у підтриманні гомеостазу двох неензиматичних антиоксидантів, аскорбату та глутатіону, в контексті клітинного редокс-гомеостазу і редокс-сигналізації та прямо чи опосередковано бере участь у підтримці високого рівня фотосинтезу у рослин за несприятливих умов навколишнього середовища [10, 82]. Відзначено роль АПО як ключового антиоксидантного ензиму у формуванні посухостійкості та відновлення рослин після дії посухи [85, 87, 94]. Підвищення активності АПО та КАТ спостерігали у дослідженнях з використанням трансгенних рослин тютюну (*Nicotiana tabacum* L.) з надекспресією гену  $\Delta$ -1-пірролін-5-карбоксилатсинтази (P5CS) за умов ПЕГ-модельованої посухи [95]. Трансгенні рослини тютюну з надекспресією цитозольних СОД і АПО також демонструють значно вищу толерантність до умов посухи, ніж рослини, які не мають генетичних модифікацій [85]. Такі рослини характеризуються вищою ефективністю використання води та фотосинтетичною активністю, а також не мають виражених ознак розвитку окиснювального стресу за параметрами вмісту ТБК-активних сполук, перекису водню та відносного витоку електролітів.

За умов недостатньої кількості антиоксидантів рослини здатні активувати інші системи захисту від АФК, а для компенсації підвищеного рівня окиснювальних процесів або надмірних втрат антиоксидантів, ймовірно, збільшується швидкість обміну протеїнів та/або репарації ДНК [96].

У системі антиоксидантного захисту важливу роль відіграють також низькомолекулярні антиоксиданти неензиматичної природи, такі як аскорбат, глутатіон і токоферол. Вони є своєрідними редокс-буферами, які взаємодіють з численними клітинними компонентами та є кофакторами ензимів [67]. Їхня роль не обмежується лише антиоксидантним захистом, вони здатні впливати на ріст і розвиток рослинного організму шляхом модуляції процесів починаючи від мітозу та видовження клітин, і до старіння та смерті [97–99]. Низькомолекулярні антиоксиданти надають важливу інформацію про окисно-відновний стан клітин і залучені до механізмів регуляції експресії генів у відповідь на дію біотичних та абіотичних стресорів. Взаємодія «АФК-антиоксидант» розглядається як метаболічний інтерфейс для сигналів, отриманих від внутрішнього обміну речовин рослинного організму та навколишнього середовища. Цей інтерфейс модулює відповідну індукцію процесів адаптації або, як альтернативу, виконання програм клітинної смерті [67]. Наприклад, було показано, що обробка аскорбіновою кислотою або проліном, для якого характерні прооксидантні властивості, підвищують стійкість проростків ячменю до сольового стресу [100].

Окиснення клітинних сполук має важливе значення за будь-якого абіотичного чи біотичного стресу, проте ступінь та фізіологічне значення окиснювального пошкодження є дискусійним. Так, Rizhsky та ін. [101] виявили, що рослини з низькою активністю КАТ та цитозольної АПО є більш стійкими, ніж рослини, в яких взагалі відсутній один з цих ензимів.

## **1.2. Накопичення осмолітів як захисна реакція на дію посухи**

Осмотична регуляція у рослин за умов дефіциту води може відбуватися завдяки накопиченню низькомолекулярних органічних розчинників [102], серед яких переважають розчинні вуглеводи [103] та пролін [104, 105]. Акумуляцію проліну розглядають і як частину загального механізму формування стійкості багатьох одно- та дводольних рослин [106]. Вважається,

що синтез проліну за умов стресу відбувається через глутаматний шлях, а регуляція накопичення цієї імінокислоти здійснюється шляхом активації синтезу глутамату та фіксації азоту, а також пригнічення активності проліндегідрогенази – основного ензиму розщеплення проліну [107].

Пролін виконує ряд важливих функцій: регулює накопичення доступного рослинам азоту, він осмотично активний, має антиоксидантні властивості та бере участь у детоксикації АФК [108, 109], а також сприяє стабільності мембран [110]. Вважається, що завдяки структурним особливостям, а саме наявності третинного атому, що може утворювати стійкий радикал, пролін здатний безпосередньо інактивувати АФК [107]. Пролін може виконувати сигнальну роль та здатний активувати певні реакції – складові процесу адаптації [111]. Для проліну характерна роль молекулярного шаперона, який стабілізує структуру протеїнів, а також забезпечує буферизацію цитозольного рН та балансу редокс-статусу клітин. Дослідження з залученням генетично-трансформованих рослин з підвищеним синтезом проліну свідчать про здатність таких рослин витримувати стресові навантаження різної природи [112, 113], а екзогенна обробка проліном сприяє активації захисних механізмів та підвищує стійкість рослин до дії посухи [114, 115], засолення [116, 117], забруднення важкими металами [118, 119].

### **1.3. Роль пероксисом у захисті рослин за умов посухи**

За умов дефіциту води важливим є не лише утворення достатньої кількості сполук, здатних знешкоджувати АФК, але й проліферація пероксисом – основного компартменту клітини, залученого до метаболізму АФК. Вміст пероксисом – динамічний показник, оскільки їх чисельність, морфологія та білковий склад можуть змінюватися залежно від етапу онтогенезу та факторів навколишнього середовища, сприяючи, таким чином, адаптації організму рослин [120].

Пероксисоми беруть участь у ключових внутрішньоклітинних процесах, включаючи  $\beta$ -окислення жирних кислот, метаболізм АФК та біосинтез фітогормонів ауксину, жасмонатів і саліцилатів [120–122]. Пероксисоми містять ензими, залучені до реакцій гліюксилатного циклу та фотодихання, а число відомих на сьогодні пероксисомальних протеїнів сягає 163 [123]. Процес окиснення гліюклату до гліюксилату в пероксисомах забезпечує утворення основної частини внутрішньоклітинного АФК [59], що призводить до високої концентрації АФК саме у внутрішньому просторі пероксисом. Як наслідок, синглетний кисень ( $^1\text{O}_2$ ) та гідроксильні радикали ( $\text{OH}^*$ ) можуть викликати перекисне окислення поліненасичених жирних кислот, а також нітрозилування, карбонілювання та окислення амінокислот. Комбінація цих модифікацій призводить до пероксисомальної дисфункції через незворотне пошкодження інтегральних протеїнів мембрани та внутрішнього простору, втрату ензиматичної активності, а також зменшення плинності і проникності мембран [49, 68]. Відомо також, що пероксисоми здатні продукувати супероксид аніон радикали  $\text{O}_2^{\cdot-}$  щонайменше в двох місцях: в результаті діяльності ксантиноксидази у матриксі та НАДФ-залежної системи, що представлена інтегральними поліпептидами, розміщеними в мембранах пероксисом [124].

Від окиснювального пошкодження пероксисоми захищають такі антиоксиданти, як аскорбат і глутатіон, які неензиматично нейтралізують АФК, а також безліч здатних до розщеплення АФК ензимів, зокрема КАТ, дегідро- та монодегідроаскорбат-редуктаза, глутатіонпероксидаза та глутатіонредуктаза, АПО, пероксиредоксини та СОД [121, 125]. Велика кількість цих ензимів перетворює пероксисому в ключову органелу, що забезпечує захист клітини від АФК за нормальних умов зростання. За умов стресу пероксисоми стають особливо важливими для виживання. Зокрема, саме пероксисомальна КАТ залучена до розщеплення більшості  $\text{H}_2\text{O}_2$ , утвореного у відповідь на яскраве освітлення, засолення та озон [91], а

толерантність рослин гороху до міді корелює з вищою активністю пероксисомальної КАТ та СОД [126].

Вплив стресорів довкілля може індукувати не лише активність пероксисомальних механізмів розщеплення АФК, але також проліферацію пероксисом [127–130]. Вважається, що АФК-індукована проліферація відбувається через транскрипційну регуляцію генів, які кодують пероксисомальні протеїни [129–131], включаючи пероксини 1 і 10 (PEX1 і PEX10), що полегшують біогенез пероксисом [131]. Посуха також викликає збільшення транскрипції гену PEX11 рослин арабідопсису [132]. Збільшення проліферації пероксисом може бути викликано шляхом екзогенної обробки  $H_2O_2$  [133], що свідчить про взаємозв'язок між накопиченням АФК та вмістом пероксисом. Варто зауважити, що збереження надлишку АФК у внутрішньоклітинному просторі впродовж тривалого часу призводить до окиснювального пошкодження пероксисомальних протеїнів та подальшого порушення проліфераційних процесів цих органел [134]. У дослідженнях Marshall та ін. [135] продемонстровано, що інгібування поділу пероксисом дріжджів (*Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen) може відбуватися внаслідок формування дисульфідних зв'язків між мономерами Pex11 за умов стресу, в результаті чого утворюється неактивна форма цього протеїну у вигляді димеру.

Відомо, що пероксисоми можуть утворюватися шляхом поділу або формування *de novo* з ендоплазматичного ретикулума [120]. Утворення пероксисом може відбуватися також внаслідок перебудови гліоксисом, що характерно для рослин на ранніх етапах розвитку [79].

Незважаючи на значний прогрес у розумінні молекулярних учасників процесу поділу пероксисом, регуляторні компоненти, що з'єднують сигнали АФК з транскрипційною активацією генів, пов'язаних з поділом, залишаються недостатньо зрозумілими [133], а специфічні рецептори або сигнальні шляхи пексофагії рослин на сьогодні не охарактеризовано [134]. Отже, рослини, ймовірно, розвинули унікальні механізми для регулювання накопичення

пероксисом в клітинах. Розуміння біології пероксисом у контексті процесів розвитку та стресів вимагає більш глибоких знань про молекулярні механізми, що контролюють проліферацію та деградацію пероксисом [133].

Вважається, що вміст пероксисом знаходиться у оберненій кореляції з ефективністю гомеостазу АФК [21], а використання флуоресцентного зонду N-BODIPY для вимірювання накопичення пероксисом у форматі напів-високої пропускної здатності в контексті покращення методології фенотипування за умов стресу видається перспективним. Менший вміст пероксисом за дії посухи може бути свідченням меншого вмісту АФК та кращої пристосованості клітин рослин. З огляду на варіативність стратегій адаптації рослин до посухи та ймовірної здатності деяких генотипів до ефективного знешкодження АФК альтернативними пероксисомам механізмами, систематичні дослідження дозволять з'ясувати роль пероксисом у формуванні посухостійкості та виявити можливі кореляції між вмістом пероксисом та показниками врожайності рослин за умов посухи.

#### **1.4. Роль стрес-індукованих захисних білків у формуванні посухостійкості рослин**

Як відомо, в рослинній клітині за стресових умов пригнічується утворення мРНК, необхідних для синтезу протеїнів, характерних для звичайного метаболізму, проте відбувається активація експресії генів стресових білків. Серед білків, залучених до відповіді на дефіцит води, прийнято виділяти дві основні групи: функціональні та регуляторні. До функціональних належать захисні білки, представниками яких є протеїни пізнього ембріогенезу (LEA) та протеїни теплового шоку (HSPs), протеїни водних каналів (аквапорини), ензими, що залучені до детоксикації, та білки, що беруть участь у біосинтезі осмолітів. До регуляторних білків, синтез яких індукується посухою, належать фактори транскрипції, кінази, фосфатази, а також RAB-протеїни. Встановлення послідовності геному деяких модельних

рослин, таких як рис (*Oryza sativa* L.) та арабідопсис, дозволило ідентифікувати сотні генів, що залучені до відповіді рослин на дію посухи та інших абіотичних факторів [136, 137]. Показово, що серед 73 генів, ідентифікованих у рису і чутливих до дії стресу, 51 – мають аналогічну функцію в рослинах арабідопсису [41]. Багатокомпонентність механізму захисту рослинного організму до посухи ускладнює процес ідентифікації функціональних властивостей окремих сполук. Зокрема, дані літератури свідчать про участь окремих патоген-залежних білків, або PR-білків (pathogenesis-related proteins) у формуванні захисних реакцій рослин за посухи [138, 139], проте їх роль у цьому процесі залишається мало вивченою.

#### **1.4.1. Роль дегідринів у адаптації рослин до умов посухи**

Акумуляція протеїнів пізнього ембріогенезу, або LEA-протеїнів, є частиною загального механізму захисту в умовах водного стресу [140]. У різних видів рослин, протеїни типу LEA кодують гени RD (responsive to dehydration), ERD (early responsive to dehydration), KIN (cold inducible), COR (cold regulated), та RAB (responsive to ABA) [41, 141, 142]. LEA-протеїни поділяють на сім груп залежно від їх подібності за амінокислотною послідовністю та за наявністю відмінних консервативних мотивів.

Дегідрини, що відомі як 2 група LEA-протеїнів, залучені до формування відповіді на дію різних абіотичних стресорів. Вони накопичуються у вегетативних тканинах за умов засолення, посухи та екстремальних температур та характеризуються декількома важливими функціями, серед яких захист мембран, кріозахист ензимів та захист від активних форм кисню [143].

Широким функціональним спектром дегідрини завдячують своїй структурі, а саме високому вмісту заряджених амінокислот [143, 144], незначній кількості цистеїну та триптофану [145]. Така будова зумовлює високу гідрофільність молекул дегідринів, у розчині вони не мають чітко визначеної вторинної або третинної структури, через що їх відносять до

внутрішньо-непорядкованих протеїнів (IDPs) [146, 147]. Низький вміст гідрофобних ділянок, які могли б агрегувати у водному середовищі, запобігає денатурації дегідринів за умов посухи та при заморожуванні. Ця властивість активно експлуатується у процесі виділення та очистки дегідринів шляхом кип'ятіння [148].

Дегідрини, як правило, здатні до певної структурної організації при взаємодії з лігандами. Дослідження [149, 150] продемонстрували, що при взаємодії з поверхнею мембрани дегідрини формують  $\alpha$ -спіраль, а Graether та Boddington [143] вважають, що дегідрини змінюють свій олігомерний стан також і при зв'язуванні з іонами.

У дегідринів ідентифіковано три консервативні домени, що представлені K, Y та S сегментами [145]. Зокрема, K-сегмент характеризується амінокислотою послідовністю EKKGIMDKIKEKLPG та присутній майже у всіх протеїнів цього класу, за винятком нещодавно описаного дегідрину, у якого K-сегмент відсутній [151]. За допомогою K-сегменту дегідрини забезпечують стабілізацію макромолекул та мембан за несприятливих умов навколишнього середовища [152]. В умовах *in vitro* було продемонстровано, що наявність K-сегменту дозволяє дегідрину DHN-5 пшениці запобігти інактивації лактатдегідрогенази та  $\beta$ -глюкозидази [153].

Структура дегідринів може варіювати та залежно від сегментів, що входять до їх складу, дегідрини поділяють на  $K_n$ ,  $SK_n$ ,  $K_nS$ ,  $Y_nSK_n$  та  $Y_nK_n$  [145]. Наявні в літературі дані не відображають прямої залежності між структурою дегідринів та типом стресора, в результаті дії якого відбувається їх накопичення [143]. Порівняльний аналіз, проведений Graether та Boddington [143], свідчить, що дегідрини зі структурою  $K_n$ ,  $SK_n$  та  $K_nS$  накопичуються у відповідь на холодний стрес, проте їх вміст також може збільшуватись за умов посухи або засолення, що у випадку  $Y_nSK_n$ -дегідринів є основними стимулами їх синтезу. Індукція синтезу  $Y_nK_n$ -дегідринів також була продемонстрована у відповідь на посуху та засолення [154] та дію низьких температур [155].

Вважається, що Y-сегмент може бути залучений до реакцій захисту рослин за умов посухи та засолення, проте не холодowego стресу [143]. Ця думка, узгоджується з дослідженням, проведеним на рослинах пшениці [156], де було показано індукцію експресії YSK2 дегідринів у відповідь на дію посухи та відсутність реакції на низькі температури, на відміну від K<sub>n</sub>-дегідринів.

Структура молекул дегідринів надає їм здатність зв'язувати велику кількість води та розчинених в ній іонів, що дозволяє утримувати воду та запобігати критичному підвищенню концентрації іонів в клітинах рослин за умов посухи [157].

Дегідрини, а також LEA-протеїни груп 3 та 4, запобігають інактивації деяких ензимів, таких як лактатдегідрогеназа та малатдегідрогеназа за різних рівнів дегідратації [158–160].

Дегідрини здатні до взаємодії з різноманітними металами і, ймовірно, виконують захисну функцію за стресових умов запобігаючи утворенню гідроксильних радикалів [161, 162]. Виявлено ряд дегідринів, здатних специфічно зв'язуватись з металами. Наприклад, у цитрусових виявлено дегідрин, що міцно зв'язується з залізом (3<sup>+</sup>), нікелем, купрумом та цинком, слабше – з марганцем, кальцієм та манганом. Було досліджено роль дегідринів за умов забруднення середовища важкими металами, де вони діють не лише як осмотичні агенти під час зневоднення, спричиненого дією металу, але також виконують функцію шаперонів [153, 163].

Повідомляється, що дегідрини беруть участь у регуляції метаболізму проліну та системи антиоксидантного захисту [164, 165], а також здатні до взаємодії з мембраною [166]. Проте роль окремих дегідринів залишається не встановленою.

Активация синтезу дегідринів у відповідь на дію стресових факторів може регулюватися АБК-залежними та АБК-незалежними сигнальними шляхами. Nylander et al. [167–169] за допомогою вестерн блотингу ідентифікував 5 дегідринів рослин арабідопсису, з яких 3 накопичувалися у відповідь на дію

низькотемпературного стресу, вміст 1 підвищувався в наслідок обробки АБК та ще 1 експресувався конститутивно, проте вміст його збільшувався за обробки АБК, при низьких температурах та засоленні. Чутливість генів дегідринів до АБК визначається присутністю в їх промоторах АВРЕ (АБК-чутливих)-цис-елементів [170]. Дегідринові промотори, що містять інші цис-регуляторні елементи, такі як LTRE / DRE (чутливий до низьких температур і дегідратації елемент), який також називається CRT (С-повтор), забезпечують чутливість до низьких температур, посухи та підвищеної засоленості, але не до АБК [170, 171]. Регуляція синтезу дегідринів може здійснюватися також іншими фітогормонами. Ряд досліджень демонструє ефективність застосування брассиностероїдів з метою підвищення стійкості рослин до посухи, засолення, холодостресу, що сприяє збереженню їх продуктивності за несприятливих умов [51, 172, 173].

Декілька незалежних досліджень продемонстрували, що за умов високого рівня експресії дегідринів відбувалося зниження витоку електролітів [174, 175], що є загальноприйнятим методом визначення змін проникності мембран і показником, який демонструє рівень холодостійкості рослин. Nara та ін. [176] досліджували вплив дегідринів на ступінь перекисного окиснення ліпідів та продемонстрували, що дегідрин CuCOR19 цитрусів запобігає окисненню ліпосом, ймовірно, шляхом знешкодження АФК. Хіе та ін. [177] показав різні функції дегідринів, де дегідрин MtCAS31 взаємодіяв з транскрипційним фактором ICE1 та зменшував щільність продихів.

Дегідрини значно варіюють за своєю молекулярною масою: від 9,6 кДа [178] до 70 кДа [179]. Дослідження протеїнів за допомогою методу ДСН-електрофорезу в ПААГ демонструють, що молекулярна маса дегідринів може досягати 200 кДа. Однак, існує думка, що такі аномально великі значення обумовлені невпорядкованою структурою дегідринів та не відображають їх реальну масу [180].

Дегідрини можуть бути локалізовані у різних компартментах клітини. Найчастіше вони акумулюються у цитоплазмі та ядрі, проте можуть бути наявні у мітохондріях, хлоропластах та поблизу плазматичної мембрани.

Дегідрини розглядаються як потенційні молекулярні маркери стійкості рослин до абіотичних стресів. Зокрема, Labhili et al. [178] виявлено кореляцію між ступенем накопичення транскриптів дегидринів та посухостійкістю сортів твердої пшениці.

#### **1.4.2. Індуковані посухою PR-білки та їх роль у захисті рослин**

У формуванні стрестолерантності рослин важливу роль відіграють PR-білки. Більшість PR-білків присутні конститутивно у всіх органах та беруть участь у процесах росту і розвитку рослинного організму. Залежно від структури та функцій, PR-білки поділяють на 17 груп, проте вони мають одну спільну рису – посилену експресію за впливу патогенів [181]. З іншої сторони, більшість PR-білків також залучені до захисту рослин за дії стресорів абіотичного походження [139, 181].

$\beta$ -1,3-глюканази та хітинази, представники 2 та 3 груп PR-білків, відповідно, проявляють гідролітичну активність та залучені до формування стійкості рослин до патогенів. Дослідження, проведені на модельних рослинах, а також трансгенних культурах свідчать, що акумуляція цих протеїнів підвищує стійкість до вірусів, бактерій та грибів. Хітинази також беруть участь у формуванні симбіотичних взаємодій з азотфіксуючими бактеріями та мікоризними грибами шляхом зниження захисту рослинного організму. Сучасна наукова література свідчить про участь  $\beta$ -1,3-глюканаз та хітиназ у загальному механізмі адаптації рослин до дії абіотичних факторів навколишнього середовища, проте їх роль у цьому процесі залишається нез'ясованою.

Роль хітиназ у рослинному організмі не обмежується реакціями захисту. Деякі хітинази синтезуються конститутивно та беруть участь у процесах ембріогенезу, у нодуляції та утворення мікоризи, запрограмованої смерті

клітин, можуть виступати як запасні білки або інгібітори ензимів [182]. Як і хітинази,  $\beta$ -1,3-глюканази беруть участь у багатьох фізіологічних процесах, таких як проростання насіння та пилку, спокій бруньок, цвітіння та дозрівання плодів.

Відомо близько 44 генів, що кодують хітинази та 57 генів  $\beta$ -1,3-глюканаз рослин рису [183]. У рослин м'якої пшениці профіль хітиназ та глюканаз вивчений недостатньо. Згідно бази даних послідовностей хромосом (IWGSC) [184] геном пшениці нараховує до 184 послідовності, приналежні до хітаназ, та 271 послідовність, описані як глюкан-ендо-1,3- $\beta$ -глюкозидазо-подібні протеїни. З іншого боку, протеом пшениці в базі даних UniProt містить записи лише про одну хітиназу та 17 ендоглюканаз.

Залежно від структури протеїну, специфічності субстрату, механізмів каталізу та чутливості до інгібіторів розрізняють 7 класів хітиназ. Всі хітинази характеризуються здатністю розщеплювати  $\beta$ -1,4-глікозидні зв'язки в біополімерах N-ацетил-глюкозамінів, наприклад, хітину та хітозану, що входить до складу стінок клітин грибів та водоростей. Внутрішньоклітинний субстрат рослинних хітиназ на сьогодні залишається невідомим. Повідомлялося, що хітинази каталізують реакцію розщеплення арабіногалактанових протеїнів рослин [182] – ключових сполук процесів росту, розвитку та запрограмованої смерті клітин, клітинного сигналіngu [185–187], а також репродукції рослинного організму [188]. Вважається, що інші глікопротеїни клітинних стінок, до складу яких входить N-ацетилглюкозамін, можуть бути ендогенним субстратом для хітиназ [182].

Рослинні  $\beta$ -1,3-глюканази розщеплюють  $\beta$ -1,3-глюкани, що є основним структурним компонентом клітинних стінок грибів. Утворені в результаті такого розщеплення олігосахариди можуть виконувати роль еліситорів, що стимулюють утворення інших рR-білків, таким чином, запускаючи ланцюг реакцій системної стійкості рослин [189]. Так, у рослин арабідопсису, вирощених на середовищі з вмістом ламінарину, окрім підвищення синтезу  $\beta$ -1,3-глюканаз спостерігали індукцію експресії генів транспортерів, залучених

до транспорту іонів Fe, Cu, Zn, необхідних для роботи антиоксидантної системи хлоропластів [190]. Внутрішньоклітинним субстратом для  $\beta$ -1,3-глюканази є калоза, що бере участь у процесах цитокінезу, мікроспорогенезу, закриття продихів, а також у захисних реакціях за біотичних та абіотичних стресів [191].

Участь хітинази у захисних реакціях за умов водного дефіциту продемонстровано у рослин арабідопсису та окремих видів роду *Triticum* [138]. Повідомляється, що індуковані посухою хітинази беруть участь у підвищенні стійкості трансгенних рослин полуниць за умов водного дефіциту [192]. Серед хітиназ було ідентифіковано ензим DIP3, синтез якого індукується посухою. Дослідження експресії генів, що кодують DIP3 у коренях рослин рису свідчать про те, що цей ензим накопичується за дії різних форм абіотичних стресорів (ПЕГ-модельована посуха, засолення, низькі температури) [193]. Підвищену стійкість до забруднення важкими металами та засолення спостерігали також у трансгенних рослин тютюну з надекспресією хітинази *Trichoderma harzianum* [194].

Аналогічно,  $\beta$ -1,3-глюканази відіграють ключову роль не лише у захисті від патогенів [195, 196]. Вони залучені до формування захисних реакцій за дії багатьох інших типів абіотичних стресів, зокрема, посухи, механічного пошкодження, засолення, фітогормонів [197], переважно завдяки здатності до розщеплення калози. Було виявлено, що ген *GluB* проявляє тканино-специфічну регуляцію у насінні та листках томатів, а рівень експресії цього гену підвищується під впливом метил-жасмонату та пораненні під час проростання насіння [198]. У рослин цукрової тростини було виявлено зв'язану з мембраною  $\beta$ -1,3-глюканазу ScGluD2, що залучена до захисту рослин не лише за патогенезу, але й за умов засолення та забруднення важкими металами [199].

## 1.5. Перспективи застосування біохімічного фенотипування у визначенні стійкості рослин до посухи

Фенотипування рослин за морфологічними, фізіологічними ознаками та параметрами урожайності не здатні врахувати реакції, що відбуваються на клітинному рівні. З'ясування таких клітинних параметрів можуть покращити чутливість фенотипування завдяки інтегруванню різноманітних молекулярних взаємодій, що лежать в основі стрес-індукованих реакцій. Сучасна методологічна база досліджень метаболічного профайлу дозволяє здійснювати всебічне фенотипування, що є перспективним у тестуванні безпечності генетично модифікованих організмів, оцінки сільськогосподарських культур та виявленню чутливих та точних шляхів для характеристики потоків між окремими метаболічними пулами рослинних клітин, та може бути потужним інструментом функціональної феноміки [19].

Поняття «феном» був введений як характеристика фенотипу в цілому [200] та є результатом складного динамічного взаємозв'язку між геномом та навколишнім середовищем [18]. Прогрес у галузі молекулярної біології та технологій молекулярної селекції не здатний вирішити проблему розуміння зв'язку між генотипом та фенотипом. Дослідження фенотипу як комплексу морфогенетичних, фізіологічних, біохімічних ознак дозволяє виявити характеристики окремих видів та/або сортів рослин та з'ясувати реакції рослин, пов'язані з проявом адаптаційних стратегій за впливу несприятливих факторів навколишнього середовища [201]. Такий підхід є особливо актуальним в умовах сталого та ресурсозберігаючого рослинництва в контексті змін клімату та різних умов виробництва сільськогосподарської продукції.

Фенотипування розглядається як важливий компонент аналізу рослин, який дозволяє здійснити комплексну оцінку фенотипу на різних рівнях організації організму, та передбачає застосування мінімальних інвазивних або неінвазивних технологій [16]. Визначення фізіологічних параметрів необхідне

для прогнозування зв'язків між генотипом та фенотипом [17] та для підвищення урожайності рослин [202]. Вплив умов навколишнього середовища можна відслідковувати через «внутрішній» фенотип за допомогою фізіологічних та біохімічних параметрів, що в результаті визначають «зовнішній фенотип», оскільки саме реакції на рівні клітин формують кількісні та якісні характеристики на рівні тканин, органів та організму в цілому [18].

Методологія фенотипування передбачає використання засобів з різною пропускною здатністю, що враховує число окремих одиниць на певному організаційному рівні рослин або окремих рослин, які можуть бути проаналізовані за певною сукупністю ознак [18]. Дослідження з використанням автоматизованих платформ для виявлення морфологічних та фізіологічних особливостей рослин відносяться до методів з високою пропускною здатністю, проте є складними, а інтерпретація отриманих результатів вимагає загальної концепції та стандартизації екологічних та фенотипічних вимірювань, що ускладнюється недостатнім потенціалом наукового товариства для аналізу існуючих генетичних ресурсів у контексті їх взаємодії з довкіллям [16]. Біохімічне фенотипування зазвичай відносять до методів з низькою пропускною здатністю з огляду на необхідність залучення ручної праці та лімітовану кількість зразків [18]. Застосування методів, що передбачають аналіз зразків у 96-лункових мікропланшетах, дозволяють підвищити рівень пропускної-здатності [20, 133]. Перевагою застосування біохімічних параметрів для оцінки фенотипу рослин є можливість простежити взаємозв'язки між генотипом, зовнішніми факторами та фенотипом, а згідно Furbank та Tester [203] феноміку можна вважати «фізіологією рослин високої пропускної здатності».

Дослідження механізмів, що залучені до формування толерантності рослин до дії стресорів різної природи, в т.ч. посухи, з використанням біохімічних методів вимагає оцінки фізіологічного стану рослинного організму, таких як поділ клітин, газообмін, водний баланс, транспорт мінеральних речовин, тощо. Для розуміння функціонування окремих генів та

впливу екологічних факторів на фенотип важливою є інформація про накопичення та біологічну активність протеїнів [18, 204]. Використання сучасних методів за принципами, що лежать в основі фенотипування, забезпечують основу для розуміння динамічних взаємодій між генетичними і біохімічними процесами та фізіологічними фенотипами. Фенотипування є перспективним напрямком прикладних наукових досліджень, що може бути інтегровано в програми скринінгу рослин [18] та дозволяє відібрати селекційний матеріал з огляду на адаптаційний потенціал рослин [205].

### **1.6. Наночастинки металів у регуляції адаптивних реакцій рослин**

Інтеграція нанотехнологій у агровиробництво сприяє неминучому поширенню нанорозмірних частинок металів у природних екосистемах, що вимагає ретельного дослідження їх фітотоксичності на рівні геному та протеому [22]. Наноматеріали можуть містити частинки важких металів, зокрема міді (Cu) та цинку (Zn) [206], здатних акумулюватися в ґрунтах і водоймах. З іншого боку, унікальні фізичні та хімічні властивості роблять наночастинки металів привабливими для застосування в якості мікродобрив та регуляторів адаптивних реакцій рослин в умовах мінливого навколишнього середовища [207].

Окремий інтерес становлять наночастинки металів, що є важливими компонентами рослинного метаболізму, входять до складу клітинних структур. Передбачається, що застосування нанорозмірних есенціальних металів як елементів мінерального живлення дозволить підвищити урожайність сільськогосподарських культур, покращити ефективність використання добрив, зменшити втрати поживних речовин та мінімізувати несприятливі екологічні наслідки [207]. Вважається, що добрива з вмістом наночастинок цих металів швидше і краще розчиняються у ґрунтовому розчині, що збільшує їх доступність для рослин [22].

Наночастинки металів здатні поглинатися кореневою системою рослин через бічні корені та надходити до ксилеми крізь клітини кори та перициклу [208]. Ефективність абсорбції залежить від розміру та поверхні наночастинок і може стримуватися клітинною стінкою. Наночастинки більшого розміру можуть потрапляти до рослинного організму через гідатоци, приймочку квітки та продихи [209].

Рослини потребують таких мікроелементів як залізо (Fe), манган (Mn), цинк (Zn), мідь (Cu), молібден (Mo) та ін. Ці метали беруть участь у різних метаболічних процесах, включаючи фотосинтез, дихання та асиміляцію нітратів. Вони виступають кофакторами багатьох ензимів та беруть участь у процесах синтезу протеїнів, жирних кислот, флавоноїдів, тощо. Передбачається, що наночастинки Mn, Cu, Fe та Zn можуть модулювати синтез та функції СОД, оскільки ці метали входять до складу ензиму [71].

Дослідження Ghafariyan та ін. [210] свідчать, що низькі концентрації наночастинок Fe збільшують вміст хлорофілів в листках сої, зменшуючи хлоротичні симптоми дефіциту заліза. Фоліарна обробка наночастинами Fe рослин машу китайського (*Vigna sinensis* (L.) Walp.) сприяла збільшенню кількості стручків на рослину, маси 1000 зерен, вмісту заліза в листках та вмісту хлорофілів порівняно з контролем та сполукою солі цього металу [211]. На рослинах арахісу (*Arachis hypogaea* L.), що є чутливою культурою до дефіциту заліза, продемонстровано позитивний ефект обробки наночастинами оксиду заліза ( $Fe_2O_3$ ) на довжину кореня, висоту рослин та накопичення біомаси рослин [212], ймовірно, за рахунок регуляції вмісту фітогормонів та активності антиоксидантних ензимів. Було з'ясовано, що наночастинки  $Fe_2O_3$  адсорбуються на піщаний ґрунт, що полегшує доступність Fe для рослин.

Перевагою застосування нанорозмірних елементів мінерального живлення є їх низька токсичність порівняно з солями відповідних металів. Так, використання розчину солі  $MnSO_4$  у концентрації 1 мг/л спричиняє інгібування росту рослин машу звичайного (*V. radiata* (L.) R.Wilczek), на

відміну від наночастинок Mn, що проявляли стимулюючий ефект [213]. Це дослідження також свідчить, що застосування наночастинок Mn у концентрації 0,05 мг/л сприяють збільшенню довжини коренів та листків, а також накопиченню сирої та сухої маси рослин порівняно з контролем та обробкою розчином солі  $MnSO_4$ .

Ряд досліджень виявили позитивний вплив обробки розчинами наночастинок Zn рослин машу звичайного та нуту [214], огірків [215, 216], редису, гірчиці та пажитниці [217], проте зазначається, що застосування надмірних концентрацій може спричинити інгібуючий або токсичний ефект. У дослідженнях Lopez-Moreno та ін. [218] виявлено генотоксичний вплив наночастинок оксиду цинку (ZnO) у рослин сої за концентрації 2000 та 4000 мг/л, що значно перевищує оптимум.

Повідомляється, що наночастинки можуть бути залучені до процесів генерації АФК, порушення трансмембранного транспорту йонів, оксидативного пошкодження клітинних структур та пероксидації ліпідів. Вони здатні взаємодіяти з сульфгідрильними та карбоксильними групами, що призводить до функціональних змін протеїнів [209]. Наночастинки оксиду міді (CuO) можуть викликати пошкодження мембран, що було продемонстровано на клітинах *Escherichia coli* [219]. У дослідженнях на рослинах рису виявлено зниження відсотку проростання насіння, підвищення активності АП та вмісту МДА у проростках за обробки наночастинками CuO [220]. З іншого боку, застосування наночастинок Cu у низьких концентраціях можуть стимулювати фотосинтетичну активність [221] та сприяти росту рослин [222].

Негативний вплив на рослинний організм виявлено у багатьох наноматеріалів типу фулеренів і широкорозповсюджених нанорозмірних металів, таких як стрібло (Ag), оксид титану ( $TiO_2$ ), ZnO та оксид церію ( $CeO_2$ ) [223]. Наприклад, за обробки насіння пшениці наночастинками Ag як препарату з антимікробними властивостями виявлено зміни вторинної структури запасних протеїнів, що входять до складу глютену [224]. Дослідження свідчить про збільшення вмісту  $\beta$ -складчастих листів, зниження

співвідношення водень/сірка та зниження розчинності глютену за впливу нано-Ag, проте конформаційні зміни протеїнів можуть бути також пов'язані з впливом цитрату натрію, який використовувався як стабілізатор у розчині наночасток срібла.

Наявні у науковій літературі дані щодо впливу нанорозмірних елементів мінерального живлення на рослинний організм неоднозначні, а відсутність системних досліджень дають можливість для спекуляцій з точки зору позитивного або негативного/токсичного ефекту на ріст та розвиток рослин. Як зазначає Liu та Lal [207], у багатьох дослідженнях фітотоксичності використовуються необґрунтовано високі концентрації наночастинок металів, а отримані за таких умов результати не слід екстраполювати на концентрації оптимального діапазону. Разом з тим, потенційне залучення наночастинок біогенних металів до формування захисних реакцій рослин за умов стресу свідчить про перспективність їх досліджень як адаптогенів до мінливих умов навколишнього середовища та, зокрема, посухи.

Отже, пошук заходів підвищення адаптації пшениці до посухи вважається найважливішою проблемою сьогодення. Над цією проблемою працюють дослідники в усьому світі, розробляючи нові підходи для підвищення врожайності зернових культур за допомогою сучасних методів агро- та селекційних технологій. Адаптивність, тобто здатність протистояти дії факторів навколишнього середовища, що знижують продуктивність і врожай, є однією з основних вимог, яким повинні відповідати перспективні сорти. Зважаючи на те, що продуктивність та врожай визначаються ефектами взаємодії «генотип-середовище» та реалізуються в межах фенотипової пластичності рослин важливим є проведення інтеграційних досліджень фізіологічних реакцій рослинного організму з урахуванням стрес-індукованих змін у перебігу метаболічних процесів. На з'ясування захисних реакцій рослин роду *Triticum* L., що опосередковують стрестолерантність до посухи, зокрема, за характеристиками окисного гомеостазу, вмісту пероксисом та

захисних протеїнів, а також пошуку способів їх корекції з використанням новітніх нанотехнологій, спрямовані наші подальші дослідження.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Матеріал досліджень

У дослідженні використовували рослини пшениці м'якої (*Triticum aestivum* L.) сортів Краєвид, Столична (оригінація – ННЦ "Інститут землеробства НААН"), Магістраль (Приватне сільськогосподарське селекційно-дослідне підприємство "БОР"), Акведук, Астарта, Дарунок Поділля, Золотоколоса, Наталка, Одеська 267, Подолянка, Поліська 90, Смуглянка, Трипільська, Фаворитка (Інститут фізіології рослин і генетики НАН України), Мудрість одеська (Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення), Національна (Національний університет біоресурсів і природокористування України) та пшениці двозернянки (*T. dicocum* Schrank ex Schübl.) сорту Голіковська (Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України). До експерименту в умовах агроценозу залучено сою сорту Аннушка (*Glycine max* (L.) Merr.) та нут сорту Розанна (*Cicer arietinum* L.).

#### 2.2. Підготовка рослинного матеріалу в умовах лабораторного експерименту та моделювання осмотичного стресу

##### 2.2.1. Модельна система осмотичного стресу

Для попередньої оцінки стрестолерантності рослин до посухи проводили визначення ростових параметрів 3-добових етіолованих проростків 10 сортів пшениці видів *T. aestivum* L. та *T. dicocum* Schrank ex Schübl., вирощених на розчинах поліетиленгліколю (ПЕГ) 6000 (Carl Roth, Німеччина) з осмотичним потенціалом -0,1, -0,2, -0,3, -0,4, -0,5, -0,6 та -0,7 МПа. Концентрацію ПЕГ 6000 розраховували згідно Michel та Kaufmann [225]. Для дослідів використовували

25-30 насінин, які розміщували на 2-х листках фільтрувального паперу у чашках Петрі. До кожної чашки Петрі додавали 5 мл розчину ПЕГ 6000, до контрольного варіанту додавали відповідну кількість дистильованої води. Пророщування насіння здійснювали в темряві за температури 21°C впродовж 72 год. Повторність досліду трикратна. Після завершення часу експозиції, чашки Петрі фотографували для вимірювання ростових параметрів, колеоптилі та корені використовували для визначення маси сухої речовини згідно стандартної методики [226]. Обробку зображень здійснювали за допомогою програмного забезпечення ImageJ ([www.imagej.net](http://www.imagej.net)).

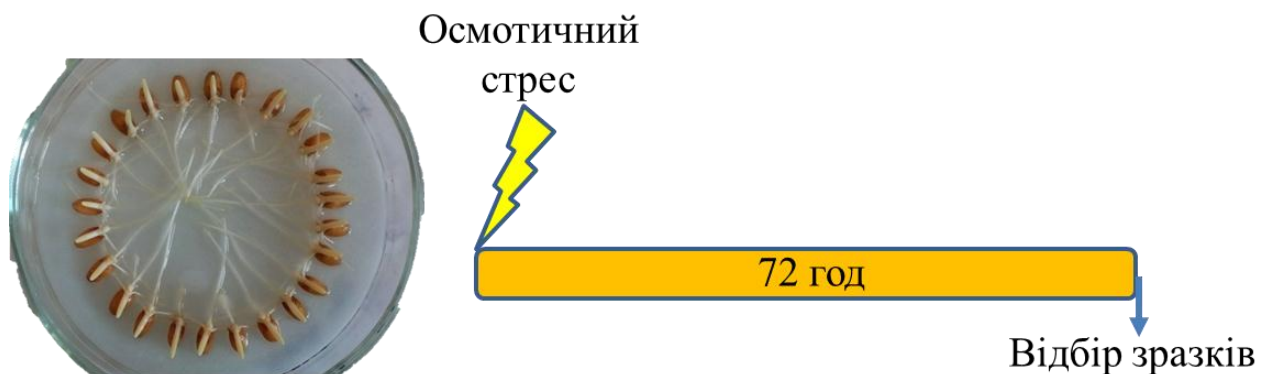


Рис. 2.1. Дизайн модельної системи осмотичного стресу

Індекс посухостійкості (Drought resistance index) визначали за формулою:

$$ІП = \frac{Y_s/Y_n}{\bar{Y}_s/\bar{Y}_n},$$

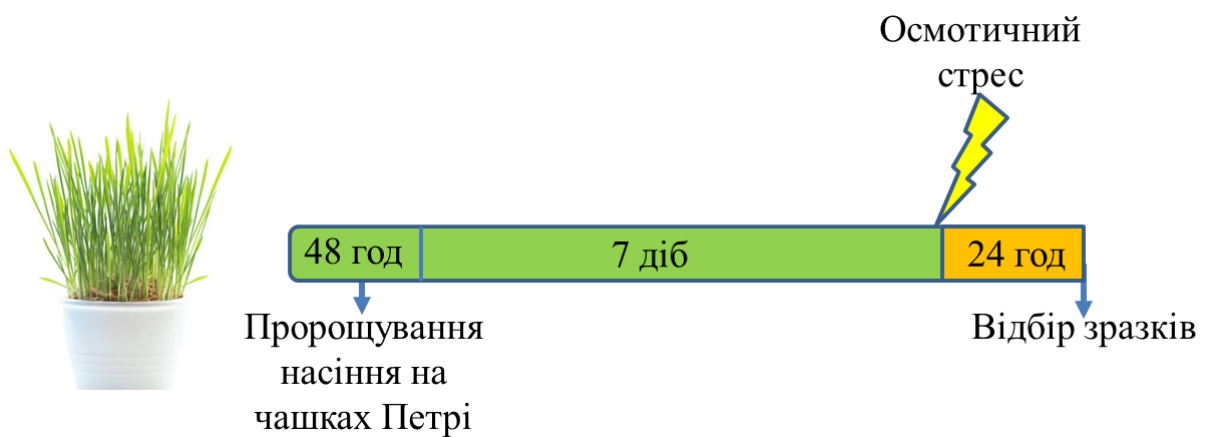
де  $Y_s$  та  $Y_n$  – середня маса колеоптиля однієї рослини певного генотипу за умов стресу та за нормальних умов, відповідно,  $\bar{Y}_s$  та  $\bar{Y}_n$  – середня маса колеоптиля однієї рослини серед усіх генотипів за умов стресу та за нормальних умов, відповідно [227, 228].

### 2.2.2. Умови вирощування рослин в умовах лабораторного експерименту

Насіння пшениці м'якої та пшениці двозернянки обробляли 5% гіпохлоридом натрію впродовж 15 хв, тричі промивали дистильованою водою. Насіння пророщували в темряві на фільтрувальному папері, змоченому

дистильованою водою, у чашках Петрі за температури 21°C. Пророщене насіння переносили в контейнери на поживне середовище Арнона-Хогланда. Короткотривалий осмотичний стрес моделювали у 7-добових проростків пшениці м'якої та пшениці двозернянки шляхом додавання в середовище вирощування ПЕГ 6000, кінцевий вміст якого становив 10% (-0,15 МПа). Тривалість експозиції становила 24 год, після чого здійснювали відбір зразків (Рис. 2.2.(А)).

**А**



**Б**

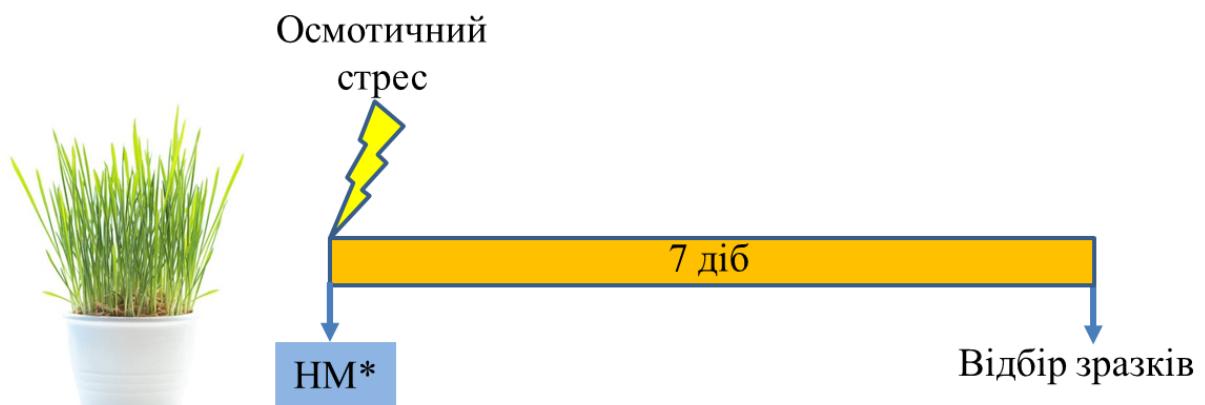


Рис. 2.2. Дизайн експериментального дослідження в лабораторних умовах: А – за умов короткотривалого осмотичного стресу; Б – за умов пролонгованого осмотичного стресу. НМ\* - передпосівна обробка колоїдним розчином суміші наночастинок металів (Cu, Fe, Mn, Zn)

Рослини вирощували за умов 16/8 год фотоперіоду, інтенсивність освітлення 300-400  $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{с}$  та за температурного режиму 22°/18° вдень і вночі, відповідно.

Для дослідження рослин за умов пролонгованого осмотичного стресу насіння пшениці м'якої та двозернянки (в т.ч. насіння з передпосівною обробкою колоїдним розчином наночастинок металів (Див. п. 2.14)) переносили на середовище з осмотичним потенціалом -0,3 МПа (15% ПЕГ), а відбір зразків здійснювали після 7 діб експозиції за даних умов (Рис. 2.2.Б). До контейнерів з контрольним варіантом ПЕГ 6000 не додавали.

### **2.3. Визначення біохімічних показників**

#### **2.3.1. Визначення вмісту перекису водню**

Вміст перекису водню визначали за допомогою методу, описаного Sagisaka [229] з модифікаціями. Наважку рослинного матеріалу (0,2 г) розтирали в 5 мл 1% розчину солі Мора в 0,5М сірчаній кислоті. Гомогенат центрифугували при 8000 об./хв впродовж 5 хв. До 2 мл супернатанту додавали 1 мл 5% розчину сульфосаліцилової кислоти. Вимірювання проводили при 530 нм за допомогою спектрофотометра Shimadzu UV-1500 (Японія). Вміст пероксидів визначали за калібрувальною кривою з використанням розчинів з відомою концентрацією  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

#### **2.3.2. Визначення ТБК-активних продуктів**

Визначення ТБК-активних продуктів проводили згідно Kumar та Knowles [230]. Наважку (0,2 г) рослинного матеріалу гомогенізували у ступці з 3 мл 0,1 М Тріс-НСІ буфером (рН 7.6). До гомогенату додавали 2 мл 20% трихлороцтової кислоти та 1 мл 0,67% тіобарбітурової кислоти. Пробірки з реакційною сумішшю інкубували на киплячій водяній бані впродовж 30 хв та центрифугували при 3 000 об./хв впродовж 10 хв. Оптичну густину розчинів вимірювали при 533 нм відносно контролю, в який замість екстракту додавали

буфер. Вміст ТБК-активних сполук розраховували, використовуючи коефіцієнт молярної екстинції малонового діальдегіду, що складає  $1,55 \cdot 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ .

### **2.3.3. Вміст вільного проліну**

Вміст вільного проліну визначали за допомогою методу, описаного Bates та ін. [231]. Наважку (0,15 г) рослинного матеріалу гомогенізували з 2 мл 3% сульфосаліциловою кислотою, після чого гомогенат центрифугували 10 хв при 8000 об/хв. Реакційну суміш, до складу якої входило 1 мл супернатанту, 1 мл розчину кислого нінгідрину та 1 мл льодяної оцтової кислоти інкубували на киплячій водяній бані впродовж 60 хв. Після охолодження до пробірок додавали 3 мл бензолу, перемішували та залишаємо при кімнатній температурі впродовж 30 хв до розділення двох фаз. Оптичну густину розчинів (бензолова фракція) вимірювали при 520 нм відносно чистого бензолу. Розрахунок вмісту проліну в досліджуваних зразках проводили за калібрувальною кривою.

### **2.3.4. Визначення вмісту фотосинтетичних пігментів**

Витяжку пігментів отримували шляхом розтирання свіжого рослинного матеріалу з додаванням безводного  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , прокаленого кварцевого піску та 3 мл 96% етилового спирту. Отриману суміш відфільтровували. Кількісний вміст пігментів визначали спектрофотометрично на спектрофотометрі Shimadzu UV-1500 (Японія). Оптичну густину розчину спиртової витяжки визначали при  $\lambda$  665 нм (хлорофіл *a*),  $\lambda$  649 нм (хлорофіл *b*) та  $\lambda$  440,5 нм (сума каротиноїдів), розрахунок вмісту пігментів проводили згідно Lichtenthaler та Wellburn [232].

### **2.3.5. Визначення активності антиоксидантних ензимів**

Для визначення активності антиоксидантних ензимів використовували білковий екстракт. Для цього наважку рослинного матеріалу гомогенізували у 0,05 М калій-фосфатному буфері (рН 7,8). Гомогенат центрифугували при

10000 об./хв. впродовж 10 хв при 4°C. Супернатант використовували для визначення активності антиоксидантних ензимів. Вміст протеїну в супернатанті визначали згідно методу, запропонованим Bradford [233]. Вимірювання оптичної густини досліджуваних розчинів здійснювали за допомогою спектрофотометра Shimadzu UV-1500 (Японія).

Загальну активність *супероксиддисмутази* (СОД, КФ 1.15.1.1) визначали за її здатністю інгібувати фотохімічне відновлення нітротетразолію синього згідно методу, описаного Giannopolitis та Ries [234]. Для цього до реакційної суміші, що містила 1 мл 0,154% розчину нітротетразолію синього, 1 мл 5,82% розчину метіоніну та 1 мл 0,0015% розчину рибофлавіну додавали 0,05 мл білкового екстракту. До контрольних пробірок замість екстракту додавали відповідну кількість 0,05 М калій-фосфатного буферу (рН 7,8). Реакцію ініціювали світлом, використовуючи 15 Вт люмінесцентну лампу. Час експозиції становив 15 хв. Абсорбцію вимірювали при 560 нм відносно дублікатів зразків з ідентичною реакційною сумішшю, що були витримані у темряві.

Загальну активність *каталази* (КАТ, КФ 1.11.1.6) визначали за швидкістю розщеплення перекису водню у реакційній суміші згідно Аєбі [235]. Для цього 0,09 мл супернатанту додавали до 2,9 мл 0,05 М калій-фосфатного буферу (рН 7,0). Реакцію запускали додаванням перекису водню та вимірювали оптичну густину при  $\lambda=240$  нм впродовж 60 с. Вимірювання проводили відносно контролю, що містив всі компоненти реакційної суміші за винятком перекису водню. Для розрахунку активності КАТ використовували коефіцієнт молярної екстинкції  $\text{H}_2\text{O}_2$ , що становить  $39,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

Загальну активність *аскорбатпероксидази* (АПО, КФ 1.11.1.11) визначали за зниженням абсорбції при 290 нм впродовж 60 с, що зумовлено окисненням аскорбату [236]. Для цього 0,05 мл супернатанту додавали до 2,8 мл 0,05 М калій-фосфатного буферу (рН 7,0), що містив 0,05 мл 0,017 М розчину аскорбінової кислоти та 0,1 мл 0,005 М розчину ЕДТА. Реакцію запускали додаванням перекису водню, вимірювання проводили відносно контролю, що

містив всі компоненти реакційної суміші за винятком перекису водню. Для розрахунку активності АПО використовували коефіцієнт молярної екстинкції відновленої форми аскорбату, що становить  $2,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

Загальну активність *гваяколпероксидази* (ГПО, КФ 1.11.1.7) визначали за швидкістю утворення забарвленого продукту реакції окиснення гваяколу в результаті дії ензиму в присутності перекису водню [237]. Для цього 0,01 мл білкового екстракту додавали до 2,3 мл 0,05М калій-фосфатного буферу (рН 7,0), що містив 0,6 мл 1% гваяколу. Реакцію ініціювали додаванням перекису водню. Вимірювання проводили при 470 нм впродовж 60 с відносно контрольної кювети з реакційною сумішшю без вперекису водню. Для розрахунку активності ГПО використовували коефіцієнт молярної екстинкції продукту реакції тетрагваяколу, що становить  $26,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

### **2.3.6. Визначення вмісту пероксисом**

Визначення вмісту пероксисом у загальному білковому екстракті здійснювали згідно Fahy та ін. [133]. Екстракт отримували шляхом додавання до гомогенізованого у рідкому азоті рослинного матеріалу 0,05 М Tris-HCl буферу (рН 8,0), що містив 0,5 М NaCl, 8 М сечовину. Зразки центрифугували впродовж 10 хв при 14 000 rpm при кімнатній температурі. До 96-лункових планшетів додавали 0,01 мл супернатанту та 0,19 мл 2 мкМ розчину N-BODIPY (Nitro-4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene), після чого інкубували впродовж 10 хв. Використовували свіжоприготований розчин N-BODIPY з 0,01 М стокового розчину у диметилсульфоксиді.

Інтенсивність флуоресценції вимірювали при довжині хвилі збудження 490 нм та довжині хвилі випромінювання 530 нм за допомогою спектрофлуориметра Synergy Neo B (Biotek Instrument, Inc., США). Фоновий сигнал визначали шляхом вимірювання флуоресценції розчину N-BODIPY з 0,01 мл екстракційного буферу та 0,01 мл білкового екстракту у 0,19 мл води. Обидва значення віднімали від значення у досліджуваних зразках. Значення флуоресценції нормалізували відносно вмісту протеїну. Вміст протеїну в

екстракті визначали методом Бредфорда за калібрувальною кривою, побудованою з використанням відомих концентрацій бичого сироваткового альбуміну. Інтенсивність флуоресценції виражали в у.о/1 мг протеїну. Вимірювання кожного зразка проводили в трьох біологічних та аналітичних повторностях.

### **2.3.7. Визначення активності ізоформ хітиназ та $\beta$ -1,3-глюканаз**

Для визначення активності ізоформ хітиназ (КФ 3.2.1.14) та  $\beta$ -1,3-глюканаз (КФ 3.2.1.39), а також аналізу електрофоретичного спектру дегідринів використовували сорти пшениці м'якої сорту Фаворитка і Трипільська та пшеницю двозернянку сорту Голиковська. Насіння стерилізували 5% розчином гіпохлориду натрію впродовж 15 хвилин, після чого промивали дистильованою автоклавованою водою. Насіння пророщували в контейнерах в темряві за температури 21°C впродовж 48 год. Проростки висаджували в контейнери з 25% розчином поживного середовища Арнона-Хогланда. 7-добові проростки піддавали дії стресу шляхом внесення до середовища вирощування поліетиленгліколю 6000 (ПЕГ) до кінцевої концентрації 10%, тривалість експозиції становила 24 год. Контролем слугували рослини, вирощені на середовищі Арнона-Хогланда без додавання ПЕГ.

Ізоформи хітиназ і  $\beta$ -1,3- глюканаз визначали з екстракту листків рослин пшениці м'якої та пшениці двозернянки. Для отримання екстракту 0,2 г листків заморожували рідким азотом та гомогенізували в 0,1 М натрій-ацетатному буфері (рН 5,0), що містив 1 мМ ФМСФ. Гомогенат центрифугували при 10 000 об./хв. впродовж 10 хв при 4°C. Отриманий супернатант зберігали при -80°C та використовували для визначення вмісту протеїну за методом Бредфорда [233] та електрофорезу.

**Визначення активності ізоформ хітиназ.** Електрофоретичне розділення білків проводили у 12,5% поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію (ДСН) [238] та 0,01% глікольхітину, як субстрату

ензиму. Глікольхитин був отриманий шляхом ацетилювання глікольхітозану, як описано Trudel та Asselin [239]. Після електрофорезу білки було ренатуровано шляхом відмивання гелю в 0,05М натрій-ацетатному буфері (рН 5,0), що містив 1% Тритон Х-100, впродовж ночі. Активність ізоформ хітиназ визначали за допомогою освітлення гелів після їх інкубації в 0,01% розчині флуоресцентного барвника Fluorescent Brightener 28 (Sigma, США). Гелі фотографували та зафарбовували за допомогою барвника Coomassie Brilliant Blue R250. Молекулярну масу індивідуальних ізоформ визначали відповідно до розділення маркеру молекулярної маси (peqGOLD Protein Marker III 'Prestained', VWR Chemicals) шляхом вимірювання дистанції міграції білкових смуг. Цифрові зображення гелів отримували за допомогою системи гел-документації (Major Science, США) та аналізували за допомогою програмного забезпечення ImageJ ([www.imagej.net](http://www.imagej.net)).

**Визначення активності  $\beta$ -1,3-глюканаз.** Електрофоретичне розділення білків проводили у 12,5% поліакриламідному гелі в присутності ДСН [238] та 0,5% ламінарину з *Laminaria digitata*, як субстрату ензиму. Після електрофорезу білки ренатурували шляхом відмивання гелів у 0,05М натрій-ацетатному буфері (рН 5,0), що містив Тритон Х-100, впродовж 1 год. Візуалізацію 1,3- $\beta$ -глюканаз здійснювали кип'ятінням гелів у 1М розчині гідроксиду натрію з 0,1% 2,3,5-трифенілтетразолію хлоридом (Sigma, США) згідно протоколу, як описано Pan та ін. [240]. Після визначення активності ензимів гелі фарбували Coomassie Brilliant Blue R250. Аналіз отриманих електрофореграм проводили згідно процедури, описаної для хітиназ.

### **2.3.8. Визначення вмісту дегідринів**

Виділення дегідринів здійснювали шляхом гомогенізації рослинного матеріалу з 0,7 мл екстракційного буферу, що містив 28 мМ дітіотреїтол, 28 мМ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 175 мМ сахарозу, 5 % ДСН та 10 мМ ЕДТА, з подальшою інкубацією при 70°C впродовж 30 хв. Гомогенат центрифугували при 19148 g впродовж 10 хв. Супернатант використовували для електрофоретичного

розділення протеїнів за класичною методикою [238], вміст загального протеїну в супернатанті визначали за методом Bradford [233].

Гелі з розділеними протеїнами використовували для вестерн блотингу, використовуючи прилад Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, USA). Трансфер протеїнів на нітроцелюлозну мембрану проводили з використанням буферу, рекомендованого виробником приладу (25 мМ Тріс, 192 мМ гліцин, 20% метанол, ДСН, 0,01% Tween 20, рН 8,3), при 25В впродовж 60 хв. Після інкубації нітроцелюлозної мембрани в блокуючому розчині (5% розчин сухого знежиреного молока в TBST-буфері), здійснювали гібридизацію досліджуваних протеїнів з первинними антитілами (Anti-Dehydrin rabbit antibody, Agrisera, Швеція) у розведенні 1:3000 впродовж 120 хв. Детекцію дегідринів проводили шляхом інкубації мембран у розчині NBT/BCIP Stock Solution (Roche Diagnostics, Німеччина) після їх обробки вторинними антитілами (Anti-Rabbit IgG-Alkaline Phosphatase antibody, Sigma, США) у розведенні 1:30000 впродовж 60 хв.

#### **2.4. Умови проведення вегетаційного дослідю**

До вегетаційного дослідю було залучено м'яку пшеницю сортів Астарта, Одеська 267, Подолянка, Наталка, Поліська 90 та Дарунок Поділля. Рослини вирощували у вегетаційних посудинах ємністю 10 кг. Посуху створювали у фазу цвітіння рослин шляхом припинення поливу до зниження рівня вологості ґрунту 30%. Тривалість експозиції рослин за умов посухи становила 7 діб, після чого відновлювали водопостачання до рівня контролю (60-70% від повної вологоємності ґрунту). Рослинний матеріал відбирали на 7 добу для визначення вмісту АФК, активності антиоксидантних ензимів та вмісту пероксисом (рис.2.3). Всі вимірювання проводили у прапорцевих листках.

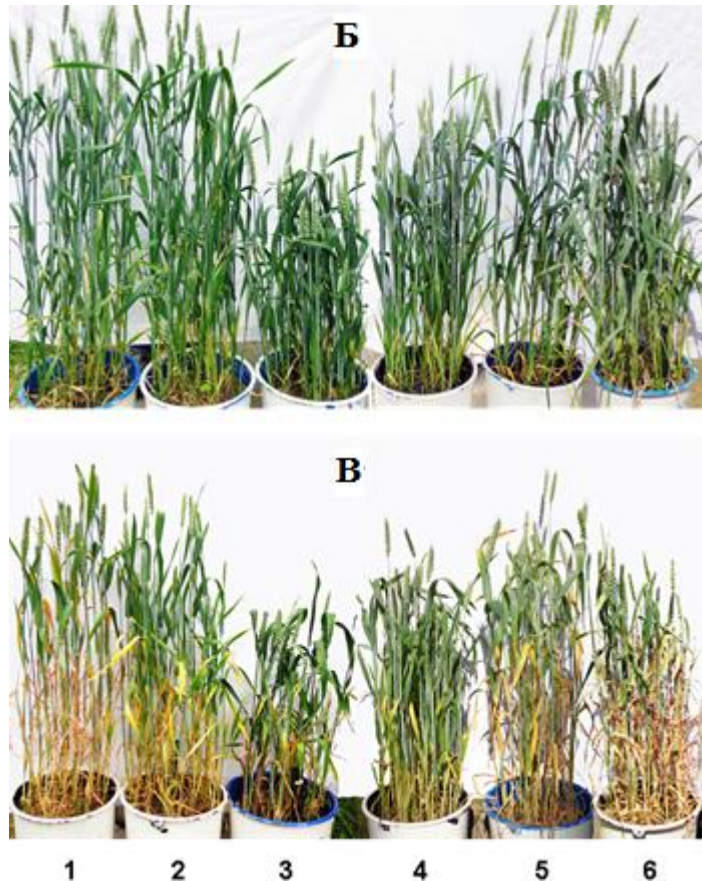
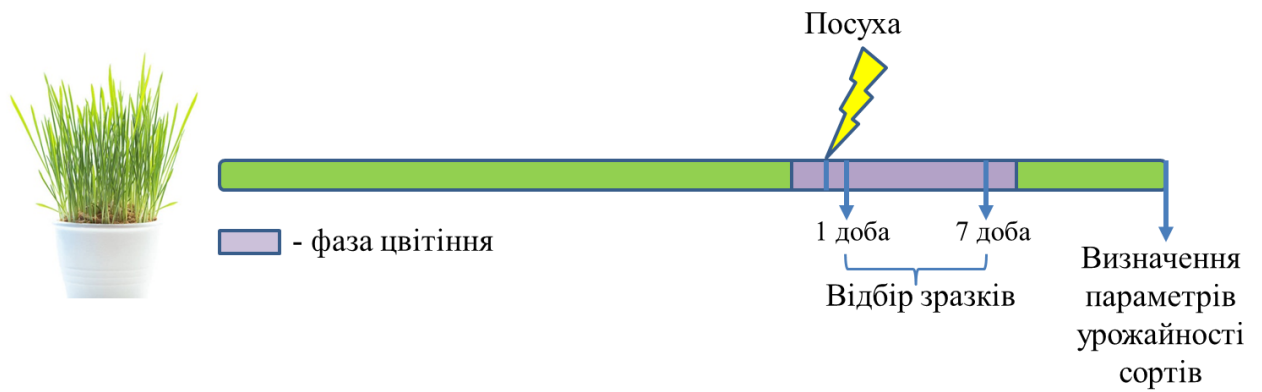


Рис. 2.3. Дизайн експериментального дослідження (А) за умов вегетаційного дослідження та зовнішній вигляд сортів пшениці м'якої за оптимальних умов (Б) та за умов посухи (В). 1 – Наталка; 2 – Подолянка; 3 – Астарта; 4 – Одеська 267; 5 – Поліська 90; 6 – Дарунок Поділля.

## 2.5. Умови проведення польових досліджень

Пшеницю м'яку сорту Національна вирощували у полях 10-пільної сівозміни на території с. Пшеничне Васильківського району Київської області.

Ґрунт дослідної ділянки представлений чорноземом типовим малогумусовим грубопилувато-суглинковим. Глибина залягання ґрунтових вод – 2,0-4,0 м. питома маса твердої фази ґрунту – 2,68 г/см<sup>2</sup>, щільність у рівноважному стані – 1,15-1,25 г/см<sup>2</sup>, вологість стійкого в'янення – 10,8%, вміст гумусу – в шарі 0-20 см – 4,60%, 25-50 см – 4,22%, рН сольової витяжки – 6,9-7,1; ємність поглинання – 30,3-31,4 мг/екв на 100 г ґрунту; обмінного калію – 9,1-11,1 мг на 100 г ґрунту. Культура-попередник – горох. Площа облікової ділянки становила 24 м<sup>2</sup>, повторність досліду дворазова. Облік структури врожаю та посівні якості насіння визначали за методиками ДСТУ 4138-2002.

Рослини сої сорту Аннушка та нуту сорту Розанна вирощували в польовій зернопросапній сівозміні кафедри рослинництва та кормовиробництва ВП „Агрономічна дослідна станція” Національного університету біоресурсів і природокористування України на чорноземах типових середньо суглинкових з вмістом гумусу в орному шарі ґрунту 4,38–4,53%, рН сольової витяжки 6,9–7,3, вміст азоту – 0,27–0,31%, фосфору – 0,15–0,25%, калію – 2,3–2,5%. Аналіз рослин проводили на стадії трьох справжніх листків.

## 2.6. Обробка розчинами наночастинок металів

Колоїдні розчини наночастинок металів, використані в дослідженнях, розроблені кафедрою технології конструкційних матеріалів і матеріалознавства НУБіП України й отримані шляхом диспергування гранул відповідних металів імпульсами електричного струму амплітудою 100 – 2000 А у воді [241]. Дослідження фітотоксичності розчинів наночастинок металів вивчали за допомогою стандартної тест-системи *Allium cepa* (L.) [242] шляхом культивування 10 каліброваних за масою цибулин сорту Халцедон впродовж 4 діб на розчинах наночастинок Ag, Cu, Fe, Mn, Zn, отриманих внаслідок розведення маточних колоїдів в 100 разів. Характеристика маточних колоїдних розчинів наночастинок металів наведена в Таблиці 1.

Таблиця 2.1

## Характеристика колоїдного розчину наночастинок металів

| Метал | Концентрація мг/л | Середній діаметр, нм | Фазовий склад   |
|-------|-------------------|----------------------|---|
| Ag    | 150               | 30-50                | Ag, Ag <sub>2</sub> O   |
| Cu    | 200               | 100-150              | Cu, CuO, Cu <sub>2</sub> O  |
| Fe    | 300               | 20-30                | Fe, Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> |
| Zn    | 150               | 30-50                | Zn, ZnO   |
| Mn    | 150               | 20-30                | Mn, Mn <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , Mn <sub>2</sub> O <sub>7</sub> |

Для передпосівної обробки насіння пшениці м'якої та пшениці двозернянки за умов лабораторного експерименту використовували колоїдний розчин суміші наночастинок біогенних металів (Cu, Fe, Mn, Zn). Для цього попередньо стерилізоване 5% розчином гіпохлориду натрію насіння досліджуваних культур замочували у свіжоприготовленому розчині наночастинок металів у концентрації 2 мг/л. Обробку насіння пшениці м'якої бінарною композицією наноколоїдів з використанням розчинів наночастинок металів Cu, Zn здійснювали аналогічно процедурі, описаній вище. У дослідженнях за умов агроценозу передпосівна обробка розчином суміші нанорозмірних частинок металів здійснювалась за нормою 0,2 л/т. Контролем слугували рослини, вирощені з насіння обробленого водою з нормою 10 л/т.

Обробку насіння та рослин сої колоїдним розчином суміші наночастинок металу проводили за наступною схемою: 1 - контроль, обробка водою; 2 - обробка передпосівна обробка насіння розчином наночастинок у концентрації 120 мг/л; 3 – передпосівна обробка насіння розчином наночастинок у концентрації 240 мг/л; 4 – передпосівна обробка насіння в поєднанні з фоліарною (шляхом розпилення на стадії бутонізації) розчином наночастинок металів у концентрації 120 мг/л.

Передпосівна обробка насіння нуту здійснювалась колоїдним розчином наночастинок молібдену (1 літр на тонну робочого розчину насіння, виміряна концентрація металу 0,8 мг / г) та мікробіологічним препаратом Ризобофітом (вміст бульбочкових бактерій роду *Rhizobium* 6,7 млрд в 1 мл). Обробку

проводили за наступною схемою: 1 - контроль, обробка водою; 2 – передпосівна обробка насіння нуту наночастками молібдену; 3 - передпосівна обробка мікробіологічним препаратом Ризобофітом; 4 – передпосівна обробка наночастками молібдену та мікробіологічним препаратом Ризобофітом.

## **2.7. Статистичний аналіз отриманих результатів**

Статистичний аналіз даних проводили за допомогою програм Microsoft Excel та Statistica 8.0. Для порівняння вибірок підраховували середнє арифметичне (M) та стандартну помилку від середнього (SEM). Достовірність різниці між порівнюваними групами оцінювали за допомогою критерію Дункана. Статистично значущою для всіх показників вважали різницю  $p < 0,05$ . Оцінку сили взаємозв'язку між окремими показниками здійснювали за коефіцієнтом лінійної кореляції Пірсона (r). Кореляцію вважали сильною при  $|r| > 0,5$ ; помірною – при  $|r| = 0,3-0,5$ ; слабкою – при  $|r| = 0,1-0,3$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

### РОЗДІЛ 3

#### СКРИНІНГ СОРТІВ НА СТРЕТОЛЕРАНТНІСТЬ ДО ПОСУХИ В УМОВАХ МОДЕЛЬНОЇ СИСТЕМИ ОСМОТИЧНОГО СТРЕСУ

Насіння більшості видів рослин характеризується високою стійкістю до екстремальних умов навколишнього середовища, тоді як проростання є найбільш чутливим етапом онтогенезу рослин [243–245]. У фазу проростання особливо важливою є доступність води, оскільки саме вода виступає тригером проростання [246]. Завдяки унікальним хімічним та фізичним властивостям вода створює середовище протікання всіх метаболічних процесів та забезпечує зв'язок між окремими структурами клітин, тканин та органів. Вміст води у дозрілому насінні рослин значно варіює, внаслідок чого розрізняють насіння ортодоксального та рекальцитрантного типу, оводненість яких становить близько 10% та 65%, відповідно. У насінні пшениці, що відносять до ортодоксального типу, активація процесів гліколізу, циклу Кребса та амінокислотного метаболізму відбувається за умов досягнення 18-20 % вологості внаслідок набухання. За умов досягнення оводненості на рівні 45 % активуються процеси транскрипції та гідролізу запасних речовин [246]. Обмежений доступ до водних ресурсів призводить до зниження відсотку та швидкості проростання насіння, а також до пригнічення подальшого розвитку рослин [11]. Першим фізіологічним розладом за таких умов є зменшення абсорбції води насінням, що призводить до ряду метаболічних змін, включаючи інгібування гідролітичних процесів та обмеження мобілізації запасних речовин [243]. Вважається, що здатність швидко абсорбувати воду на початку процесу проростання характерна для сортів з вищою толерантністю до умов посухи, що надалі забезпечує стабільну швидкість росту навіть за високого осмотичного стресу [247]. І навпаки, сорти, які менш ефективно

використовують воду під час проростання, більш чутливі до осмотичного стресу та токсичної дії йонів NaCl [247]. Генетично детерміновані адаптивні стратегії, що забезпечують проростання та розвиток рослин на ранніх етапах, є визначальними для успішного становлення популяції рослин [243]. Численні дослідження свідчать, що сучасні сорти пшениці м'якої є значно чутливішими до посухи, ніж предкові види, що дозволяє розглядати останні у перспективі їх використання як донорів генів сільськогосподарсько цінних ознак [248]. Зокрема, пшениця двозернянка характеризується високою пластичністю щодо умов вирощування, а також демонструє високий потенціал для отримання високоякісного врожаю, оскільки насіння цієї культури містить високий вміст протеїну та клейковини [32].

З огляду на вищезазначене, здійснено порівняльний аналіз ростових процесів 9 сортів пшениці м'якої (*T. aestivum* L.), а саме Краєвид, Столична, Магістраль, Золотоколоса, Подолянка, Смуглянка, Трипільська, Фаворитка, Мудрість одеська, та пшениці двозернянки (*T. dicoccum*) сорту Голіковська за умов осмотичного стресу. Дослідження проводили шляхом вимірювання морфометричних параметрів 3-добових проростків, вирощених на розчинах ПЕГ 6000 з осмотичним потенціалом від -0,1 до -0,7 МПа.

Модельна система осмотичного стресу з використанням ПЕГ 6000, як компоненту поживного середовища, була обрана нами, оскільки дозволяє підтримувати стандартний водний потенціал в середовищі, в якому знаходяться корені, на відміну, наприклад, від піщаної культури. ПЕГ 6000 є інертною сполукою з високою молекулярною масою, що перешкоджає поглинанню цієї речовини рослиною [249]. Такі властивості надають перевагу ПЕГ порівняно з іншими сполуками – компонентами систем осмотичного стресу, такими як манітол та NaCl. Манітол є природною сполукою, що синтезується в рослинному організмі та поглинається кореневою системою [250], в результаті чого може створювати артефакти при вивченні осмотичного стресу. У дослідженнях Almansouri та ін. [245] продемонстровано також токсичний ефект йонів NaCl при пророщуванні насіння пшениці твердої, тоді

як застосування ПЕГ асоціювалося лише з пригніченням поглинання води рослиною. У науковій літературі представлено досить багато модифікацій систем осмотичного стресу на основі ПЕГ. Наприклад, Hura та ін. [251] запропоновано метод скринінгу сортів за посухостійкістю шляхом експонування 9-ти добових проростків на ПЕГ-вмісному середовищі з осмотичним потенціалом  $-1,5$  МПа (близько 37% ПЕГ 6000) впродовж 72 год. Така модель дозволяє виявити фізіолого-біохімічні зміни рослин, обумовлені осмотичним стресом, проте потенційна кількість сортів, які можна дослідити одночасно, є незначною. Запропонована нами модельна система осмотичного стресу дозволяє здійснити морфологічне фенотипування великої кількості сортів на ранніх етапах проростання, а також порівняти фізіологічну реакцію рослин залежно від ступеню стресового навантаження.

За умов пророщування насіння на середовищі з від'ємним осмотичним потенціалом ми спостерігали залежне від концентрації ПЕГ зменшення довжини колеоптилів всіх досліджуваних сортів (рис. 3.1А). Встановлено, що за осмотичного потенціалу в середовищі  $-0,3$  МПа довжина колеоптиля зменшувалась на 50% порівняно з контролем (рис. 3.2А), а за  $-0,5$  МПа розвиток рослин значно пригнічувався [252]. Отримані результати узгоджуються з дослідженнями Faisal та ін. [253], в якому було продемонстровано, що за умов експозиції за  $-0,5$  МПа та  $-0,75$  МПа рослини здатні розвиватися (згідно спостережень впродовж двох тижнів), хоча й зі значним пригніченням росту. Автори також зазначають, що повне інгібування проростання насіння пшениці відбувалося на середовищі з  $-1,0$  МПа. У дослідженнях з використанням рослин гірчиці сарептської (*Brassica juncea* (L.) Czern.) повне пригнічення проростання насіння також спостерігали за  $-1,0$  МПа [243].

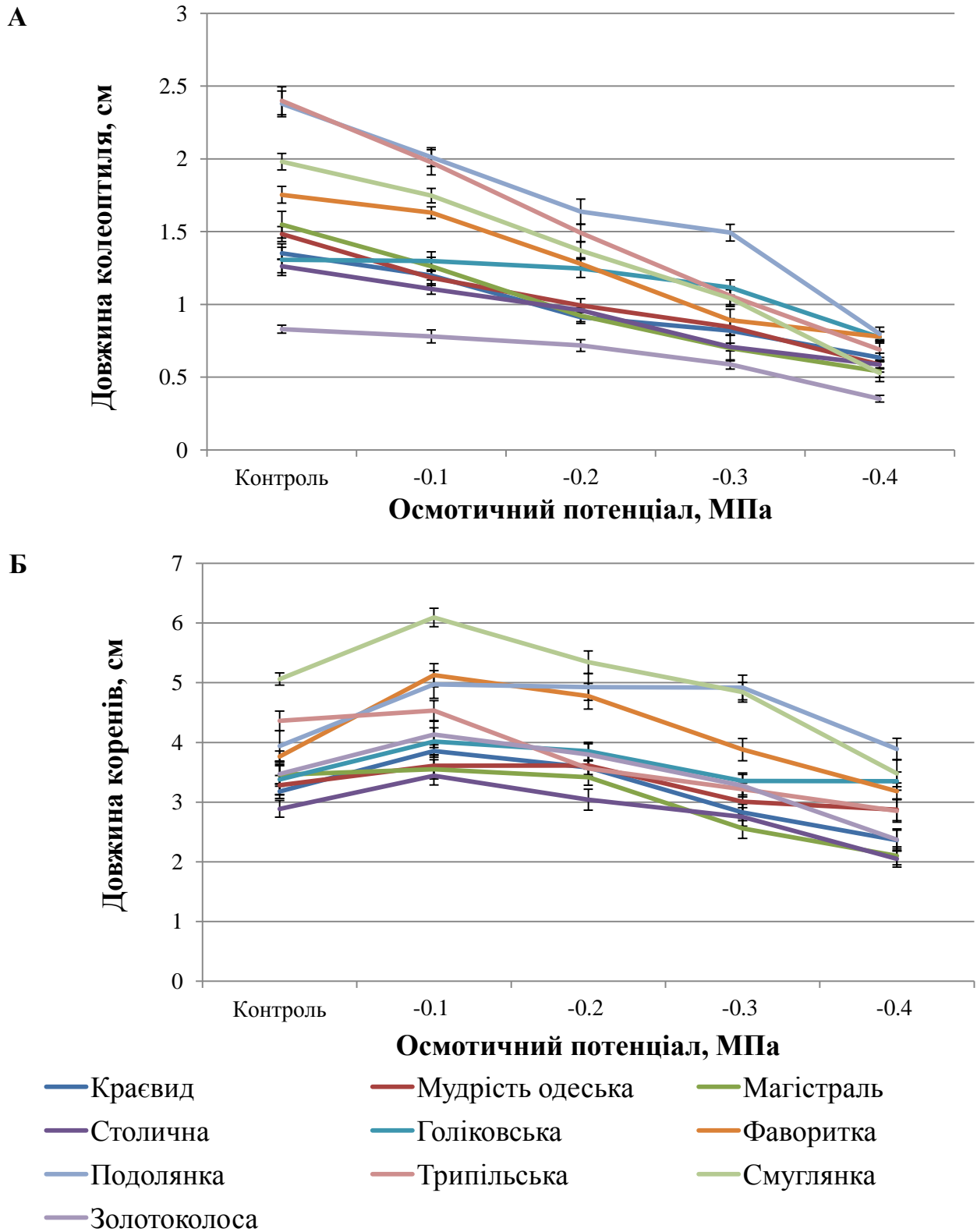


Рис. 3.1. Довжина колеоптилів (А) та коренів (Б) пшениці м'якої та двозернянки, пророщених на середовищах з різним осмотичним потенціалом. Контролем слугували рослини, пророщені на дистильованій воді.  $M \pm SEM$

За помірного осмотичного стресу досліджувані сорти проявляли відмінну ростову реакцію коренів. Так, наприклад, сорти Фаворитка, Подолянка, Смуглянка характеризувалися збільшенням довжини коренів порівняно з контролем, в той час, як у сортів Трипільська та Магістраль змін довжини коренів не спостерігали (рис. 3.2Б).

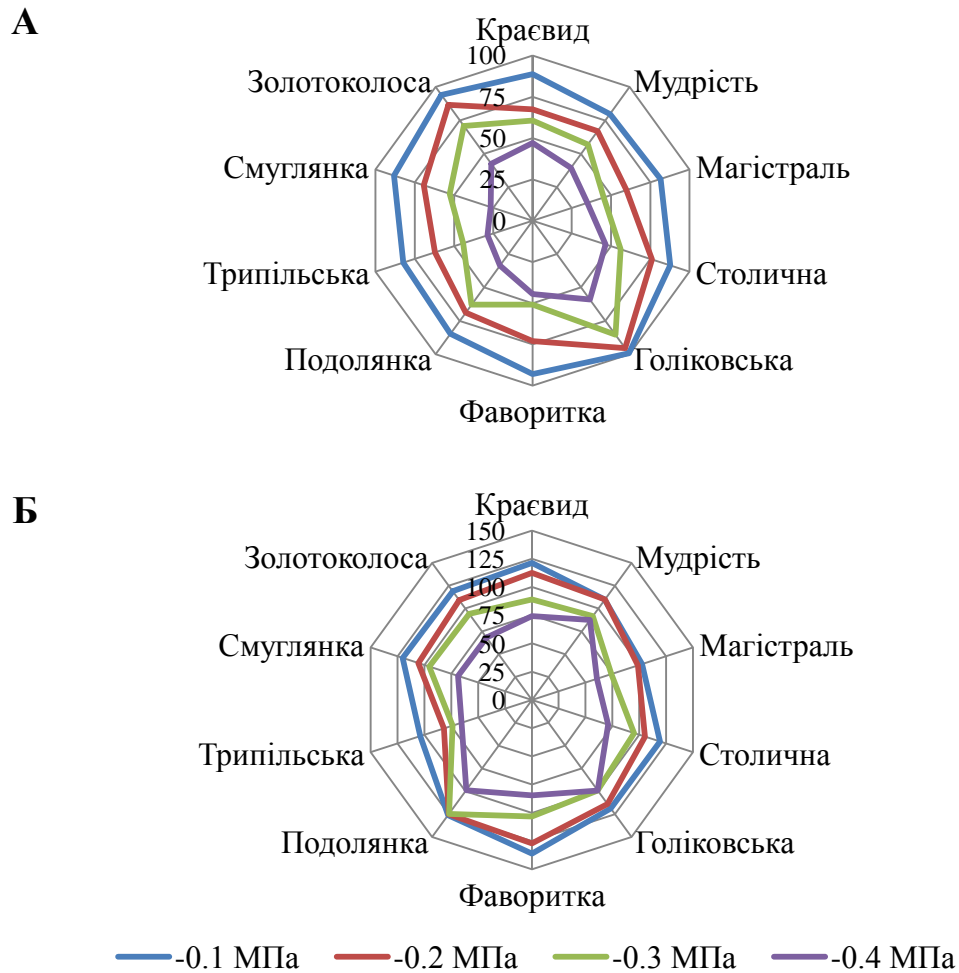


Рис. 3.2. Довжина колеоптилів (А) та коренів (Б) рослин пшениці м'якої та двозернянки, пророщених на середовищах з різним осмотичним потенціалом (у % від контролю). Контролем слугували рослини, пророщенні на дистильованій воді.  $M \pm SEM$

Значення довжин коренів усіх досліджуваних сортів за умов вирощування на середовищі з осмотичним потенціалом -0,3 МПа були близькі до контролю.

Подібний ефект було виявлено у дослідженні рослин гірчиці Тоосі та ін. [243], де пригнічення росту кореня спостерігали за  $-0,4$  МПа і нижче.

На основі фенотипування ростових реакцій та скринінгу осмотичного потенціалу ПЕГ-модельованої системи відібрано середовище з осмотичним потенціалом  $-0,3$  МПа (15% ПЕГ 6000), як таке, що викликає в рослинному організмі метаболічні зміни, спрямовані на формування захисних реакцій рослин до дефіциту води, а не деградаційні процеси.

Згідно розрахунків індексу посухостійкості (ІП) найбільш сприйнятливими до посухи виявилися сорти Трипільська та Золотоколоса (рис. 3.3). У сортів Подолянка, Фаворитка, Магістраль та Краєвид спостерігали зменшення біомаси рослин на рівні середньостатистичного значення серед усіх досліджуваних генотипів. Сорт Голіковська характеризувався найвищим значенням ІП, що відображає значно менший вплив осмотичного стресу на процес накопичення біомаси рослин пшениці двозернянки порівняно з сортами пшениці м'якої. Високий ІП сорту Голіковська також може бути результатом менших втрат води за умов стресу, ймовірно, за рахунок ефективної осморегуляції.

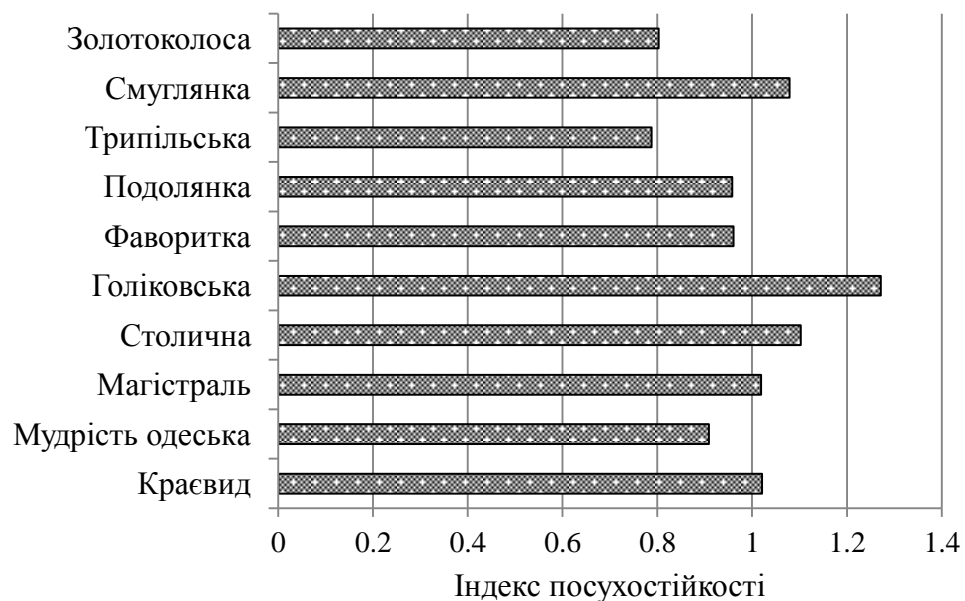


Рис. 3.3. Індекс посухостійкості досліджуваних сортів за умов вирощування в середовищі з осмотичним потенціалом  $-0,3$  МПа

За результатами аналізу отриманих даних сорти Фаворитка та Трипільська було відібрано як толерантний та чутливий, відповідно, до дії посухи, а пшеницю двозернянку сорту Голіковська виділено як злакову культуру, що характеризується високою толерантністю до посухи [252]. Виявлення специфічних захисних реакцій, що забезпечують здатність проростати та розвиватися за умов осмотичного стресу, може бути передумовою для використання пшениці двозернянки як потенційного донора для поліпшення генетичного різноманіття пшениці м'якої та надання корисних адаптаційних ознак [254].

### **Висновки до розділу:**

1. За допомогою модельної системи осмотичного стресу проведено скринінг сортів пшениці м'якої та пшениці двозернянки, що дозволило ранжувати їх за ступенем толерантності до посухи.
2. На основі фенотипування ростових реакцій сорти Фаворитка та Трипільська було відібрано як толерантний та чутливий, відповідно, до дії посухи, а пшеницю двозернянку сорту Голіковська виділено як злакову культуру, що характеризується високою толерантністю до посухи.
3. Згідно скринінгу осмотичного потенціалу ПЕГ-модельованої системи відібрано середовище з осмотичним потенціалом  $-0,3$  МПа, як таке, що викликає в рослинному організмі метаболічні зміни, спрямовані на формування захисних реакцій рослин до дефіциту води, а не деградаційні процеси.

## РОЗДІЛ 4

### СТАН АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ НА РАННІХ ЕТАПАХ РОЗВИТКУ РОСЛИН ЗА УМОВ ПЕГ-МОДЕЛЬОВАНОГО ОСМОТИЧНОГО СТРЕСУ

Запасні речовини, що містяться в насінні, забезпечують розвиток проростків на ранніх етапах розвитку до моменту повноцінного запуску роботи фотосинтетичного апарату рослин. Проростки є надзвичайно чутливими до впливів факторів довкілля, а швидкість адаптації метаболітичних шляхів та ефективність розподілу поживних речовин за умов стресу визначають успішність їх виживання. Відомо, що осмотичний стрес, спричинений посухою, засоленням або забрудненням важкими металами, часто супроводжується надмірним утворенням АФК та розвитком окиснювального стресу [44, 50, 67]. За цих умов важливою є збалансованість функціонування всіх компонентів складної системи антиоксидантного захисту. Незважаючи на багаторічні дослідження науковців з усього світу, механізми адаптації рослин на ранніх етапах розвитку далеко від повного розуміння. Проблема вивчення антиоксидантної системи полягає в тому, що вона є динамічною та миттєво реагує на будь-які як внутрішні, так і зовнішні впливи. Комплексні дослідження з урахуванням стану різних систем захисту можуть дати пояснення щодо формування адаптаційних реакцій рослинного організму за мінливих умов навколишнього середовища.

#### **4.1. Вплив короткотривалого осмотичного стресу на фізіологічний стан рослин**

Чергування короткотривалих періодів посухи з періодами достатнього водозабезпечення є звичайним явищем в умовах агроценозу, що нині загострилося у зв'язку із глобальними змінами клімату. Метаболітичні зміни,

що відбуваються у молодому рослинному організмі у фазу ювенільного розвитку за таких умов, можуть свідчити про ступінь толерантності рослин до посухи. Для оцінки фізіолого-біохімічного стану пшениці м'якої та пшениці двозернянки за умов помірного осмотичного стресу 7-добові проростки сортів Фаворитка, Трипільська та Голіковська висаджували на поживне середовище, що містило 10% розчин ПЕГ (близько  $-0,15$  МПа). Тривалість експозиції становила 24 год.

Оцінка фізіологічного стану проростків за умов короткотривалого осмотичного стресу свідчить про розвиток окиснювальних процесів у сорту Трипільська, у листках якого спостерігали підвищення вмісту ТБК-активних продуктів на 16% (рис. 4.1А). У сортів Фаворитка та Голіковська змін за цим параметром не виявлено.

Накопичення вільного проліну є частиною загального механізму адаптації рослин до посухи [3], оскільки ця імінокислота не лише перешкоджає надмірній втраті води завдяки високій осмотичній активності, але може виконувати роль шаперону, забезпечуючи підтримку нативної структури ензимів, в т.ч. антиоксидантних [255]. За умов помірного осмотичного стресу підвищення вмісту проліну спостерігали у сортів пшениці м'якої Трипільська та Фаворитка на 28 та 33%, відповідно (рис. 4.1Б). У сорту Трипільська спостерігали також зниження відносного вмісту води на 12%, тоді як у сортів Фаворитка та Голіковська оводненість листків була на рівні контролю.

Згідно аналізу отриманих результатів, достовірних змін за досліджуваними параметрами у проростків пшениці двозернянки сорту Голіковська за умов короткотривалої експозиції на середовищі з від'ємним осмотичним потенціалом не виявлено. Це може свідчити про залучення механізмів, здатних попереджати розвиток стресу за умов короткотривалого дефіциту води.

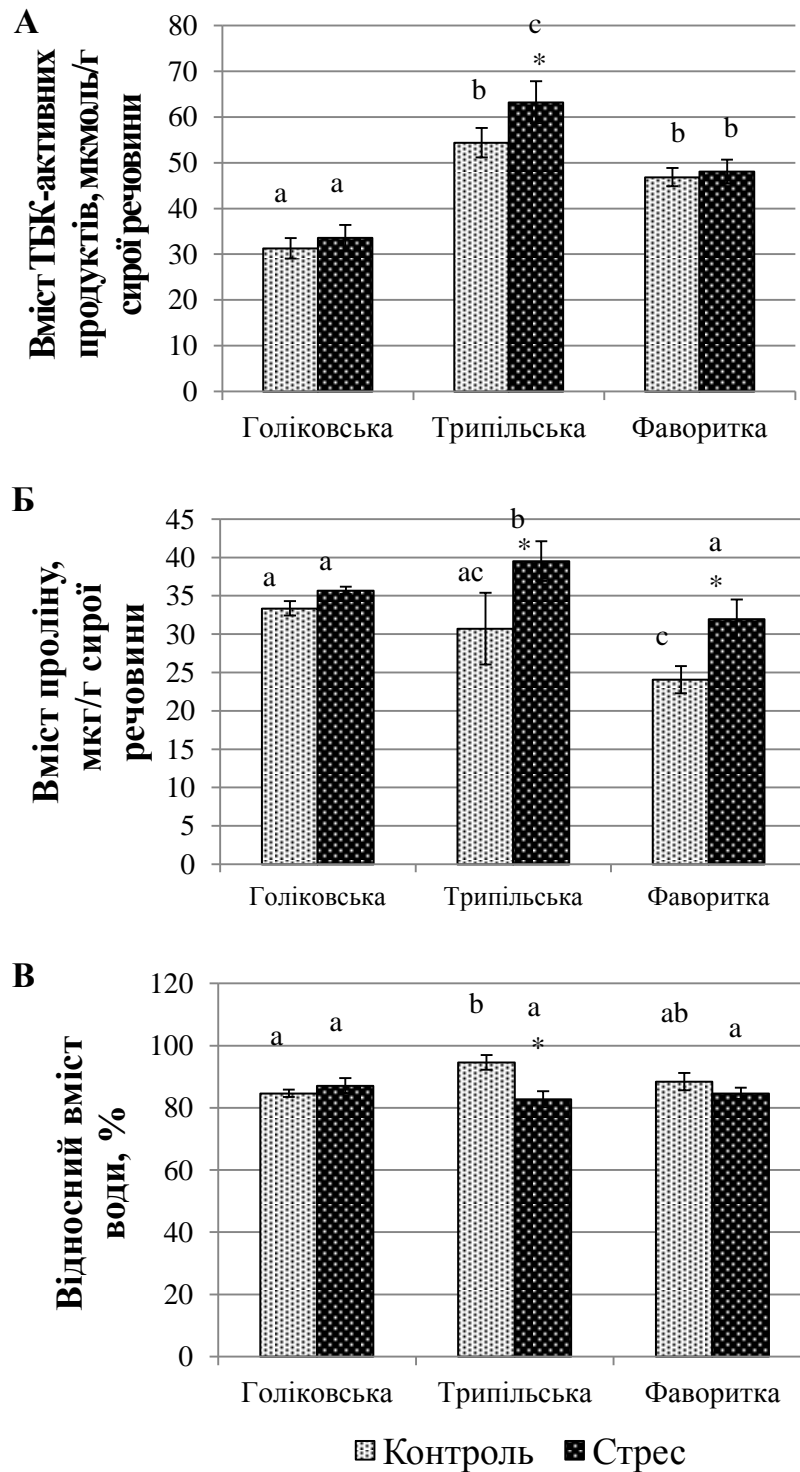


Рис. 4.1. Фізіолого-біохімічні параметри проростків пшениці м'якої та двозернянки за умов осмотичного стресу (тривалість експозиції 24 год).  $M \pm SEM$ , \* -  $p < 0,05$  у порівнянні з контролем

Оцінка фізіолого-біохімічного стану проростків пшениці м'якої свідчить про здатність сорту Фаворитка витримувати короткотривалий осмотичний

стрес, на відміну від сорту Трипільська, у якого спостерігали розвиток окиснювальних процесів та зниження водного статусу [256].

#### **4.2. Вплив довготривалого ПЕГ-модельованого осмотичного стресу на параметри окиснювального гомеостазу проростків пшениці м'якої та пшениці двозернянки**

До формування фізіологічної відповіді за умов пролонгованого впливу посухи залучаються складні адаптаційні механізми, для активації роботи яких необхідні час та додаткові ресурси. На ранніх етапах онтогенезу рослини є особливо сприйнятливими до впливу посухи, тому важливим є виявлення пристосувань, що можуть забезпечити їх розвиток за тривалого дефіциту води. Моделювання пролонгованого осмотичного стресу у пшениці м'якої та пшениці двозернянки здійснювали шляхом експозиції сортів Фаворитка, Трипільська та Голіковська у поживному середовищі з осмотичним потенціалом  $-0,3$  МПа (15% розчин ПЕГ) впродовж 7 діб після проростання. З огляду на результати дослідження впливу короткотривалого осмотичного стресу можна припустити, що проростки пшениці двозернянки здатні витримати інтенсивніші стресові навантаження, проте проростки пшениці м'якої можуть зазнати значних пошкоджень. У зв'язку з цим насіння досліджуваних сортів підлягало передпосівній обробці колоїдним розчином суміші наночастинок металів (Fe, Cu, Mn, Zn), що, ймовірно, могли б бути залучені до індукції адаптаційно-компенсаторних механізмів за умов стресу.

За умов довготривалого осмотичного стресу спостерігали розвиток перекисного окиснення ліпідів лише у проростках м'якої пшениці сорту Трипільська (рис. 4.3). Показано, що вміст ТБК-активних продуктів у листках проростків підвищувався на 27% порівняно з контрольним варіантом, а укореннях на 60%. Відсутність змін за даним параметром відносно контрольного варіанту у сортів з підвищеною толерантністю до дії ПЕГ-

індукованої посухи може свідчити про відновлення окисно-відновного балансу та встановлення контролю за процесами утворення АФК в клітинах рослин.

Передпосівна обробка колоїдним розчином наночастинок біогенних металів спричиняла протекторну дію на проростки пшениці м'якої та пшениці двозернянки, пригнічуючи розвиток окиснювальних процесів в коренях за умов тривалого осмотичного стресу порівняно з варіантом без обробки наночастинками [257].

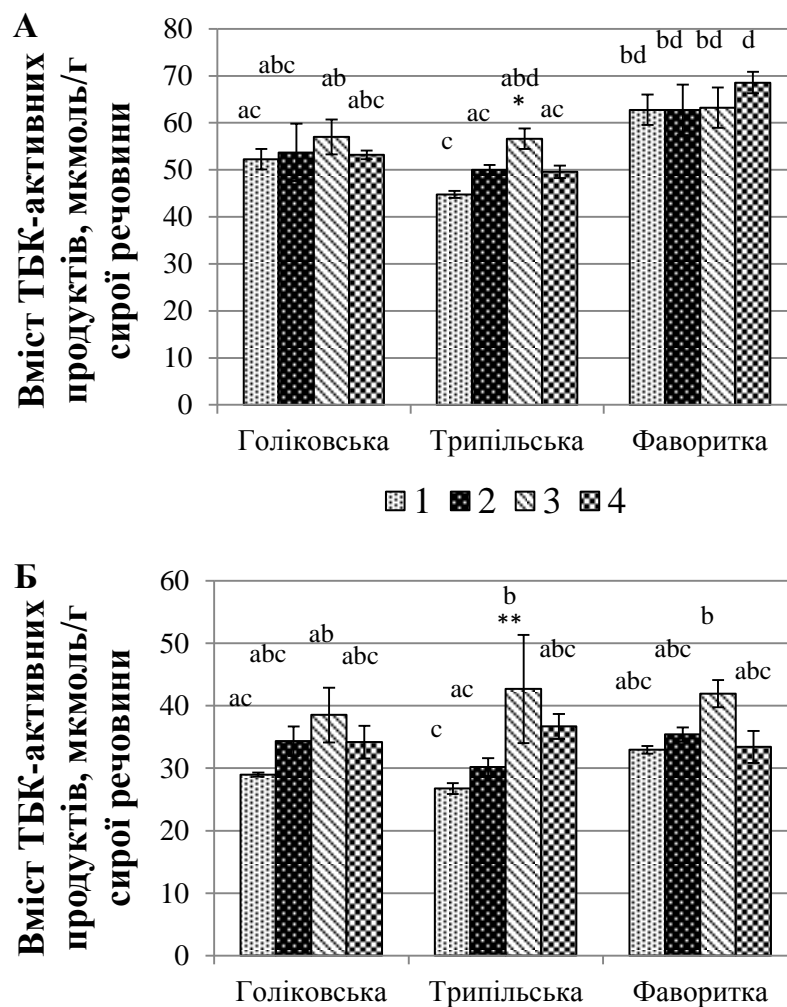


Рис. 4.3. Вміст ТБК-активних продуктів в листках (А) і коренях (Б) пшениці м'якої та двозернянки: 1 – контроль; 2 – обробка розчином наночастинок металів; 3 – осмотичний стрес; 4 – обробка розчином наночастинок металів з подальшим осмотичним стресом.  $M \pm SEM$ , \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$  у порівнянні з контролем

Забезпечення осмотичної регуляції та підтримки водного балансу клітин за дії стресора певною мірою відбувається за участі вільного проліну, про що свідчить значне накопичення цієї імінокислоти в коренях досліджуваних сортів (рис. 4.4). Показано, що вміст проліну у різних частинах проростків пшениці м'якої незбалансований, зі значним (10:1) превалюванням у коренях. У проростків пшениці двозернянки сорту Голіковська спостерігали менш інтенсивне накопичення проліну в коренях у порівнянні з іншими сортами. Разом з тим, вміст проліну у листках пшениці двозернянки збільшився у 7 разів, на відміну від сортів пшениці м'якої, у яких цей показник був на рівні значень контролю. Такий характер розподілу проліну в проростках пшениці двозернянки може свідчити про більш досконалий механізм захисту рослин за умов посухи.

Отримані результати узгоджуються з дослідженням Marcińska та ін. [258], де у 21-добових проростків пшениці м'якої було виявлено збільшення вмісту проліну в листках у 2-5 разів залежно від вмісту ПЕГ у середовищі культивування. Крім того, це дослідження показало, що накопичення цієї імінокислоти відбувається інтенсивніше у сортів з вищою толерантністю до посухи, ніж у посухочутливих. Показано, що екзогенна обробка проліном може знижувати негативний вплив стресового навантаження, зокрема, забруднення важкими металами, та сприяти уникненню надмірної втрати води рослинами [259].

Варто зазначити, що за передпосівної обробки сумішшю нанорозміних частинок металів вміст проліну у проростків пшениці двозернянки за умов осмотичного стресу знижувався, що може свідчити про залучення альтернативних протекторних механізмів, зокрема систем антиоксидантного захисту.

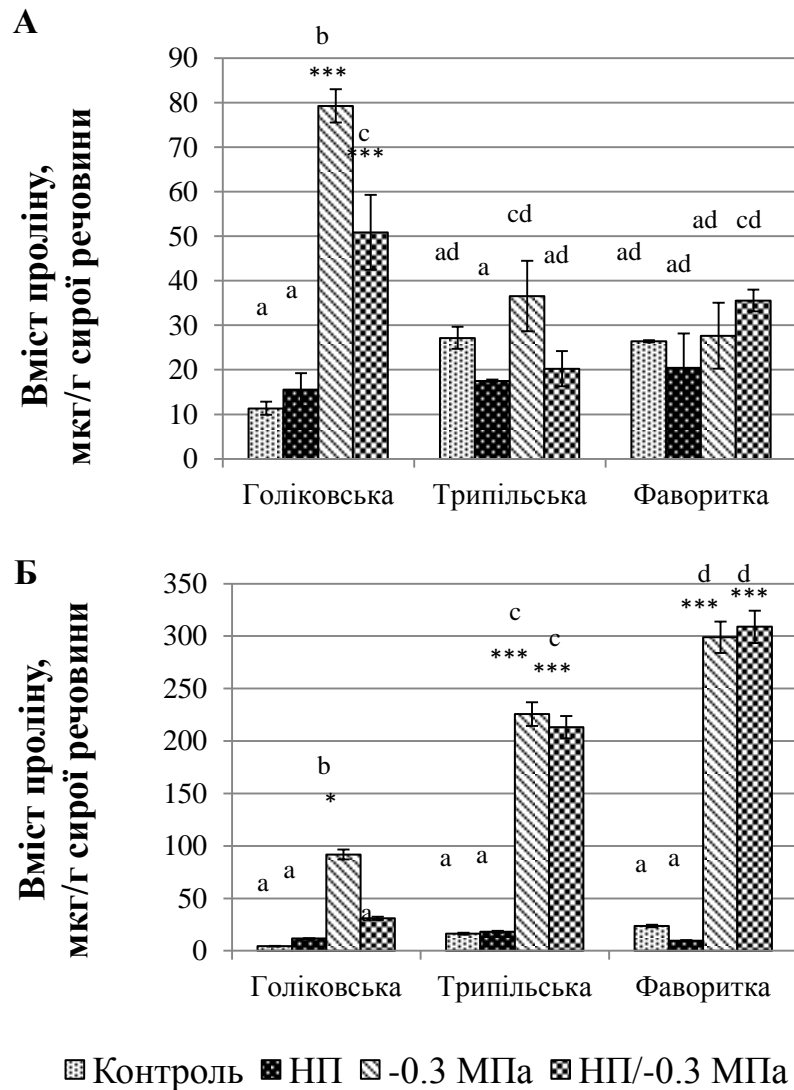


Рис. 4.4. Вміст вільного проліну в листках (А) і коренях (Б) пшениці м'якої та двозернянки: 1 – контроль; 2 – обробка розчином наночастинок металів; 3 – осмотичний стрес; 4 – обробка розчином наночастинок металів з подальшим осмотичним стресом.  $M \pm SEM$ , \* -  $p < 0,05$ , \*\*\* -  $p < 0,001$  у порівнянні з контролем

Дослідження активності основних антиоксидантних ензимів, а саме СОД та КАТ, виявили різновекторність захисних реакцій досліджуваних сортів за умов пролонгованого осмотичного стресу. У пшениці м'якої сорту Фаворитка спостерігали підвищення активності СОД в коренях на 30% за умов тривалого осмотичного стресу, тоді як у коренях сорту Трипільська активність СОД знижувалась на 25% (рис. 4.5). Змін активності СОД у листках досліджуваних сортів за дії стресора не виявлено.

У науковій літературі зазначається, що між вмістом проліну та активністю СОД у деяких видів рослин проявляються реципрокні відносини [107], коли значного накопичення проліну (конститутивного або стресс-індукованого) не спостерігається, але при цьому рослини характеризуються високим конститутивним рівнем активності СОД. За результатами нашого дослідження такої взаємозалежності не виявлено.

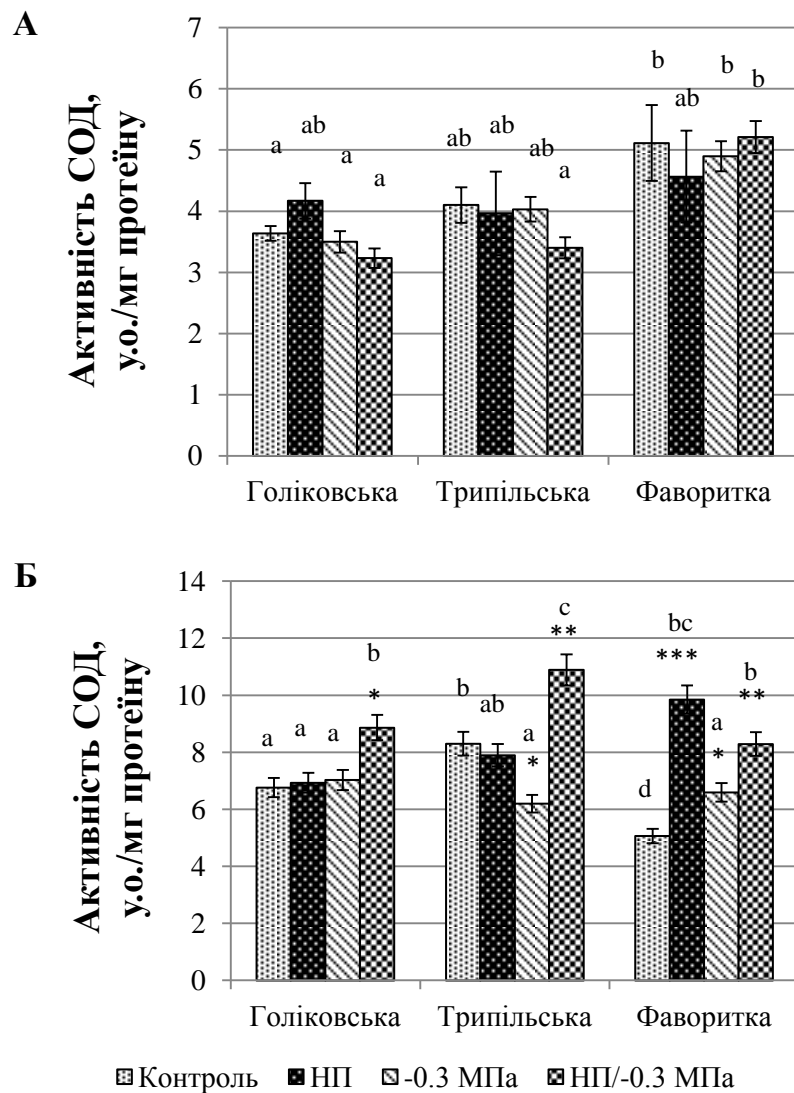


Рис. 4.5. Активність СОД в листках (А) і коренях (Б) пшениці м'якої та двозернянки: 1 – контроль; 2 – обробка розчином наночастинок металів; 3 – осмотичний стрес; 4 – обробка розчином наночастинок металів з подальшим осмотичним стресом.  $M \pm SEM$ , \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$  у порівнянні з контролем

Сорти пшениці м'якої Трипільська та Фаворитка характеризувались зниженням активності КАТ у коренях на 25 та 38%, відповідно (рис. 4.6), тоді як у пшениці двозернянки сорту Голіковська цей показник зростав на 35% за осмотичного стресу. Зміни за цим параметром у листках спостерігали лише у сорту Фаворитка, де активність КАТ достовірно знижувалась на 19% за умов вирощування рослин на ПЕГ-вмісному середовищі.

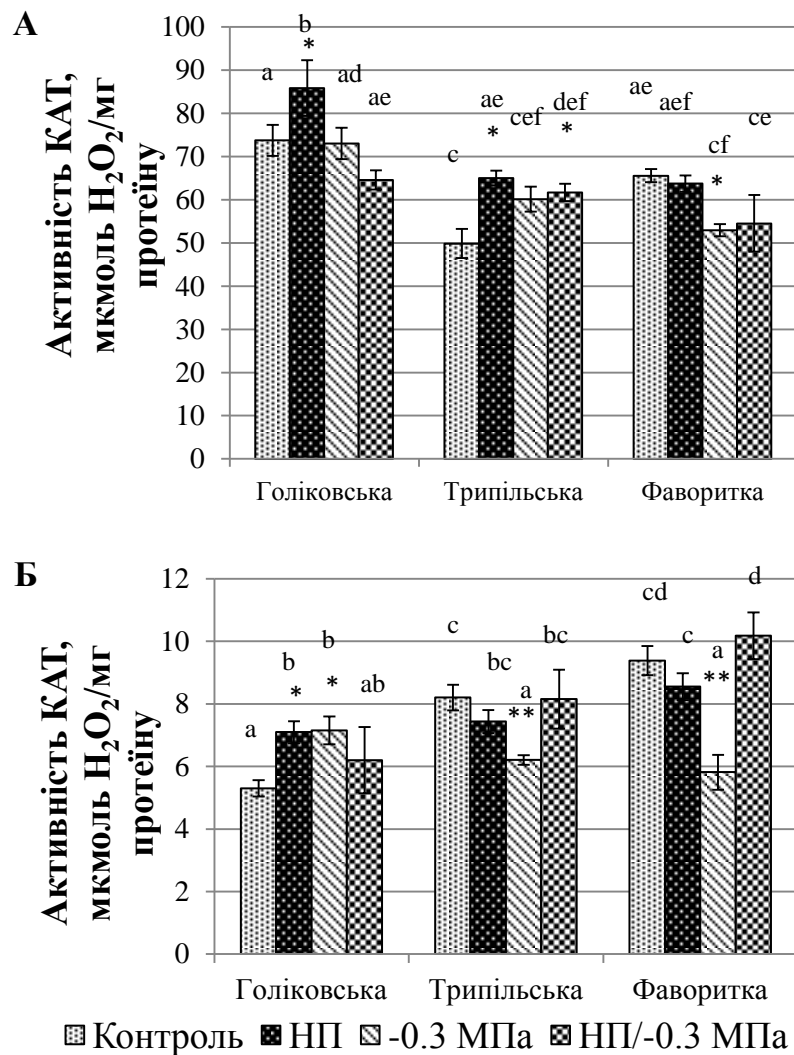


Рис. 4.6. Активність КАТ в листках (А) і коренях (Б) пшениці м'якої та двозернянки: 1 – контроль; 2 – обробка розчином наночастинок металів; 3 – осмотичний стрес; 4 – обробка розчином наночастинок металів з подальшим осмотичним стресом.  $M \pm SEM$ , \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$  у порівнянні з контролем

Обробка колоїдним розчином суміші наночастинок біогенних металів сприяла активації СОД у коренях сорту Фаворитка майже у 2 рази, тоді як у коренях сорту Голіковська спостерігали збільшення активності КАТ на 34% відносно контрольного варіанту. У листках сортів Трипільська та Голіковська спостерігали підвищення активності КАТ на 30 та 16%, відповідно, порівняно з контролем. Варто зазначити, що передпосівна обробка сумішшю наночастинок металів сприяла відновленню активності КАТ за умов осмотичного стресу до рівня значень контрольного варіанту у коренях обох сортів пшениці м'якої. Дані літератури свідчать [22, 260], що обробка наночастинками металів може опосередковувати активацію системи антиоксидантного захисту, сприяючи швидкій адаптації рослин за умов стресу.

Отже, протекторний ефект від обробки наночастинками металів спостерігали у коренях досліджуваних сортів, де на фоні збільшення активності СОД та КАТ відбувалося зниження вмісту ТБК-активних продуктів.

Аналіз отриманих результатів свідчить, що проросткам пшениці двозернянки сорту Голіковська вдалося реалізувати їх генетично-закладений потенціал толерантності до посухи, про що свідчить відсутність розвитку окиснювальних процесів та стабільність функціонування системи антиоксидантного захисту за умов довготривалого осмотичного стресу [256, 261]. Варто зазначити, що у сорту Голіковська вміст проліну за умов стресу у надземній та підземній частині рослин зростав рівномірно, тоді як у сортів пшениці м'якої пролін накопичувався незбалансовано зі значним превалюванням у коренях.

### **Висновки до розділу:**

1. Встановлено, що довготривалий осмотичний стрес провокує розвиток окиснювальних процесів та пригнічення активності антиоксидантних ензимів СОД та КАТ у коренях проростків пшениці м'якої.

2. Показано, що пшениця двозернянка сорту Голіковська здатна підтримувати редокс-гомеостаз та уникати окиснювальних пошкоджень за умов пролонгованого осмотичного стресу.
3. Встановлено, що проростки пшениці м'якої та двозернянки демонструють різні стратегії осмотичної регуляції за умов пролонгованого осмотичного стресу, що проявляється, зокрема, на рівні акумуляції проліну.
4. Виявлено, що обробка колоїдним розчином суміші наночастинок металів індукує систему антиоксидантного захисту та дозволяє зменшити прояви окиснювальних процесів, що є невід'ємними наслідками дії посухи.
5. Отримані результати свідчать, що сорти пшениці м'якої є більш чутливими до дії посухи порівняно з пшеницею двозернянкою сорту Голіковська.

## РОЗДІЛ 5

### РОЛЬ ЗАХИСНИХ БІЛКІВ (ДЕГІДРИНІВ, ХІТИНАЗ, β-1,3-ГЛЮКАНАЗ) У ФОРМУВАННІ ПОСУХОТОЛЕРАНТНОСТІ РІЗНИХ ВИДІВ РОДУ *TRITICUM L.*

Реакція рослин на вплив стресорів передбачає комплексну відповідь, до якої залучена індукція експресії генів, що кодують протеїни та ензими з протекторними властивостями. Стрес-індуковані протеїни забезпечують стабілізацію мембран, попереджають інактивацію ензимів та захищають внутрішньоклітинні структури від окиснення за умов посухи та інших чинників, що зумовлюють осмотичний стрес. Зокрема, дегідрини відіграють важливу роль у формуванні стрестолерантності до посухи, осмотичного шоку, дії низьких температур, тощо. Дегідрини належать до LEA-протеїнів та проявляють поліфункціональні захисні властивості [152, 157]. З іншої сторони, численні дослідження свідчать про індукцію хітиназ та β-1,3-глюканаз рослин за впливу абіотичних факторів [138, 192, 195, 198, 262, 263], проте роль цих ензимів за абіотичного стресу вивчена недостатньо, що здебільшого обумовлено їх приналежністю до PR-білків. Варто зазначити, що дослідження участі захисних білків у формуванні адаптаційних реакцій рослин пшениці двозернянки практично відсутні, на відміну від рослин пшениці м'якої. З огляду на високу толерантність рослин *T. dicoccum* до посухи, дослідження захисних реакцій за участі таких захисних протеїнів, як дегідрини, а також ензиматичної активності хітиназ та β-1,3-глюканази за умов осмотичного стресу видається перспективним.

#### 5.1. Вплив осмотичного стресу на активність хітиназ

Основною функцією хітиназ вважається захист рослин від фітопатогенів, що обумовлено їх здатністю до гідролізу хітину – компоненту клітинних

стінок грибів та екзоскелету членистоногих, а також пептидоглікану клітинних стінок бактерій [194, 196, 264, 265]. Участь хітиназ у захисті рослин до впливу абіотичних стресорів на сьогодні залишається недостатньо вивченою, проте дані наукової літератури свідчать, що хітинази є компонентом загального механізму захисту рослин за умов посухи [138, 192], засолення [266], забруднення важкими металами [266–268], тощо. Остаточно нез'ясованим залишається також і внутрішньоклітинний субстрат рослинних хітиназ, оскільки, як відомо, рослини не містять хітину. З іншого боку, вважається, що хітинази здатні розщеплювати арабіногалактанові протеїни [182] і, таким чином, можуть бути залучені до клітинного сигналіngu [185, 186] за умов стресу.

Результати нашого дослідження свідчать про наявність 4 ізоформ хітиназ з молекулярною масою близько 34, 41, 62 та 73 кДа у проростків пшениці м'якої та пшениці двозернянки (рис. 5.1А). У сортів Трипільська та Фаворитка виявлено також ензим з хітинолітичною активністю молекулярною масою 51 кДа. За інформацією, наведеною в базах даних (NCBI та UNIPROT databases), молекулярна маса відомих хітиназ рослин *T. aestivum* становить від 27 до 36 кДа, відомості щодо хітиназ *T. dicoccum* відсутні. Згідно наведених у наукових публікаціях даних, діапазон молекулярних мас, притаманний рослинним хітиназам, значно ширший – виявлено хітинази від 20 кДа [269] до 95 кДа [270], проте є лише поодинокі відомості щодо ізоформ хітиназ, наявних у предкових видів злаків. Так, наприклад, електрофоретичний аналіз хітиназ злакових культур з різною плоїдністю генома, проведений Moravčíková та ін. [270], виявив лише одну хітиназу з молекулярною масою близько 30 кДа у рослин пшениці м'якої та пшениці двозернянки, тоді як у тетраплоїда *A. cylindrical* Host. показано наявність 4 ізоформ.

Результати дослідження свідчать про різновекторність відповіді на дію стресора у проростків різних видів роду *Triticum*. За умов короткотривалого осмотичного стресу, модельованого ПЕГ 6000, спостерігали підвищення активності хітиназ пшениці м'якої (рис. 5.1Б). У проростків сорту Трипільська

було виявлено індукцію хітинолітичної активності ензиму з молекулярною масою 34 кДа, в той час, як у сорту Голиковська активність цих хітиназ знижувалась майже на 50% порівняно з контролем. У рослин пшениці двозернянки спостерігали достовірне збільшення активності лише хітиназ з молекулярною масою 73 кДа [271].

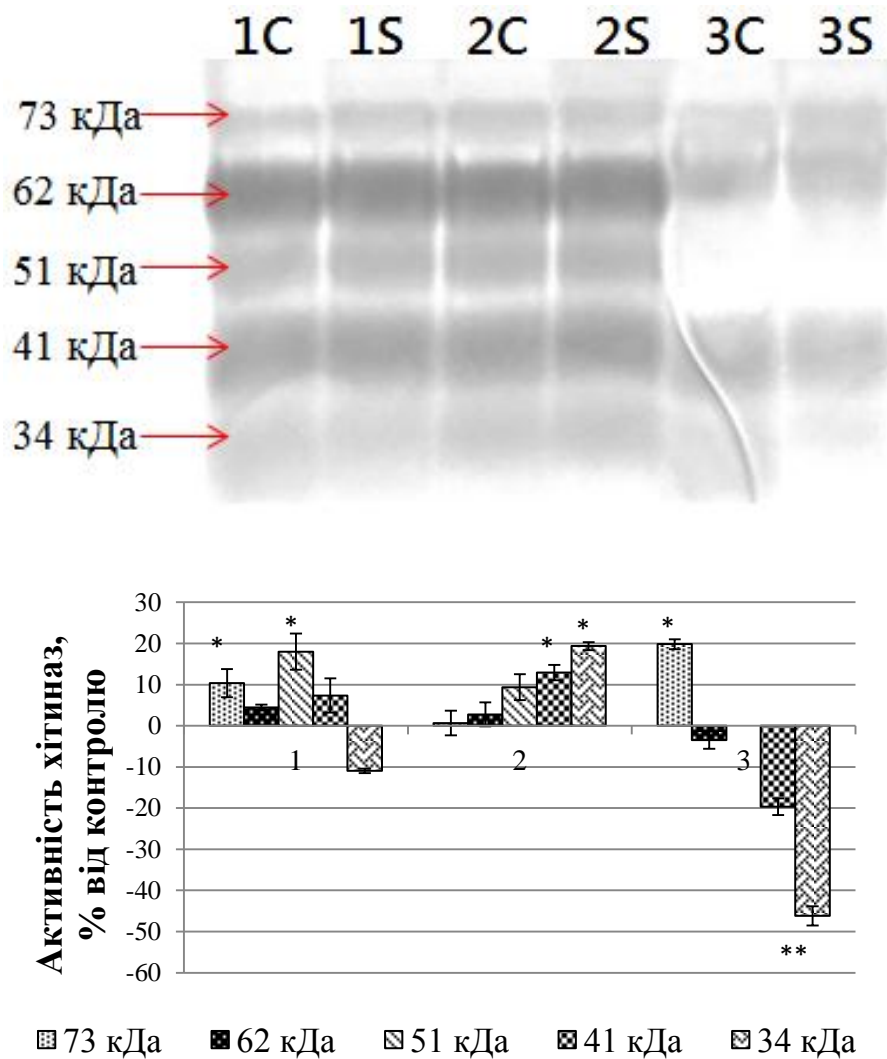


Рис. 5.1. Активність загальних хітиназ у листках проростків пшениці м'якої та двозернянки за умов осмотичного стресу: 1 – сорт Фаворитка; 2 – сорт Трипільська; 3 – сорт Голиковська; С – контроль; S – осмотичний стрес. Стрілки вказують на виявлені ізоформи.  $M \pm SEM$ , \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$  у порівнянні з контролем

Отримані результати узгоджуються з іншими дослідженнями [138, 192] та свідчать про участь хітиназ у адаптаційних реакціях рослин за осмотичного стресу, хоча їх роль у цьому процесі залишається дискусійною. Завдяки здатності до розщеплення N-ацетилглюкозаміну, хітинази, ймовірно, можуть змінювати співвідношення гнучкості та еластичності клітинної стінки, регулюючи, таким чином, розмір клітини за умов стресу [262]. Варто зазначити, що здатність до стискання та розтягування клітинної стінки розглядається як ознака толерантності рослин до посухи [272].

Взаємодію між плазматичною мембраною та клітинною стінкою рослин забезпечують арабіногалактанові протеїни. Ці глікопротеїни залучені до процесів росту, розвитку та розмноження, деякі з них беруть участь у лігніфікації клітинної стінки, а також функціонують як міжклітинні сигнальні молекули [185, 187]. На сьогодні, арабіногалактанові протеїни – єдиний відомий внутрішньоклітинний субстрат хітиназ, тому зміни активності хітиназ може свідчити про залучення цих протеїнів до генерації сигнальних молекул за умов стресу. З іншого боку, зниження активності хітиназ може бути пов'язане з накопиченням арабіногалактанових протеїнів, що, в свою чергу, сприяє підтриманню оводненості клітинної стінки та може опосередковувати активацію специфічних ензимів деглікозилювання [187]. Останнє призводить до збільшення вмісту олігосахаридів та, як наслідок, підвищення внутрішньоклітинного осмотичного тиску за умов дегідратації.

## **5.2. Вплив осмотичного стресу на активність $\beta$ -1,3-глюканаз**

Основною функцією  $\beta$ -1,3-глюканаз є каталіз реакції гідролітичного розщеплення  $\beta$ -1,3-глікозидних зв'язків  $\beta$ -1,3-глюканів – структурного компоненту клітинної стінки грибів, що обумовлює їх участь у захисті від фітопатогенів [196, 199]. Субстратом для  $\beta$ -1,3-глюканаз рослинного походження є калоза – лінійний полісахарид, що відіграє важливу роль у міжклітинній комунікації та має ряд функцій у процесах розвитку рослин [191,

273].  $\beta$ -1,3-глюканази беруть участь у процесах проростання насіння та пилку, спокою бруньок, цвітіння та дозрівання плодів [139, 274]. Дані наукової літератури свідчать, що  $\beta$ -1,3-глюканази беруть участь у захисних реакціях рослин за дії різних абіотичних стресорів, таких як поранення [198], забруднення важкими металами [263], температурний шок [195] та посуха [138].

У досліджуваних сортів пшениці м'якої та двозернянки виявлено ізоформи  $\beta$ -1,3-глюканаз з молекулярною масою близько 23, 47, 88 та 105 кДа. У базі даних Uniprot/NCBI є відомості лише щодо  $\beta$ -1,3-глюканаз *T. aestivum* з молекулярною масою від 34 до 49 кДа. У дослідженнях Moravčíková та ін. [274] з використанням рослин злакових культур з різною плоїдністю геному у *T. aestivum* та *T. dicoccum* продемонстровано наявність одієї ізоформи  $\beta$ -1,3-глюканаз з молекулярною масою близько 52 кДа. У дослідженні Gregorová та ін. [138] у листках рослин пшениці м'якої спостерігали активність чотирьох ізоформ  $\beta$ -1,3-глюканаз з молекулярною масою від 30 до 150 кДа.

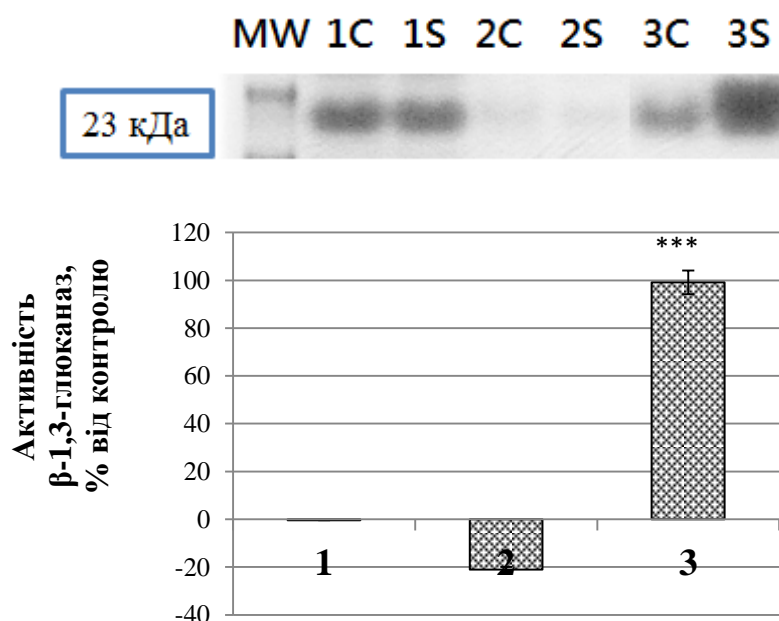


Рис. 5.2. Активність  $\beta$ -1,3-глюканаз у листках проростків пшениці м'якої та двозернянки за умов осмотичного стресу: 1 – сорт Фаворитка; 2 – сорт Трипільська; 3 – сорт Голіковська; С – контроль; S – осмотичний стрес; MW – маркер молекулярної маси.  $M \pm SEM$ , \*\*\* –  $p < 0,001$  у порівнянні з контролем

Аналіз отриманих результатів свідчить, що ізоформи  $\beta$ -1,3-глюканаз рослин пшениці м'якої сорту Фаворитка та Трипільська знижували свою активність або були нечутливі до стресу, тоді як у пшениці двозернянки сорту Голіковська спостерігали підвищення активності  $\beta$ -1,3-глюканази з молекулярною масою 23 кДа за умов ПЕГ-модельованого осмотичного стресу у 2 рази (рис. 5.2) [271]. Отримані результати узгоджуються з раніше опублікованим дослідженням [138], де було показано як індукцію окремих ізоформ, так і підвищення загальної активності  $\beta$ -1,3-глюканаз пшениці м'якої за дії посухи.

Зміни активності  $\beta$ -1,3-глюканаз можуть свідчити про їх участь у регуляції накопичення калози, оскільки вона є полімером  $\beta$ -1,3-глюкану. Калоза інтенсивно синтезується під час мікроспорогенезу та проростання насіння, а за умов стресу накопичується між клітинною стінкою та плазматичною мембраною [191, 273]. Калоза відкладається у тих частинах клітинної стінки, що оточують плазмодесми, і, таким чином, залучена до регуляції транспорту речовин через симпласт [273]. У дослідженнях ролі калози у регуляції провідності плазмодесм Ruan та ін. [275] виявили ген *GhGluc1*  $\beta$ -1,3-глюканаз бавовника (*Gossypium hirsutum* та *Gossypium barbadense*), експресія якого, ймовірно, пов'язана з деградацією калози та, як наслідок, відкриттям плазмодесм. З іншої сторони, активність калозо-синтази – ензиму, що забезпечує синтез калози, за умов стресу може значно перевищувати активність  $\beta$ -1,3-глюканаз, внаслідок чого відбувається накопичення калози, а також підтримується колообіг глюкози в рослинному організмі.

### 5.3. Роль дегідринів за умов осмотичного стресу

Накопичення дегідринів у різних тканинах та органах є загальним механізмом захисту рослин за умов різних абіотичних стресів, в т.ч.

зневоднення [145, 276, 277]. У дослідженнях реакцій рослин під час стресу на фізіологічному та молекулярному рівнях з використанням кореляційного аналізу, проведених Klimešová та ін. [277], продемонстровано, що відносний рівень експресії генів дегідринів може бути більш чутливим індикатором стану рослин, ніж фізіологічні параметри, а також може використовуватися як показник рівня стресового навантаження. На сьогодні ідентифіковано 44 гени дегідринів пшениці м'якої [156], тоді як різноманітність та особливості накопичення дегідринів рослин пшениці двозернянки вивчені недостатньо. Незважаючи на численні дослідження дегідринів пшениці, більшість з них присвячена характеристиці дегідринів на рівні генів та транскриптів, тоді як відомостей щодо безпосередньої участі цих протеїнів у формуванні стрестолерантності рослин обмаль [276]. Необхідність проведення досліджень на рівні протеїнів пов'язана також з тим, що транскрипти дегідринів реагують на зміни навколишнього середовища значно швидше. Ganeshan та ін. [278] продемонстровано, що індукована дією низьких температур транскрипція дегідрину WCS120 досягає максимуму через 2 дні після обробки, тоді як накопичення відповідного протеїну досягало піку через 21 день. Зважаючи на вищезазначене, дослідження участі дегідринів у захисних реакціях пшениці м'якої та двозернянки за осмотичного стресу може розкрити їх значення у формуванні стрестолерантності рослин до посухи.

За допомогою вестерн-блот аналізу у досліджуваних сортів виявлено дегідрини з молекулярною масою близько 19, 24, 30, 43, 51, 57, 80 та 89 кДа. За умов короткотривалого ПЕГ-модельованого осмотичного стресу якісних змін у профайлі дегідринів не спостерігали. Разом з тим виявлено, що у проростків сорту Фаворитка вміст дегідринів з молекулярною масою 57 кДа за умов стресу збільшувався майже на 30% відносно контролю (рис. 5.3), тоді як у сорту Голіковська відзначено накопичення дегідринів з молекулярною масою 30 кДа (на 10%). Накопичення різних за молекулярною масою дегідринів у проростках сортів Фаворитка та Голіковська може свідчити про залучення цих протеїнів до різних адаптаційних стратегій.

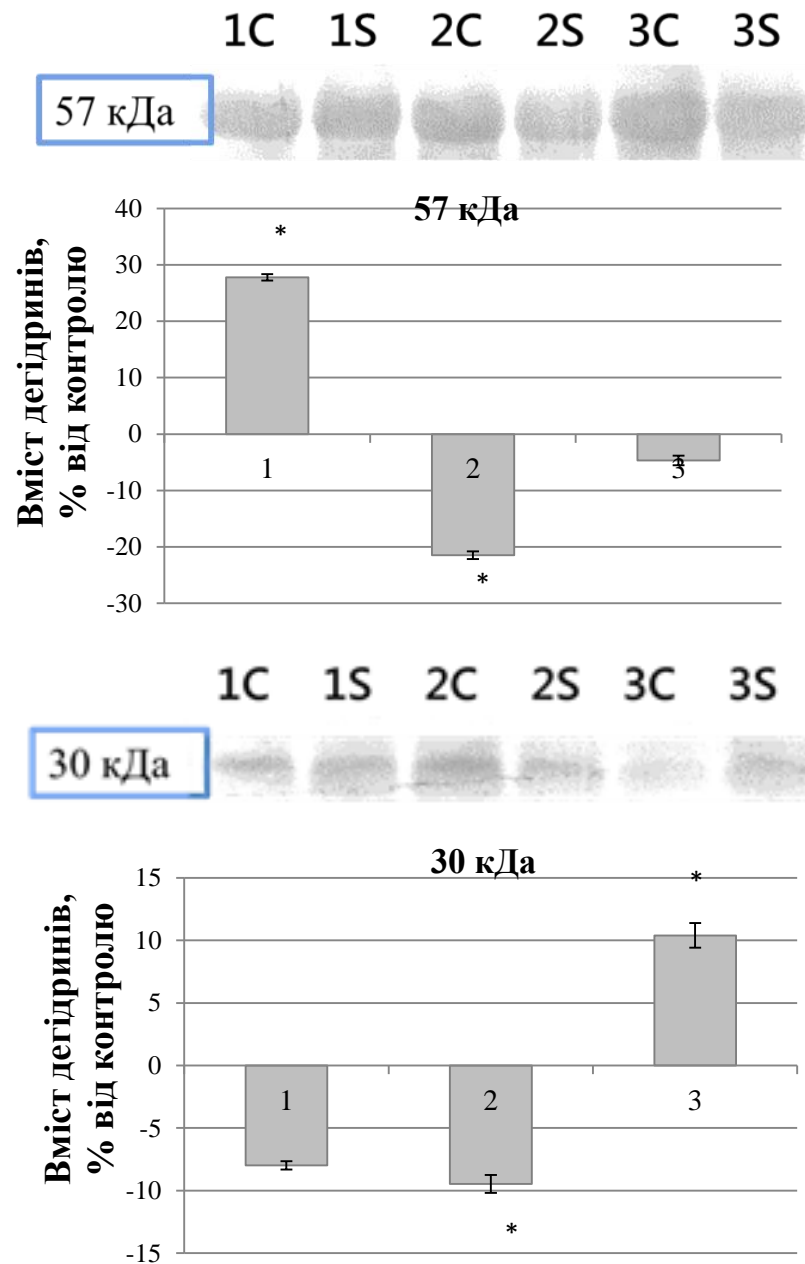


Рис. 5.3. Вміст дегідринів у листках проростків пшениці м'якої та двозернянки за умов осмотичного стресу: **1** – сорт Фаворитка; **2** – сорт Трипільська; **3** – сорт Голіковська; **С** – контроль; **С** – осмотичний стрес. Вестерн-блот аналіз,  $M \pm SEM$ , \* -  $p < 0,05$  у порівнянні з контролем

У сорту Трипільська спостерігали зниження вмісту дегідринів з молекулярною масою 30 та 57 кДа на 10 та 21% порівняно з контрольним

варіантом, що може бути наслідком окиснення цих протеїнів в результаті інтенсивної генерації АФК за умов осмотичного стресу.

Згідно даних наукових публікацій [145, 276, 277], накопичення дегідринів є типовою реакцією на дію посухи або дефіциту води. Наприклад, за осмотичного стресу, обумовленого додаванням до середовища вирощування манітолу, у рослин пшениці виявлено дегідрини з молекулярною масою 22, 28 та 55 кДа, накопичення яких відбувалося непропорційно – максимальний вміст низькомолекулярних дегідринів спостерігали на 5 добу дії стресора, тоді як вміст протеїну з молекулярною масою 55 кДа значно зріс на 7 добу [51]. Результати цього дослідження також свідчать про те, що сорти з вищою толерантністю до посухи характеризувались інтенсивнішим накопиченням дегідринів. Однак, явище зниження вмісту дегідринів за сильного стресового навантаження також описане [279]. Така реакція на дію посухи може бути наслідком реалізації протекторної функції дегідринів, що безпосередньо знешкоджують стрес-індуковані АФК та попереджають надмірне окиснення клітинних структур [176, 280].

Висока гідрофільність дегідринів, що забезпечується великою кількістю заряджених аміноксилот у їхньому складі, дозволяє утримувати велику кількість молекул води та визначає роль цих протеїнів у осмотичній регуляції [157]. Разом з тим, дегідрини забезпечують стабілізацію структури молекул протеїнів та мембран [150, 153]. З огляду на це, швидкість накопичення низькомолекулярних дегідринів може бути ознакою толерантності рослин до осмотичного стресу. Накопичення різних за молекулярною масою дегідринів проростків сортів Фаворитка та Голіковська може свідчити про залучення цих протеїнів до різних адаптаційних стратегій. У сорту Трипільська вміст дегідринів з молекулярною масою 30 та 57 кДа знижувався, що може бути наслідком окиснення цих протеїнів з огляду на інтенсивну генерацію АФК за умов осмотичного стресу. З іншої сторони, синтез дегідринів у сорту Трипільська у відповідь на дію стресора може відбуватися пізніше, що, у такому випадку, вказує на низьку швидкість індукції захисних реакцій

рослинного організму, а також на вищу чутливість до несприятливих умов навколишнього середовища.

### **Висновки до розділу:**

1. Показано, індукцію хітинолітичної активності окремих ізоформ хітиназ у листках проростків сорту Трипільська та Фаворитка, що може свідчити про їх участь у регуляції осмотичного тиску та фізичних властивостей целюлозної стінки клітин за умов осмотичного стресу.
2. У рослин сорту Голіковська виявлено підвищення активності  $\beta$ -1,3-глюканази з молекулярною масою 23 кДа за умов ПЕГ-модельованого осмотичного стресу, ймовірно, через їх участь у регуляції накопичення калози та підтримці метаболізму глюкози в рослинному організмі.
3. Зниження вмісту дегідринів з молекулярною масою 30 та 57 кДа у листках проростків сорту Трипільська, що може бути наслідком їх окиснення або свідчити про відтерміновану реакцію на дію стресора, що вказує на чутливість сорту до впливу осмотичного стресу.
4. Накопичення різних за молекулярною масою дегідринів у проростках сортів Фаворитка та Голіковська може свідчити про залучення цих протеїнів до різних адаптаційних стратегій.

## РОЗДІЛ 6

### ОЦІНКА СТРЕТОЛЕРАНТНОСТІ ДО ПОСУХИ СОРТІВ ПШЕНИЦІ ЗА ПАРАМЕТРАМИ ОКИСНЮВАЛЬНОГО ГОМЕОСТАЗУ ТА ВМІСТОМ ПЕРОКСИСОМ

Рослини зростають в умовах постійної зміни факторів навколишнього середовища, при цьому стратегії адаптації до впливу стресорів у різні фази онтогенезу можуть відрізнятися. Для з'ясування механізмів, залучених до формування стретолерантності до посухи, необхідним є проведення дослідження захисних реакцій рослин різного віку. Загальновідомо, що рослини найбільш вразливі до дії несприятливих факторів довкілля під час проростання та цвітіння. Варто зазначити, що дія посухи під час цвітіння може призвести до значних врат врожаю, хоча ступінь цих втрат залежить від тривалості та сили стресового навантаження. Стрес-індукована втрата врожаю обумовлюється прискореним старінням листків, зниженням фотосинтетичної активності внаслідок пошкодження фотосинтетичного апарату, обмеженням газообміну та зниженням фіксації вуглецю, спричиненим закриттям продохів, стерильністю пилку та зниженням поглинальної здатності рослин [9]. Однією з важливих адаптаційних стратегій стретолерантних до посухи рослин є модуляція системи антиоксидантного захисту, що запобігає пошкодженню клітинних структур внаслідок інтенсивної стрес-індукованої генерації АФК. Регуляція окисно-відновного гомеостазу відбувається за допомогою великих пулів клітинних ензиматичних та неензиматичних антиоксидантів, що забезпечують баланс між відновниками та окисниками [67], а також визначають тривалість та специфіку АФК-опосередкованої трансдукції сигналу. Основний окисно-відновний метаболізм клітини значною мірою відбувається у пероксисомах [79, 121, 124], що обумовлює перспективність дослідження цих компартментів у зв'язку з адаптацією рослин до впливу факторів довкілля.

Для з'ясування стрестолерантності рослин до посухи було проведено дослідження 6 сортів пшениці м'якої, а саме Астарта, Дарунок Поділля, Наталка, Одеська 267, Подолянка та Поліська 90, за умов пролонгованої посухи (7 діб) у фазу цвітіння [281]. Отримані результати показали, що вміст  $H_2O_2$  у листках сортів Наталка та Дарунок Поділля перевищує контрольні значення на 58 та 29%, відповідно, за дії стресора, тоді як у інших сортів цей показник відповідав значенням контрольного варіанту, а у сорту Подолянка навіть знижувався на 23% (рис. 6.1).

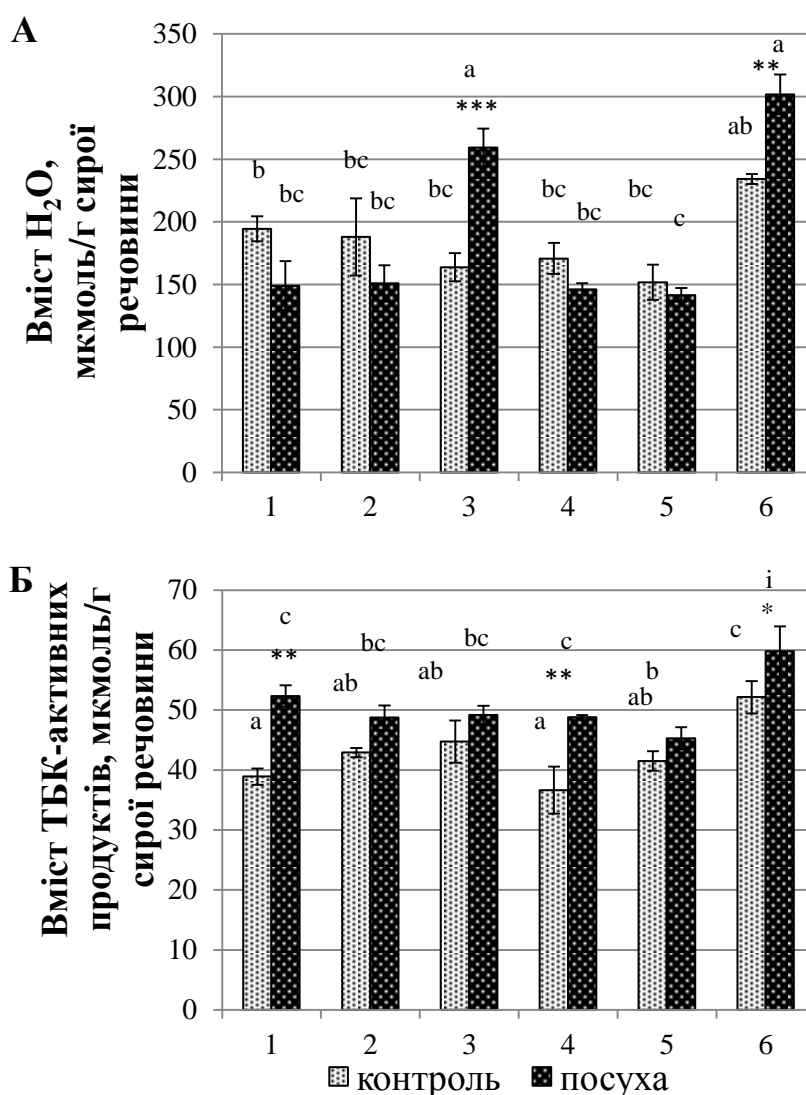


Рис. 6.1. Вміст  $H_2O_2$  (А) та ТБК-активних продуктів (Б) у листках пшениці м'якої за умов посухи: **1** – Подолянка; **2** – Астарта; **3** – Наталка; **4** – Поліська 90; **5** – Одеська 267; **6** – Дарунок Поділля.  $M \pm SEM$ , \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$  у порівнянні з контролем

Внаслідок пошкоджуючої дії посухи у сортів Подолянка, Наталка та Дарунок Поділля відбувалося істотне підвищення вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів.

За умов пролонгованого стресу у сортів Подолянка, Наталка, Поліська 90 та Дарунок Поділля спостерігали підвищення активності СОД. Інтенсифікація роботи цього ензиму може бути пов'язана з необхідністю утилізації надмірної кількості супероксид-аніон радикалу. Перекис водню, в тому числі той, що є продуктом реакції, яку каталізує СОД, розщеплюють КАТ та різні типи ПО. Вважається, що ПО аскорбат-глутатіонового циклу беруть участь у регуляції вмісту  $H_2O_2$  як сигнальної молекули, а КАТ є основним ензимом його детоксикації [77]. Згідно цієї гіпотези, ймовірне накопичення  $H_2O_2$  як сигнальної молекули відбувається у сортів Подолянка та Дарунок Поділля, у яких активність КАТ була на рівні контрольних значень. У сортів Поліська 90 та Одеська 267 спостерігали підвищення активності КАТ на 121 та 139%, відповідно, що може свідчити про надлишковий вміст  $H_2O_2$  в клітинах листків.

Враховуючи те, що значення активності ГПО відображає загальну активність ПО класу III, здатних утилізувати  $H_2O_2$  за рахунок окиснення різноманітних фенольних сполук, підвищення цього показника у сортів Поліська 90 та Одеська 267 також може вказувати на надмірне виробництво АФК у фотосинтетичних тканинах цих сортів.

Підвищення загальної активності ПО може бути пов'язана з індукцією синтезу нових ізоформ, здатних витримувати умови дефіциту води та дію високих температур, запобігаючи інактивації ензиму за посухи [75].

Виявлено, що активність АПО підвищується у всіх досліджуваних сортів за умов стресу, за винятком сорту Одеська 267. Дослідження Молої та ін. [282] показали, що активність АПО рослин сої значно вища у сортів з високою стрестолерантністю до посухи, ніж у сприйнятливих сортів. Аналогічну відповідь на дію стресора спостерігали за ступенем активності ГПО, але лише у фазу цвітіння. Дослідження Молої та ін. [282] свідчить також про підвищення активності цих ензимів з віком рослин.

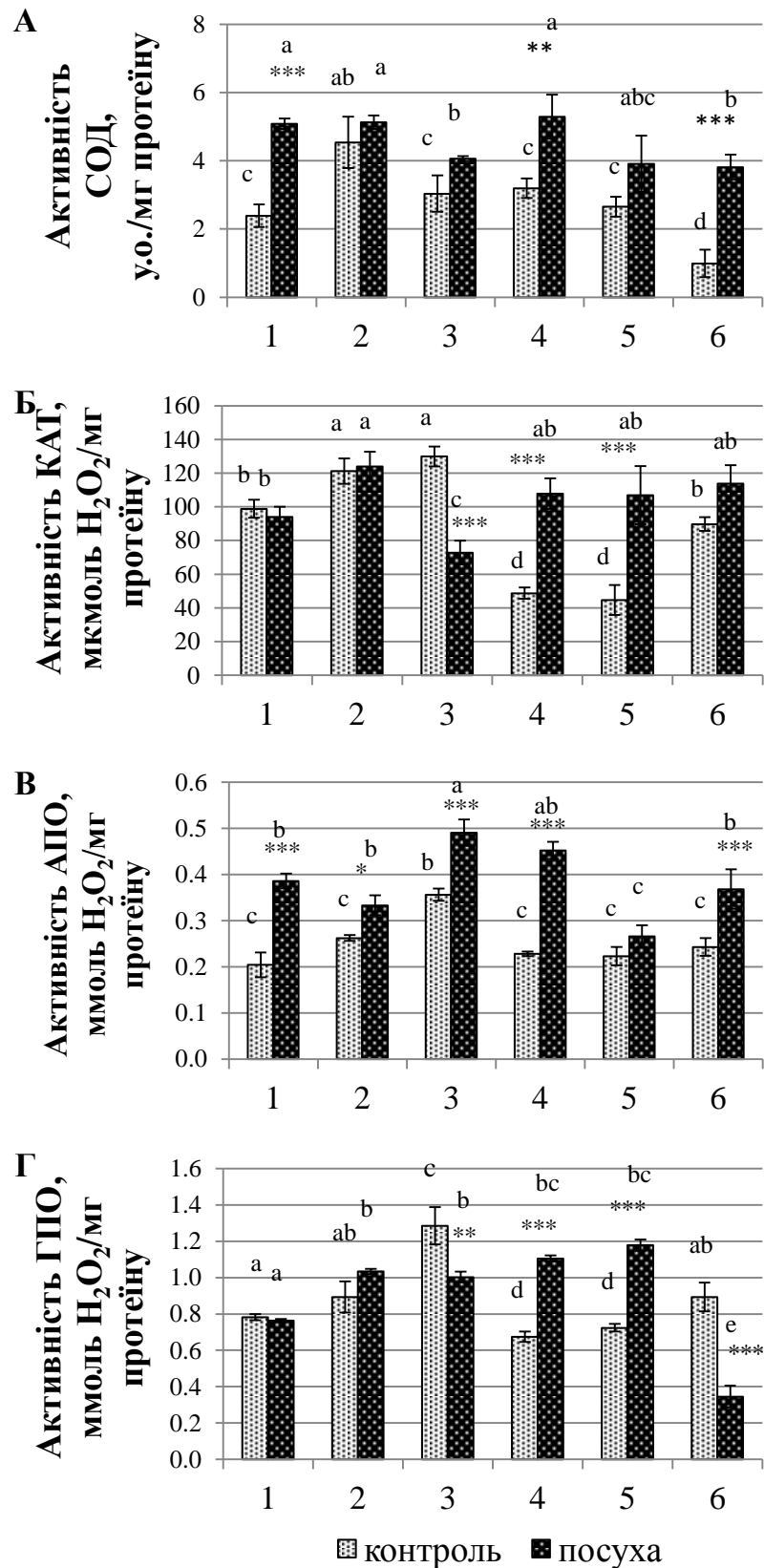


Рис. 6.2. Активність антиоксидантних ензимів рослин пшениці за умов посухи: **1** – Подолянка; **2** – Астарта; **3** – Наталка; **4** – Поліська 90; **5** – Одеська 267; **6** – Дарунок Поділля. М±SEM, \* - p<0,05, \*\* - p<0,01, \*\*\* - p<0,001 у порівнянні з контролем

На нашу думку, відсутність змін активності АПО в листках сорту Одеська 267 наврядчи свідчить про його чутливість до посухи, оскільки, як відомо, стрес-індуковані зміни балансу ензимів, здатних розщеплювати перекис водню, асоціюють також з активацією компенсаторних неензиматичних механізмів [68]. Наприклад, у рослин, що мають дефіцит КАТ, спостерігається окиснення та інтенсифікація роботи пулу глутатіону [101, 283].

З огляду на залучення всіх досліджуваних ензиматичних систем до знешкодження АФК на фоні накопичення ТБК-активних продуктів, сорт Поліська 90 не здатний подолати наслідки окиснювальних пошкоджень, викликаних посухою, що свідчить про чутливість цього сорту до дії стресора. Сорт Астарта за досліджуваними параметрами можна охарактеризувати як найбільш толерантний до пролонгованої дії посухи.

Зміни гомеостазу АФК у відповідь на дефіцит води можуть модулювати вміст пероксисом [21], викликаючи проліферацію, агрегацію або деградацію цих органел шляхом пексофагії [79, 284]. Пероксисоми є одномембранними органелами, що забезпечують перебіг реакцій процесів фотодихання,  $\beta$ -окиснення жирних кислот, біосинтезу фітогормонів ауксину, жасмонатів і саліцилатів та катаболізму поліамінів. Відомо, що фотодихання є одним з основних джерел АФК, а більшість утвореного в пероксисомах  $H_2O_2$  генерується в результаті окиснення гліколату до гліоксилату за участі гліколатоксидази. Процес фотодихання значно посилюється за дії посухи, що пов'язано з переорієнтацією активності ензиму рибулозобісфосфаткарбоксилази/оксигенази з карбоксилазної на оксигеназну внаслідок обмеження надходження вуглекислого газу до клітин мезофілу, спричиненого закриттям продихових щілин. Варто зауважити, що інші абіотичні фактори, наприклад, засолення, температурний стрес, забруднення важкими металами, також можуть впливати на проліферацію пероксисом. У пероксисомах функціонують також ензиматичні та неензиматичні антиоксиданти, що запобігають пошкодженню органел. Таким чином, кількісне визначення пероксисом може свідчити про здатність організму

регулювати редокс-гомеостаз та є перспективним для використання в якості маркера окиснювального стресу рослин.

На сьогоднішній день для виявлення пероксисом використовують мікроскопічні дослідження, що є трудомістким та дорогим методом, непридатним для масових аналізів. Нещодавно запропоновано високочутливий метод визначення вмісту пероксисом в загальному білковому екстракті з використанням флуоресцентного зонду N-BODIPY шляхом спектрофлуориметрії [133]. Зазначений метод застосовано нами для оцінки участі пероксисом у регуляції окисно-відновного гомеостазу клітин сортів пшениці м'якої за умов посухи (рис. 6.3).

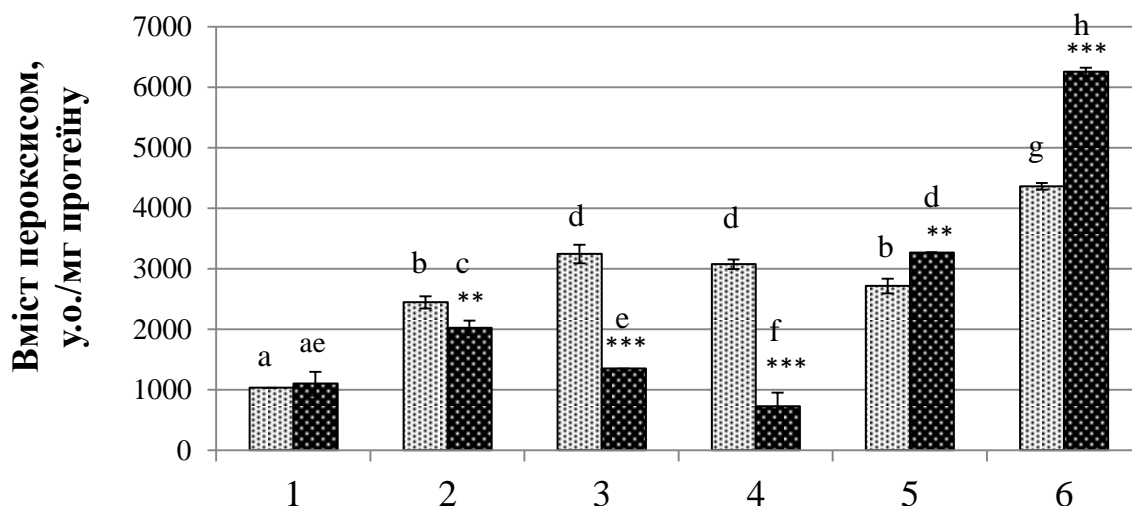


Рис. 6.3. Вміст пероксисом рослин пшениці за умов посухи: 1 – Подолянка; 2 – Астарта; 3 – Наталка; 4 – Поліська 90; 5 – Одеська 267; 6 – Дарунок Поділля.  $M \pm SEM$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$  у порівнянні з контролем

Виявлено, що у прапорцевих листках сорту Подолянка, що зазнавав дії посухи впродовж 7 діб у фазу цвітіння, вміст пероксисом не змінювався. У сорту Астарта спостерігали зниження (на 17% відносно контролю), а у Одеська 267 спостерігали підвищення (на 20%) вмісту пероксисом за дії стресора. Сорти Наталка та Поліська 90 характеризуються зниженням цього показника на 58 та 76%, відповідно, на відміну від сорту Дарунок Поділля, у

якого вміст пероксисом зростав на 43%. Варто зазначити, що надмірне стрес-індуковане утворення АФК в клітинах рослин може призводити до пошкодження пероксисом і, як наслідок, пексофагії [284]. Згідно даних літератури, екзогенний  $H_2O_2$  та інактивована КАТ індукують агрегацію пероксисом, що пришвидшує окиснення та деградацію цих органел [134]. У зв'язку з цим вважається, що  $H_2O_2$  може діяти як сигнальна молекула в процесі пексофагії [79]. Підвищення вмісту  $H_2O_2$  на 58% та зниження активності КАТ на 44% у прапорцевих листках сорту Наталка, ймовірно, пов'язані з деградацією пероксисом, оскільки більшість внутрішньоклітинного КАТ локалізована саме у цьому компартменті. Причиною зниження вмісту пероксисом у листках сорту Поліська 90 також може бути окиснення, про що свідчить накопичення ТБК-активних продуктів. Різкі зміни вмісту пероксисом у відповідь на дію стресора, ймовірно, є наслідком дестабілізації внутрішньоклітинних редокс систем та можуть вказувати на чутливість цих сортів до посухи. Аналіз отриманих даних свідчить, що запропонований Fahy та ін. [133] метод визначення вмісту пероксисом є перспективним у здійсненні оцінки стану системи антиоксидантного захисту за умов посухи та може бути використаний для фенотипування та визначення ступеню толерантності рослин до дії різних несприятливих факторів довкілля, в т.ч. посухи. Для виявлення взаємного впливу досліджуваних параметрів проведено кореляційний аналіз (рис. 6.4).

Згідно отриманих результатів вміст пероксисом корелює з вмістом  $H_2O_2$  ( $r=0,629$ ), що узгоджується з гіпотезою АФК-індукованої проліферації пероксисом [21]. Разом з цим, спостерігали позитивну кореляцію між вмістом пероксисом та вмістом ТБК-активних продуктів ( $r=0,657$ ) за дії посухи, що свідчить про розвиток окиснювальних процесів внутрішньоклітинних структур та, можливо, пероксисом безпосередньо. Важливу роль у знешкодженні  $H_2O_2$  у прапорцевих листках пшениці за умов пролонгованої дії посухи, ймовірно, відіграють пероксидази III класу, про що свідчить стійка

негативна кореляція між активністю ГПО та вмістом  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $r=-0,711$ ), вмістом ТБК-активних продуктів ( $r=-0,987$ ), а також вмістом пероксисом ( $r=-0,699$ ).

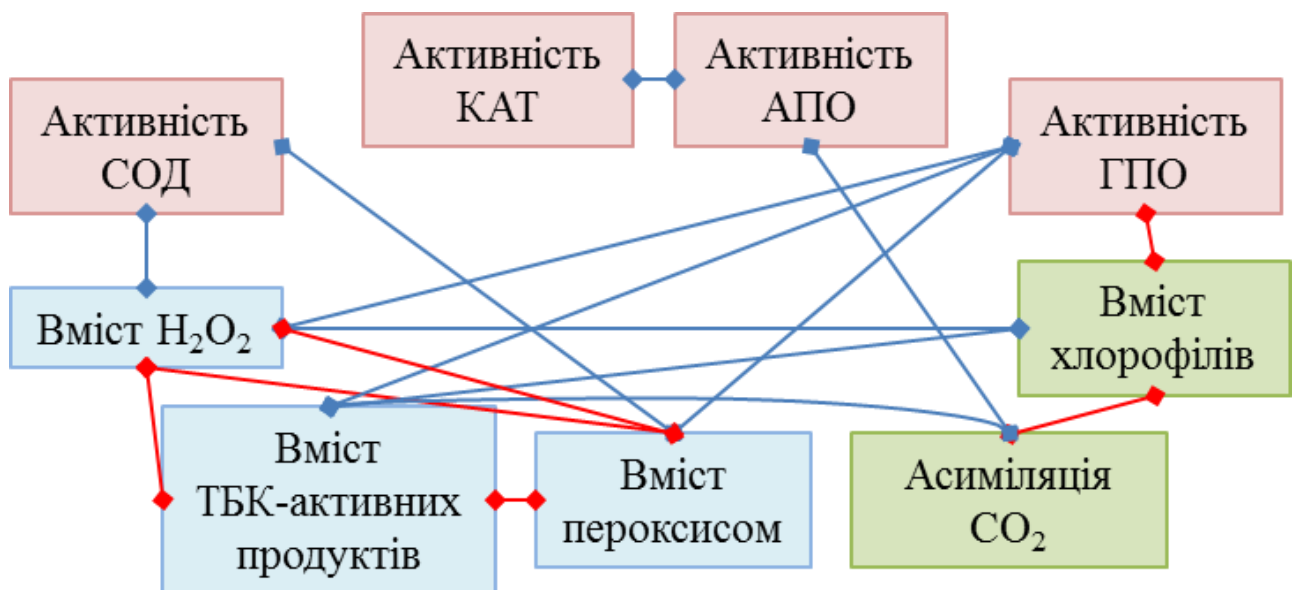


Рис. 6.4. Карта кореляційних зв'язків між компонентами редокс-системи клітин та фотосинтетичними параметрами за умов посухи (синім позначено негативну кореляцію, червоним – позитивну)

Виявлено, що КАТ та АПО мають тісний негативний зв'язок за умов посухи ( $r=0,639$ ), що знайшло підтвердження у дослідженнях Apel та Hirt [68].

Результати кореляційного аналізу (Табл. 6.1.) стійкого зв'язку між інтенсивністю проліферації пероксисом та показниками урожайності рослин пшениці за умов посухи не виявили. Пероксисоми характеризуються високою динамічністю та здатністю швидко реагувати на зміни умов довкілля, однак взаємозв'язок з компонентами системи антиоксидантного захисту та ступенем накопичення  $\text{H}_2\text{O}_2$  за умов стресу дозволяє розглядати вміст пероксисом як інтегральний показник редокс-статусу рослинного організму.

Отримані результати свідчать про наявність позитивної кореляції між параметрами фотосинтетичної продуктивності та урожайності пшениці м'якої за умов посухи [285]. Згідно даних літератури, зв'язок між вмістом хлорофілів та урожайністю не завжди є істотним, на відміну від хлорофільного індексу

[286]. Разом з тим, наше дослідження показало тісний зв'язок між вмістом хлорофілів та масою зерна на 1 рослину, а також його кількістю (Табл. 6.1).

*Таблиця 6.1*

**Кореляція між вмістом пероксисом, параметрами фотосинтетичної продуктивності та урожайності рослин за умов посухи**

|                            | Маса зерна/рослину | Кількість зерна/рослину |
|----------------------------|--------------------|-------------------------|
| Вміст пероксисом           | 0,258              | 0,259                   |
| Асиміляція CO <sub>2</sub> | 0,688              | 0,677                   |
| Вміст хлорофілів           | 0,541              | 0,511                   |

Отже, продемонстровано перспективність застосування методу визначення вмісту пероксисом за допомогою флуоресцентного зонду N-BODIPY для біохімічного фенотипування рослин. Зазначений метод проявляє високу чутливість та дозволяє здійснювати масовий аналіз генотипів.

**Висновки до розділу:**

1. Досліджувані сорти виявили різний ступінь чутливості до пролонгованої дії посухи. Найвищою толерантністю до посухи характеризувалися сорти Подолянка та Астарта, у яких спостерігали активацію ензиматичної ланки системи антиоксидантного захисту та відсутність наслідків пошкоджуючого впливу окиснювального стресу. Сорти Наталка та Поліська 90 виокремлені як чутливі до посухи, оскільки незважаючи на посилення активності антиоксидантних ензимів у них спостерігається розвиток окиснювальних процесів та, ймовірно, окиснення пероксисом.

2. Встановлено, що дослідження вмісту пероксисом дозволяє здійснювати оцінку стану системи антиоксидантного захисту та здійснювати фенотипування рослин залежно від ступеню їх толерантності до стресу.

## РОЗДІЛ 7

### РЕГУЛЯЦІЯ АДАПТИВНИХ РЕАКЦІЙ РОСЛИН НАНОРОЗМІРНИМИ ЕЛЕМЕНТАМИ МІНЕРАЛЬНОГО ЖИВЛЕННЯ

Активний розвиток галузі нанотехнологій сприяє всебічному впровадженню нанорозмірних матеріалів у всіх областях сільського господарства, зокрема в рослинництві [207, 287]. Застосування нанорозмірних елементів мінерального живлення в якості мікродобрив та регуляторів адаптивних реакцій рослин в умовах мінливого навколишнього середовища видається перспективним. До рослинного організму наночастинки можуть надходити різними шляхами [288], а швидкість та ефективність їх поглинання залежить від розміру, форми, концентрації та їх поверхневого заряду [223, 289]. Вважається, що наночастинки есенціальних металів залучаються до різних метаболітичних процесів, включаючи фотосинтез, дихання та асиміляцію нітратів, що обумовлюється їх кофакторною функцією [22, 210].

Одним із механізмів компенсації негативного впливу посухи є застосування елементів мінерального живлення [290]. Перспективним у цьому напрямком є внесення нанодобрив у вигляді неіонних колоїдних наночастинок металів, однак впровадження подібних засобів поребує ретельного вивчення їх впливу на біологічні об'єкти. Зважаючи на дискусійність питання фітотоксичності нанорозмірних металів та їх впливу на агро- та природні екосистеми було проведено дослідження з використанням *Allium*-тесту, що дозволило з'ясувати вплив нанорозмірних Ag, Fe, Mn, Cu та Zn на ростові процеси та проліферативну активність клітин меристеми коренів *Allium cepa* (L.) [291–293]. Встановлено, що додавання у середовище культивування колоїдних розчинів нанорозмірних частинок мангану, заліза та міді впливає на приріст біомаси коренів цибулі. За умов дії наночастинок Mn спостерігали збільшення біомаси коренів на 30% порівняно з контролем. Розчини наночастинок з вмістом Fe та Cu, навпаки, пригнічували їх ріст на 46 та 77%

відповідно. Достовірних змін ростових параметрів коренів цибулі за умов застосування розчинів наночастинок Ag та Zn не виявлено. Оцінка фізіологічного стану рослинного організму за показниками індексу толерантності (ІТ), розрахованих за довжиною (рис. 7.1А) та масою коренів (рис. 7.1Б), свідчить про позитивну реакцію за умов застосування колоїдних розчинів наночастинок Mn, нейтральну – за впливу наночастинок Ag та Zn, негативну – за дії Fe та Cu.

Мікроскопічні дослідження свідчать про пригнічення проліферативної активності меристематичних клітин коренів цибулі за умов культивування рослин на середовищах, які містять наночастинок міді (86%), цинку (86%), срібла (42%) та заліза (32%), що вказує на їх потенційну фітотоксичність. Згідно наукової літератури [260], токсичний ефект наночастинок металів може обумовлюватися механічним пошкодженням поверхні клітин, закупорюванням пор клітинної стінки, індукцією виробництва АФК, а також вивільненням токсичних іонів металів. Аналіз отриманих результатів свідчить, що за потенційною цитотоксичністю досліджувані наночастинок металів слід розташувати наступним чином:  $Cu \geq Zn > Ag \geq Fe$ , тоді як розчин Mn-вмісних наночастинок достовірно не впливав на показник МІ.

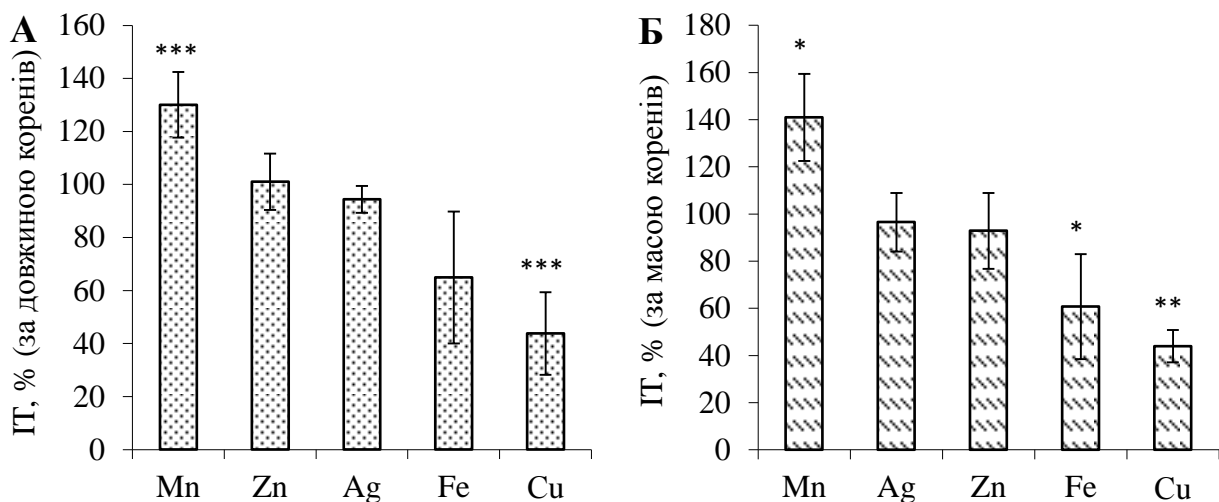


Рис. 7.1. Індекс толерантності (ІТ) *Allium cepa* L. за умов культивування на колоїдних розчинах металовмісних наночастинок, розрахований: А – за довжиною; Б – за масою коренів цибулі.  $M \pm SEM$ , \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$  у порівнянні з контролем

Відмінності у токсичності розчинів наночастинок з вмістом заліза та цинку, які відмічені при врахуванні показників приросту біомаси коренів та мітотичної активності їх клітин можна пояснити компенсаторними механізмами, а саме росту коренів розтягненням в умовах пригнічення швидкості поділу клітин [294].

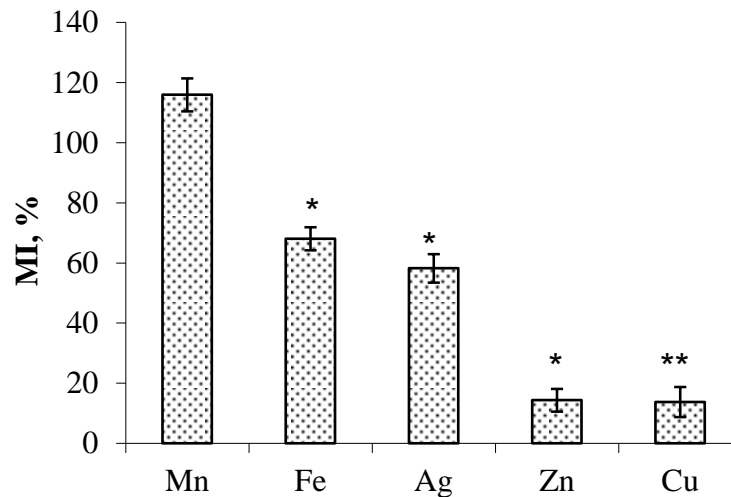


Рис. 7.2. Проліферативна активність клітин меристеми коренів цибулі за умов культивування на колоїдних розчинах металовмісних наночастинок.  $M \pm SEM$ , \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$

Отже, аналіз результатів, отриманих за допомогою *Allium*-тесту, свідчить, що наночастинок міді та цинку проявляють найбільш інгібуючий ефект серед досліджуваних мікроелементів. Однак обидва метали є важливими елементами мінерального живлення рослин. Вони входять до складу ключових ензимів білкового та вуглеводного метаболізму, беруть участь у процесах дихання та фотосинтезу. Дані літератури свідчать, що застосування цинку та міді в оптимізованих концентраціях сприяють ефективному поглинанню азоту, підвищенню урожайності та стійкості рослин до несприятливих факторів довкілля [295]. Застосування солей цинку та міді призводить до забруднення навколишнього середовища внаслідок накопичення цих металів в ґрунті, хоча дослідження Gupta та Kalra [206] демонструють, що навіть за високого вмісту міді (50 кг/га) та цинку (50 кг/га) у рослин пшениці ознак фітотоксичності та

зниження врожаю може не спостерігатися. Ступінь токсичності цих металів залежить також від рН ґрунту, що може впливати на мобільність елементів мінерального живлення та здатність коренів до їх абсорбції [296]. З іншої сторони, мікродобрива з низьким вмістом нанорозмірних металів можуть сприяти вирішенню проблеми надлишкової акумуляції полютантів в агроєкосистемах, при цьому вони здатні ефективно засвоюватися та підвищувати адаптаційні можливості організму рослин.

Наночастинки металів здатні проникати до рослинного організму різними шляхами, що розширює можливості їх застосування. Доступність нанорозмірних елементів мінерального живлення обумовлюється їх розмірами та фізичними властивостями [289]. Дослідження перерозподілу металів у тканинах рослин пшениці м'якої за умов обробки колоїдними розчинами наночастинок цих металів, опубліковане Taran et al. [288], показало здатність наночастинок металів проникати крізь оболонку насінини, а також виявило вплив способу обробки рослин на накопичення металів у коренях та надземній частині. Автори продемонстрували акумуляцію Cu у коренях проростків за умов передпосівної обробки насіння, тоді як вміст Zn значно накопичувався у надземній частині проростків. Разом з тим, дослідження Новицької [297] демонструють підвищення лабораторної схожості та енергії проростання цілого та травмованого насіння пшениці за обробки наночастинками Cu та Zn.

Зважаючи на важливу роль металів Cu та Zn в перебігу основних метаболітичних процесів рослинного організму та їх участь у складі СОД у формуванні захисних реакцій за умов окиснювального стресу, проведено дослідження впливу бінарної композиції нанорозмірних Cu та Zn на стан проростків сортів різних екотипів пшениці м'якої за умов посухи [298]. Показано, що посуха призводила до збільшення вмісту ТБК-активних продуктів у фотосинтетичних тканинах як у сорту Столична (на 27%), так і у сорту Акведук (на 30%), що свідчить про розвиток окиснювального стресу (рис. 7.3). При цьому, передпосівна обробка наночастинками металів не викликала збільшення вмісту ТБК-активних продуктів за оптимальних умов

зволоження, а за посухи викликала зниження їх вмісту в листах сорту Столична і сорту Аведук на 11 та 22% відносно контрольного варіанту, відповідно.

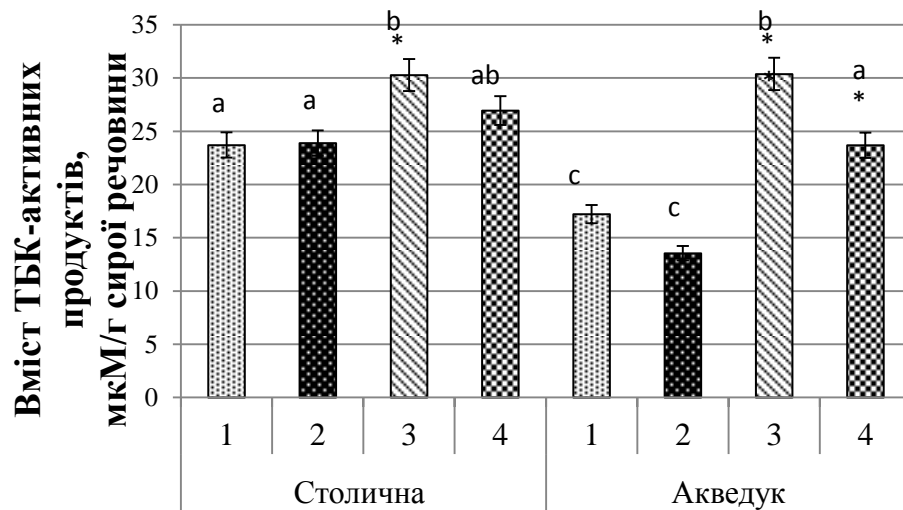


Рис. 7.3. Вміст ТБК-активних продуктів у листках рослин пшениці м'якої: 1 – контроль, обробка водою; 2 – передпосівна обробка насіння розчином наночасток Cu/Zn; 3 – посуха (вміст води в ґрунті 30% ПВ); 4 – передпосівна обробка насіння з подальшим вирощуванням за умов посухи (вміст води в ґрунті 30% ПВ).  $M \pm SEM$ , \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$  у порівнянні з контролем

Система захисту рослинного організму від надмірного накопичення АФК представлена сполуками ензиматичної та неензиматичної природи, що завдяки злагодженій роботі забезпечують внутрішньоклітинний окисно-відновний гомеостаз [44, 67]. Знешкодження супероксид аніон радикалу  $O_2^{\cdot -}$  відбувається за участі СОД, що є одним з основних антиоксидантних ензимів. Вважається, що обробка рослин наночастинками біогенних металів може модулювати активність СОД, оскільки кофактором різних ізоформ СОД можуть виступати Mn, Fe, Cu та Zn [71, 72]. Результати дослідження свідчать, що передпосівна обробка насіння колоїдними розчинами Cu, Zn-наночастинок не впливає на активність СОД досліджуваних сортів за оптимальних умов зволоження. Разом з тим, наночастинки металів опосередковують підвищення активності цього

ензиму у сорту Акведук за умов посухи на 27% порівняно з рослинами, що не підлягали обробці колоїдним розчином (рис. 7.4А).

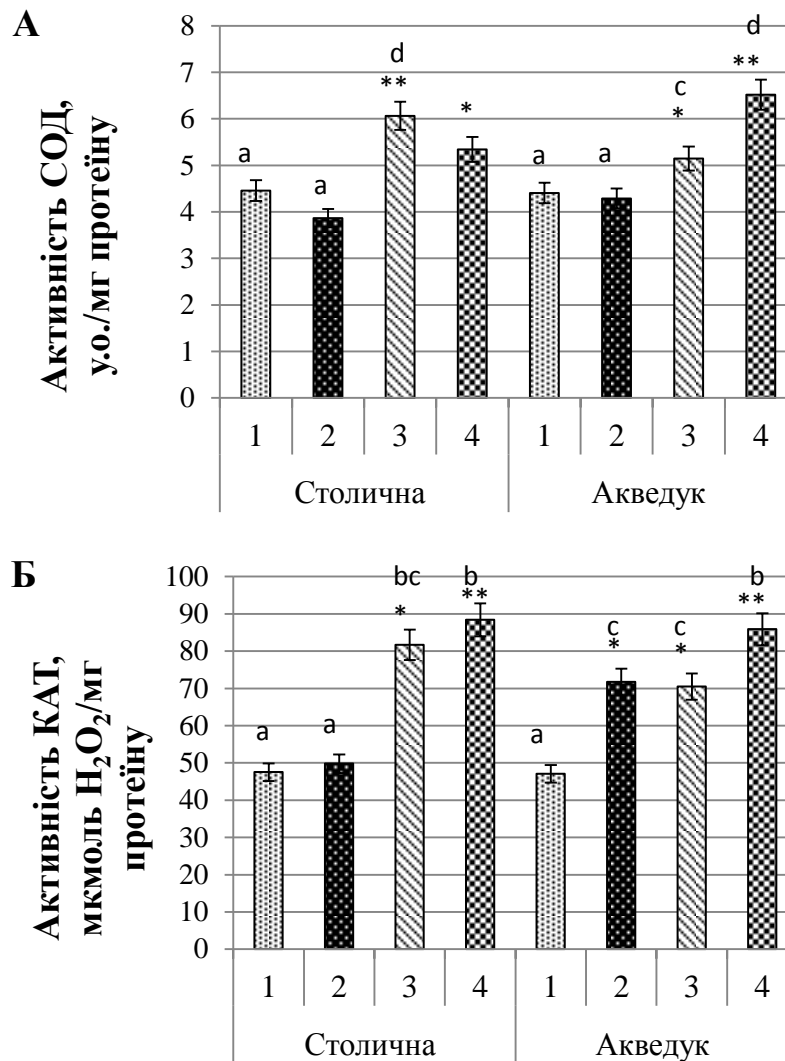


Рис. 7.4. Активність антиоксидантних ензимів СОД (А) та КАТ (Б): 1 – контроль, обробка водою; 2 – передпосівна обробка насіння розчином наночасток Cu+Zn; 3 – посуха (вміст води в ґрунті 30% ПВ); 4 – передпосівна обробка насіння з подальшим вирощуванням за умов посухи (вміст води в ґрунті 30% ПВ).  $M \pm SEM$ , \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$  у порівнянні з контролем

Основним продуктом реакції, яку каталізує СОД, є  $H_2O_2$ . Цей тип АФК може утворюватися у різних компартментах, а регуляція його внутрішньоклітинного вмісту відбувається за участі КАТ [78]. Як і СОД, КАТ є металовмісним ензимом, що, вірогідно, може проявляти чутливість до

екзогенної обробки наночастинками металів. Згідно результатів дослідження, змін активності КАТ сорту Столична за обробки бінарною композицією наночастинок металів не виявлено (рис. 7.4Б), тоді як у сорту Акведук наночастинки металів індукували збільшення активності цього ензиму на 21% за умов посухи в порівнянні з проростками, які вирощувались в умовах посухи, але без передпосівної обробки насіння наночастинками металів.

Отже, результати дослідження свідчать про те, що за обробки бінарною композицією наночастинок Cu та Zn негативний вплив посухи на рослинний організм зменшується, зокрема, через активацію ключових ензимів системи антиоксидантного захисту, що може бути пов'язано з безпосереднім залученням елементів Cu та Zn до ензиматичних реакцій рослин.

На відміну від контрольованих умов лабораторії, виокремити реакцію рослин на дію конкретного стресора в умовах агроценозу проблематично, що обумовлено одночасним впливом сукупності факторів довкілля. Формування толерантності рослин до несприятливих умов середовища може відбуватися шляхом крос-адаптації, що також ускладнює з'ясування механізмів, що лежать в основі пристосування рослин до конкретного стресора. З іншої сторони, підвищення загального адаптаційного потенціалу може підвищити толерантність рослин до окремих природних чинників. З метою вивчення впливу обробки розчинами наночастинок металів на фізіолого-біохімічний стан рослин у різні фази онтогенезу було досліджено стан антиоксидантної системи пшениці м'якої, вирощеної за умов агроценозу. Обробку наночастинками металів здійснювали шляхом передпосівного замочування насіння пшениці м'якої сорту Національна в колоїдному розчині суміші наночастинок металів.

Система антиоксидантного захисту передбачає залучення сполук ензиматичної та неензиматичної природи до знешкодження АФК, що утворюються внаслідок впливу численних стресорів довкілля та здатні спровокувати «окиснювальний вибух» в клітинах рослин [62, 66, 67, 70]. Антиоксидантна система характеризується динамічністю, швидкою реакцією

на зовнішні та внутрішні подразники та забезпечує адаптацію рослин до змінних умов навколишнього середовища. В процесі онтогенезу стан про-/антиоксидантної системи рослин може змінюватися, що опосередковується внутрішніми процесами росту та розвитку. З іншої сторони, застосування препаратів з вмістом наночастинок металів може посилити протекторну функцію організму шляхом регуляції роботи системи антиоксидантного захисту, особливо під час критичних фаз розвитку, коли рослини проявляють надмірну чутливість до факторів навколишнього середовища. Вважається, що наночастинок металів можуть бути кофакторами антиоксидантних ензимів [71, 72].

Контроль внутрішньоклітинного вмісту АФК здійснюється, зокрема, ГПО та КАТ, здатними розщеплювати  $H_2O_2$ , молекули якого є попередниками надзвичайно токсичного гідроксильного радикалу ( $OH^*$ ) [44]. Активність зазначених ензимів може відображати здатність організму контролювати розвиток окиснювальних процесів та визначає рівень стійкості рослин до впливу несприятливих факторів довкілля впродовж онтогенезу. Результати проведених нами досліджень свідчать про підвищену активність антиоксидантних ензимів у фазу трубкування рослин пшениці порівняно з кущінням та фазою виходу в трубку.

Разом з тим, обробка колоїдним розчином суміші наночастинок металів сприяла підвищенню активності ГПО та КАТ впродовж всього вегетаційного періоду порівняно з контролем. У фазу трубкування достовірно збільшення активності антиоксидантних ензимів у дослідних рослин може бути наслідком інтенсивнішого утворення АФК у клітинах. Так, активність ГПО у цю фазу розвитку зростала вдвічі (рис. 7.5Б), а КАТ – на 50% відносно варіанту, що не підлягав обробці наночастинками (рис. 7.5А).

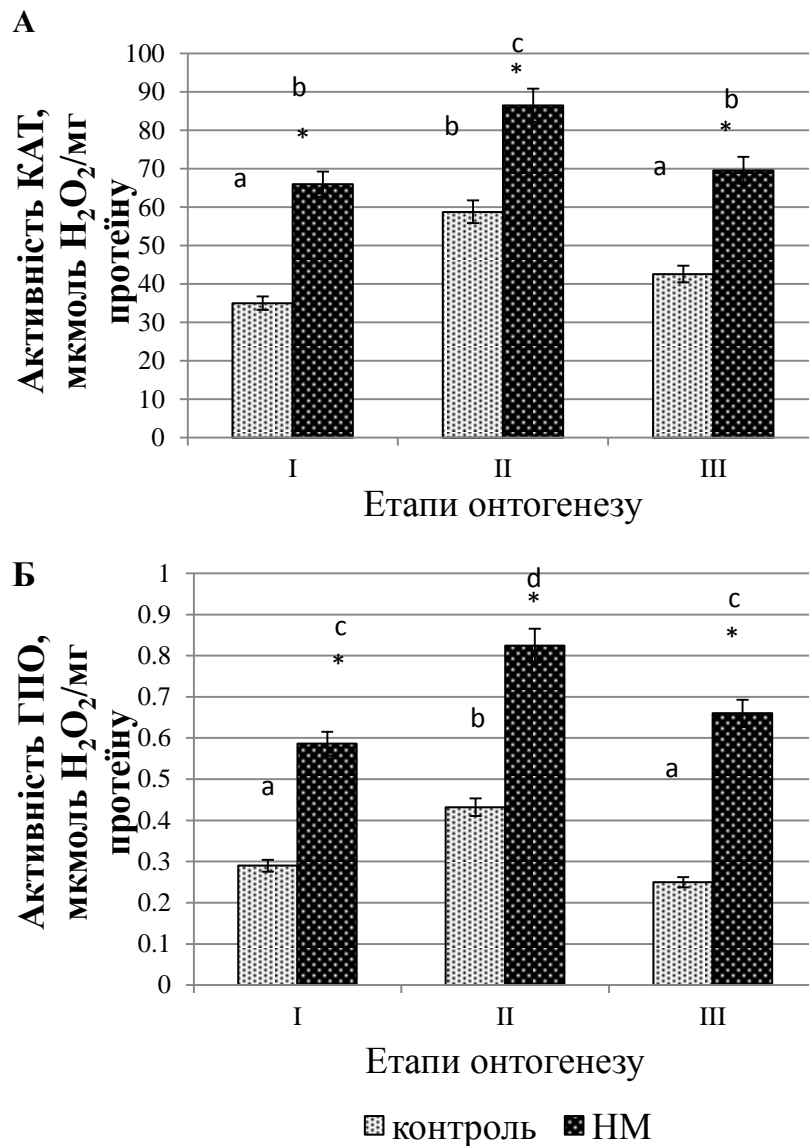


Рис. 7.5. Вплив обробки розчином суміші наночастинок металів (НМ) на активність антиоксидантних ензимів КАТ (А) та ГПО (Б) на різних етапах онтогенезу: I – кущіння; II – вихід у трубку; III – колосіння.  $M \pm SEM$ , \* -  $p < 0,05$  у порівнянні з контролем

Результати дослідження свідчать, що передпосівна обробка сумішшю наночастинок металів сприяє підвищенню урожаю пшениці м'якої (рис. 7.6), ймовірно, за рахунок непрямого впливу на метаболічні процеси, що ведуть до активації антиоксидантних ензимів і зниження окислювальних процесів та, як наслідок, сприяють адаптації рослин і покращенню показників продуктивності в умовах агроценозу. Отримані результати узгоджуються з результатами лабораторного експерименту.

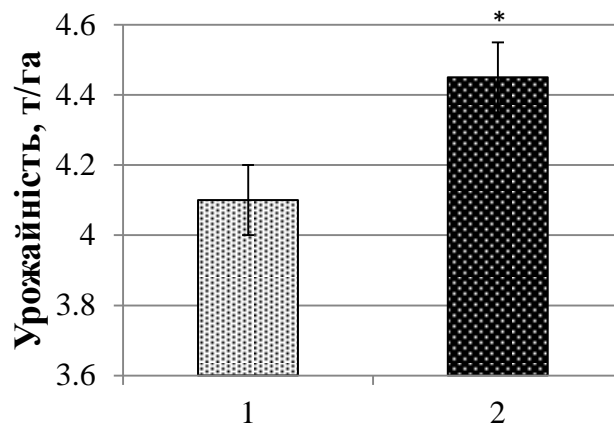


Рис. 7.6. Вплив обробки колоїдним розчином нанорозмірних елементів мінерального живлення на урожайність пшениці: 1 – контроль; 2 – обробка колоїдним розчином суміші наночастинок металів.  $M \pm SEM$ , \* -  $p < 0,05$  у порівнянні з контролем

Варто зауважити, що рослини різних видів можуть проявляти різний характер реакцій як на вплив стресорів, так і на підживлення мікроелементами. Для всебічного вивчення впливу наночастинок металів на адаптивні реакції рослин проведено дослідження з залученням дводольних рослин, а саме сої (*Glycine max*) та нуту (*Cicer arietinum*), за умов польового експерименту. Зважаючи на важливість виявлення оптимального способу застосування препаратів з вмістом наночастинок рослини сої сорту Аннушка піддавалися передвосівній обробці колоїдним розчином суміші наночастинок металів у рекомендованій виробником (120 мг/л) та подвійній концентрації (240 мг/л), а також комбінованій обробці (передпосівна + фоліарна) [299]. Продемонстровано, що фізіологічна реакція рослин сої за обробки колоїдним розчином суміші наночастинок металів дещо відмінна від реакції рослин пшениці. Встановлено, що за дії наночастинок металів у концентрації 120 мг/л відбувався розвиток окислювальних процесів, про що свідчить збільшення вмісту ТБК-активних продуктів у фотосинтетичних тканинах на 12%. У разі передпосівної обробки подвійною концентрацією (240 мг/л) суміші наночастинок металів спостерігали зниження окиснювальних процесів на 19%.

За передпосівної обробки досліджуваним розчином у поєднанні з наступною фоліарною обробкою також зафіксовано зменшення ТБК-активних продуктів на 10%.

Підвищення активності СОД спостерігали лише за обробки рослин наночастинками металів у концентрації 120 мг/л, при цьому активність КАТ знижувалась у всіх варіантах порівняно з контролем.

Таблиця 6.1

**Фізіолого-біохімічні показники та урожайність рослин сої  
за обробки наночастинками металів в умовах агроценозу**

| №* | ТБК-активні сполуки, мкмоль/г сирової речовини | Активність СОД, у.о./мг протеїну | Активність КАТ, мкмоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /мг протеїну | ФАС, у.о.     | Вміст хл а, мг/г | Вміст хл b, мг/г | Вміст каротиноїдів, мг/г | Урожайність, т/га |
|----|--|----------------------------------|---|---------------|------------------|------------------|--------------------------|-------------------|
| 1  | 79,82<br>±2,34                                 | 0,86<br>±0,04                    | 2,31<br>±0,11   | 0,28<br>±0,01 | 1,42<br>±0,03    | 0,74<br>±0,03    | 0,46<br>±0,02            | 2,45<br>±0,15     |
| 2  | 89,08<br>±4,51*                                | 0,93<br>±0,04*                   | 2,13<br>±0,13   | 0,25<br>±0,02 | 1,55<br>±0,07    | 0,79<br>±0,03    | 0,52<br>±0,03            | 2,46<br>±0,12     |
| 3  | 64,37<br>±3,34**                               | 0,8<br>±0,05                     | 1,48<br>±0,06*  | 0,2<br>±0,02* | 1,33<br>±0,04*   | 0,71<br>±0,02    | 0,43<br>±0,02            | 2,51<br>±0,11     |
| 4  | 71,98<br>±4,72*                                | 0,83<br>±0,03                    | 2,32<br>±0,11   | 0,3<br>±0,01* | 2,25<br>±0,06*   | 1,15<br>±0,03*   | 0,54<br>±0,03*           | 2,76<br>±0,12*    |

\* Примітка: варіанти обробки: 1 – контроль (обробка дистильованою водою); 2- передпосівна обробка насіння наночастинками металів у концентрації 120 мг/л; 3 – передпосівна обробка насіння наночастинками металів у концентрації 240 мг/л; 4 – передпосівна обробка насіння в поєднанні з фоліарною (шляхом розпилення на стадії бутонізації) розчином наночасток металів у концентрації 120 мг/л. M±SEM, \* - p<0,05, \*\* - p<0,01, \*\*\* - p<0,001 у порівнянні з контролем

Для оцінки збалансованості системи антиоксидантного захисту та характеристики адаптивних реакцій рослин було враховано фактор антиоксидантного стану. Найвище значення ФАС (0,3) спостерігали у рослин за подвійної обробки сумішшю наночастинок металів (передпосівною та

фоліарною) у концентрації 120 мг/л. Для цього варіанту характерне також значне збільшення вмісту хлорофілів *a* та *b*, тоді як за дії наночастинок металів у концентрації 240 мг/л спостерігали незначне зниження цього показника, що може бути результатом пошкоджень, викликаних через ймовірну токсичність високих доз наночастинок. Отримані результати свідчать, що обробка досліджуваним колоїдним розчином суміші наночастинок металів малих дозах та через певний проміжок часу є оптимальною для рослин в умовах агроценозу, а характер дії такої обробки можна розглядати як низькорівневий стресовий фактор, який сприяє розвитку адаптивних реакцій [299, 300].

Агроекосистема передбачає складну взаємодію між рослинами та різноманітними симбіотичними мікроорганізмами, які можуть суттєво впливати на ступінь урожайності сільськогосподарських культур. Застосування наночастинок металів, зокрема колоїдного розчину нанорозмірного молібдену (Mo), видається перспективним для збільшення ефективності обробки рослин мікробіологічними препаратами, оскільки Mo є центральним компонентом ключового ензиму процесу азотфіксації – нітрогенази. Дослідження Taran та ін. [301] свідчить позитивний вплив обробки колоїдним розчином суміші наночастинок металів (Cu, Zn, Fe, Mn) на кореневу мікрофлору рослин сої.

Для розширення уявлення щодо можливості використання наночастинок металів для регуляції процесу азотфіксації нами проведено дослідження впливу наночастинок Mo на розвиток адаптаційних реакцій рослин нуту за обробки мікробіологічним препаратом «Ризобофітом» [302]. Виявлено, що передпосівна обробка насіння нуту сорту Розанна наночастинками Mo не призводить до змін вмісту ТБК-активних сполук як у контрольному варіанті, так і за обробки мікробіологічним препаратом, що свідчить про відсутність розвитку окиснювальних процесів.

За результатами дослідження виявлено збільшення активності антиоксидантних ензимів СОД та КАТ за умов обробки наночастинок Mo та сумісної дії наночастинок Mo і мікробіологічного препарату. Варто зазначити,

що застосування лише мікробіологічного препарату сприяло зниженню цих показників на 20% та 60% відповідно. У варіанті з сумісною дією наночастинок Мо та мікробіологічного препарату ФАС мав найвище значення (0,7), найнижчий ФАС спостерігали у варіанті з обробкою препаратом «Різобофітом» (0,1). Отримані результати свідчать про те, що наночастки молібдену здатні активувати антиоксидантні ензими на фоні зменшення окисних процесів, що сприяє адаптації рослин [303].

Таблиця 6.2

**Фізіолого-біохімічні показники рослин нуту  
за обробки наночастинками молібдену в умовах агроценозу**

| № | ТБК-активні сполуки, мкмоль/г сирової речовини | Активність СОД, у.о./мг протеїну | Активність КАТ, мкмоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /мг протеїну | ФАС, у.о.       | Вміст хл <i>a</i> , мг/г | Вміст хл <i>b</i> , мг/г | Вміст каротиноїдів, мг/г |
|---|--|----------------------------------|---|-----------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 1 | 33,60<br>±0,95                                 | 11,5<br>±0,3                     | 0,64<br>±0,04   | 0,22<br>±0,01   | 1,09<br>±0,05            | 0,50<br>±0,02            | 0,41<br>±0,02            |
| 2 | 32,77<br>±2,28                                 | 12,92<br>±0,25                   | 1,33<br>±0,07*  | 0,52<br>±0,03** | 1,25<br>±0,06            | 0,58<br>±0,03            | 0,47<br>±0,04            |
| 3 | 28,43<br>±4,18                                 | 8,77<br>±0,18**                  | 0,26<br>±0,02*  | 0,1<br>±0,01*   | 0,79<br>±0,04*           | 0,36<br>±0,04*           | 0,30<br>±0,03*           |
| 4 | 30,25<br>±0,39*                                | 14,14<br>±0,06*##                | 1,59<br>±0,06*##  | 0,7<br>±0,04*## | 1,17<br>±0,05#           | 0,55<br>±0,02##          | 0,43<br>±0,03#           |

\* Примітка: варіанти обробки: 1 – контроль (обробка дистильованою водою); 2 – передпосівна обробка насіння нуту наночастинками молібдену; 3 – передпосівна обробка мікробіологічним препаратом Різобофітом; 4 – передпосівна обробка наночастинками молібдену та мікробіологічним препаратом Різобофітом.  $M \pm SEM$ , \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$  у порівнянні з контролем; # -  $p < 0,05$ , ## -  $p < 0,01$  у порівнянні з обробкою мікробіологічним препаратом

Оцінка стану фотосинтетичного апарату свідчить про те, що обробка наночастинками Мо сприяла збільшенню вмісту хлорофілів *a* та *b*, рівень каротиноїдів при цьому залишався на рівні контрольних значень. За обробки

мікробіологічним препаратом спостерігали зниження вмісту фотосинтетичних пігментів, що може негативно впливати на фотосинтетичну продуктивність. Варто зазначити, що обробка наночастинками Мо при застосуванні мікробіологічного препарату сприяла збереженню пулу хлорофілів, ймовірно, шляхом підтримання певного рівня каротиноїдів, здатних гасити збуджений стан хлорофілу та запобігати утворенню синглетного кисню та інших АФК [304]. Відомо, що Мо входить до складу багатьох ензимів (молібдоензимів), зокрема тих, що забезпечують асиміляцію азоту рослиною та беруть участь у його обміні в організмі [305]. Варто зауважити, що Мо є компонентом ксантиндегідрогенази, що відіграє опосередковану роль у захисті клітин від окиснювальних пошкоджень. Повідомляється, що ксантиноксидаза каталізує реакцію перетворення ксантину на сечову кислоту, що, в свою чергу, може брати участь у знешкодженні стрес-індукованих АФК клітин мезофілу [306].

Таким чином, результати дослідження вказують на непрямий вплив наночастинок Мо на метаболічні процеси, що ведуть до активації антиоксидантних ензимів та зниження окислювальних процесів, що сприяє адаптації рослин [302, 307].

### **Висновки до розділу:**

1. Виявлено, що наночастинки металів сприяють підтримці гомеостазу рослин шляхом індукції стійкості за рахунок природних захисних механізмів, зокрема активації антиоксидантних ензимів та підсиленням фотосинтезу за рахунок підвищення вмісту фотосинтетичних пігментів.
2. Обґрунтовано використання нанорозмірних частинок елементів мінерального живлення для регуляції адаптивного потенціалу рослин зернових та бобових культур, що сприяло підвищенню їх продуктивності.

3. Одержані результати є новітніми, розширюють існуючі уявлення про вплив нанопрепаратів на рослини, можуть слугувати теоретичною основою оптимізації вирощування сільськогосподарських культур за умов глобальних змін клімату, шляхом активації ендогенних механізмів неспецифічної стійкості для екологізації рослинництва.

## АНАЛІЗ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ ТА ЇХ УЗАГАЛЬНЕННЯ

Залежно від потужності, тривалості та сумісної дії з іншими стресорами, посуха може завдавати рослинному організму пошкоджень різного ступеню тяжкості, в т.ч. призводити до загибелі [8, 45]. Стрестолерантність рослин до посухи обумовлюється розвитком певних генетично детермінованих адаптивних механізмів. Ступінь стрестолерантності пов'язаний зі швидкістю сприйняття дії стресора, трансдукції стресового сигналу, експресії генів та запуску метаболітичних шляхів, залучених до формування захисних реакцій рослинного організму [40]. Для уникнення надмірної втрати води за дії посухи рослини накопичують значну кількість осмотичноактивних сполук [39, 102], а також захисних протеїнів, здатних забезпечувати стабільність інших білкових молекул та плазматичних мембран [150, 280]. Відомо, що імінокислота пролін може виконувати осмолітичну, шаперонну, прооксидантну та інші функції в клітинах рослин [107]. Результати нашого дослідження свідчать, що за умов пролонгованого осмотичного стресу пролін у коренях пшениці м'якої та двозернянки виступає в першу чергу в ролі осмолітика, оскільки його вміст збільшується в декілька разів. Коренева система безпосередньо контактує з середовищем, що має від'ємний осмотичний потенціал, а, отже, повинна забезпечити умови для збереження достатнього для перебігу метаболітичних процесів рівня оводненості тканин та унеможливити відтік води назад у навколишнє середовище. Отримані результати виявили відмінності у метаболізмі проліну за умов дії стресора у досліджуваних видів, про що свідчить відсутність достовірно значимих змін вмісту проліну в листках проростків пшениці м'якої на відміну від двозернянки, де цей показник збільшився у 7 разів. Продемонстровано, що за тривалого осмотичного стресу у проростків пшениці двозернянки накопичення проліну відбувається рівномірно у підземній та надземній частинах, тоді як вміст проліну у пшениці м'якої превалює у коренях. За короткотривалого осмотичного стресу пролін,

ймовірно, здебільшого виконує прооксидантну функцію і лише у проростках пшениці м'якої, оскільки у двозернянки він не накопичувався.

Результати дослідження вказують на різні стратегії осмотичної регуляції видів за умов пролонгованого осмотичного стресу, а характер розподілу проліну в проростках пшениці двозернянки може свідчити про більш досконалий механізм захисту рослин за умов посухи.

Пшениця м'яка та двозернянка відносяться до рослин з С3-типом фотосинтезу. Закриття продихів, спричинене посухою, призводить не лише до зменшення транспірації, але й до зменшення рівня  $\text{CO}_2$  у клітинах мезофілу, внаслідок чого відбувається пригнічення фотосинтезу та інтенсифікація фотодихання. З огляду на посилене утворення АФК, спричинене перерозподілом метаболітичних шляхів, важливою є підтримка внутрішньоклітинного редокс гомеостазу, що забезпечується регуляцією вмісту та активності антиоксидантних ензимів. З іншої сторони, здатність КАТ до внутрішньоклітинної регуляції вмісту  $\text{H}_2\text{O}_2$  обумовлює ймовірну участь цього ензиму у захисті рослин від надмірної втрати води за умов посухи шляхом регуляції роботи продихового апарату. Свідченням участі КАТ у АБК-опосередкованій регуляції продихів є дослідження Zou та ін. [308], де продемонстровано накопичення  $\text{H}_2\text{O}_2$  внаслідок деактивації КАТ3 рослин арабідопсису, спричиненої фосфорилуванням ензиму завдяки взаємодії з кальцій-залежною протеїнкіназою 8. Закриття продихів є однією з перших фізіологічних реакцій рослин на зниження доступної води в ґрунті [13], в т.ч. пшениці м'якої та двозернянки [248]. За результатами нашого дослідження продемонстровано участь КАТ у захисних реакціях рослин за посухи (модельованої ПЕГ або за умов вегетаційного досліду) та вказують на особливості функціональної активності цього ензиму у проростках та у прапорцевих листках пшениці м'якої у фазу цвітіння. Виявлено, що активність КАТ у прапорцевих листках стретолерантних сортів пшениці, таких як Подолянка та Астарта, за умов тривалої посухи у фазу цвітіння достовірно не змінюється. У сортів Наталка, Поліська 90 та Одеська 267 за даним

параметром спостерігали зміни різнонаправленого характеру. Вважається, що КАТ має відносно низьку чутливість до  $H_2O_2$  порівняно з іншими ензимами, здатними розщеплювати цей тип АФК [77]. У зв'язку з цим, основною функцією КАТ може бути знешкодження надмірної кількості накопиченого  $H_2O_2$ . З іншої сторони, аналіз отриманих результатів свідчить про інактивацію КАТ на фоні зростання  $H_2O_2$  у сорту Наталка. Відомо, що КАТ локалізована у різних компартментах клітини, проте найбільше цей ензим представлений у пероксисомах [21]. Таке розміщення обумовлено зосередженням тут багатьох ензимів, продуктом реакцій яких є  $H_2O_2$  [78]. Зниження активності КАТ у листках сорту Наталка, ймовірно, викликане деградацією пероксисом, що, в свою чергу, спричинена окиснювальним пошкодженням цих органел. Згідно Arel та Hirt [68], за умов зміни балансу ензимів, здатних знешкоджувати АФК, відбувається індукція компенсаторних механізмів, що попереджають розвиток окиснювального стресу. Зокрема, повідомляється, що при зниженні активності КАТ може підвищуватися активність АПО та глутатіонпероксидази. Подібну реакцію спостерігали у прапорцевих листках сорту Наталка за посухи у фазу цвітіння, що свідчить про порушення редокс-гомеостазу та чутливість сорту до впливу зазначеного стресора. Окрім того, отримані результати свідчать про наявність негативної кореляції між активністю АПО та КАТ.

За умов посухи у фазу цвітіння рослин спостерігали підвищення активності АПО спостерігали у всіх досліджуваних сортів пшениці м'якої, за винятком сорту Одеська 267. Вважається, що АПО, як компонент аскорбат-глутатіонового циклу, є ключовим ензимом знешкодження АФК у хлоропластах [87, 101], однак може функціонувати у цитозолі, мітохондріях і пероксисомах. Разом з тим, виявлено стійкий негативний кореляційний зв'язок між активністю АПО та асиміляцією  $CO_2$ .

У пшениці м'якої, за винятком сорту Дарунок Поділля, спостерігали конспецифічну реакцію на рівні активності КАТ та ГПО, що може свідчити про синергічну дію цих ензимів для подолання або попередження розвитку окиснювальних процесів.

Кореляційний аналіз між компонентами редокс-системи та фотосинтетичними параметрами дозволив виявити стійкий взаємозв'язок вмісту пероксисом,  $H_2O_2$  та ТБК-активних продуктів, що узгоджується з гіпотезою АФК-індукованої проліферації пероксисом. Виявлено позитивну кореляцію між вмістом пероксисом та вмістом ТБК-активних продуктів за дії посухи, що свідчить про розвиток окиснювальних процесів внутрішньоклітинних структур та, можливо, пероксисом безпосередньо. Важливу роль у знешкодженні  $H_2O_2$  у прапорцевих листках пшениці за умов пролонгованої дії посухи, ймовірно, відіграють пероксидази III класу, про що свідчить стійка негативна кореляція між активністю гваяколпероксидази та вмістом  $H_2O_2$ , вмістом ТБК-активних продуктів, а також вмістом пероксисом.

Варто зауважити, що оскільки переважна більшість окисно-відновних реакцій відбувається у пероксисомах, доцільним є вивчення стану про-/антиоксидантної системи у комплексі з дослідженням пероксисом. Результати нашого дослідження свідчать про перспективність застосування кількісного аналізу вмісту пероксисом для оцінки стрестолерантності рослин до посухи.

Зниження внутрішньоклітинного водного потенціалу призводить до конформаційних змін білкових молекул, що спричиняє інгібування ензиматичної активності та зміни метаболітичних процесів загалом. До збереження структури протеїнів за умов стресу залучені спеціалізовані сполуки, зокрема, численні дослідження вказують на шаперонну функцію дегідринів. В рослинному організмі дегідрини, що відносяться до LEA-протеїнів, синтезуються у відповідь на дію різних абіотичних стресорів та забезпечують стабілізацію мембран, захист деяких ензимів та беруть участь у знешкодженні активних форм кисню [143]. До класу дегідринів відноситься велика кількість протеїнів, що відрізняються за своєю структурою, основними функціями та швидкістю накопичення за умов стресу. Повідомляється, що максимум накопичення деяких дегідринів може спостерігатися навіть на 12 день після дії стресора [309]. У наукових публікаціях наводиться теза, що дегідрини можуть бути використані як маркер сортів, толерантних до

стресових навантажень, а ідентифікація окремих дегідринів може служити швидким та неруйнівним методом скринінгу сортів [309]. Ймовірно, швидкість накопичення дегідринів також може свідчити про ступінь толерантності рослин до осмотичного стресу. Результати нашого дослідження показали, що у пшениці м'якої сорту Фаворитка та пшениці двозернянки сорту Голіковська спостерігається накопичення різних дегідринів з молекулярною масою 57 та 30 кДа, відповідно. Підвищення вмісту різних дегідринів у відповідь на дію стресора може свідчити про різні адаптаційні стратегії цих видів. З іншої сторони, зниження вмісту обох дегідринів пшениці м'якої сорту Трипільська може свідчити про окиснення та/або нижчу швидкість синтезу цих протеїнів за умов стресу. Зміни вмісту дегідринів сорту Трипільська можуть свідчити про вищу чутливість до осмотичного стресу порівняно з іншими досліджуваними сортами.

За умов дегідратації клітин, зумовленої впливом посухи або осмотичним шоком, важливим є забезпечення стабільності плазматичної мембрани та її взаємодії з клітинною стінкою. Eriksson та ін. [166] виявили дегідрин Ltі30, здатний зв'язуватися з фосфоліпідними везикулами та агрегувати їх у макроскопічні надмолекулярні структури, а також зв'язуватися з мембраною, стабілізуючи їх. Регуляція симпластного потоку води та розчинених у ній іонів може здійснюватися шляхом відкладання калози поблизу плазмодесм [191, 275]. Активація процесів біосинтезу калози, ймовірно, зумовлює підвищення активності  $\beta$ -1,3-глюканаз, основною функцією яких є розщеплення  $\beta$ -1,3-глюканів. Взаємозв'язок синтезу та розщеплення калози вірогідно забезпечує колообіг глюкози, що разом з іншими розчинними цукрами може виконувати осмолітичну функцію, підтримуючи тургор клітини, а також захищаючи мембрани та протеїни за умов стресу. Згідно результатів нашого дослідження,  $\beta$ -1,3-глюканази з молекулярною масою 23 кДа беруть участь у формуванні захисних реакцій рослин за осмотичного стресу, про що свідчить збільшення їх активності у проростках пшениці двозернянки сорту Голіковська у 2 рази. У рослин пшениці м'якої змін активності  $\beta$ -1,3-глюканаз за умов стресу не

відбувалося, що свідчить про різні адаптаційні стратегії *T. aestivum* та *T. dicoccum*.

Типовим механізмом захисту за біотичного стресу є активація хітиназ, здатних розщеплювати N-ацетилглюкозамін – компонент клітинної стінки фітопатогенів. Підвищення активності рослинних хітиназ за впливу стресорів абіотичної природи, в т.ч. осмотичного шоку, може свідчити про участь цих ензимів у регуляції еластичності та оводненості клітинної стінки завдяки здатності розщеплювати арабіногалактанові протеїни. Згідно отриманих результатів, осмотичний стрес призводить до активації хітиназ проростків пшениці м'якої, в той час як ізоформи хітиназ пшениці двозернянки демонстрували різну реакцію за умов стресу. Так, у сорту Голіковська спостерігали підвищення активності лише у ізоформи з молекулярною масою 73 кДа, а активність хітиназ з 41 та 34 кДа пригнічувалась. Така реакція може свідчити про різну спеціалізацію окремих ізоформ хітиназ у формуванні адаптивних реакцій рослин пшениці двозернянки.

Регуляцію адаптивних реакцій за дії несприятливих чинників довкілля можливо здійснювати за допомогою елементів мінерального живлення, в т.ч. металів та їх оксидів нанорозмірного діапазону. Результати, представлені в науковій літературі, не дають однозначної відповіді щодо позитивного або негативного ефекту наночасток металів на рослинний організм, що свідчить про актуальність даної проблеми. Зазначається, що наночастки мають позитивні морфологічні ефекти, такі як підвищення темпів проростання насіння, поліпшення формування кореня та пагонів, а також накопичення рослинної біомаси багатьох культурних рослин. Вважається, що наночастинки есенціальних металів залучаються до різних метаболітичних процесів, включаючи фотосинтез, дихання та асиміляцію нітратів, що обумовлюється їх кофакторною функцією [22, 210]. Зважаючи на те, що до складу багатьох ензимів антиоксидантного захисту входять йони металів, обробка рослин колоїдними розчинами наночастинок цих металів може мати гормезисний ефект та сприяти індукції захисних реакцій, посилюючи стійкість рослин за

умов стресу, що підтверджують результати нашого дослідження. Виявлено, передпосівна обробка колоїдним розчином суміші наночастинок біогенних металів пшениці м'якої, чутливої до посухи, здійснювала протекторних ефект за умов пролонгованого осмотичного стресу, що проявлявся у зниженні вмісту ТБК-активних продуктів у листках та коренях проростків порівняно з варіантом без обробки. За результатами дослідження стану редокс-системи проростків пшениці м'якої та двозернянки в умовах модельованого осмотичного стресу показано, що передпосівна обробка наночастинками металів спричиняє протекторний ефект та сприяє відновленню активності КАТ в коренях сортів Трипільська та Фаворитка до рівня контрольного варіанту, нівелюючи інгібіторний ефект дії стресора. Відмічено, що застосування наночастинок металів сприяє також підтримці функціонального стану СОД у коренях рослин, активність якої значно пригнічувалась за умов модельованого осмотичного стресу. Варто зазначити, що польові дослідження також свідчать про індукцію активності антиоксидантних ензимів, що, ймовірно, забезпечує швидку та ефективну реакцію на вплив несприятливих чинників довкілля в умовах агроценозу та в результаті сприяє підвищенню урожайності пшениці м'якої. Разом з тим, здійснено дослідження впливу наночастинок металів на адаптивний потенціал рослин бобових культур в умовах агроценозу. Виявлено, що найбільш ефективною виявилась передпосівна обробка насіння колоїдним розчином суміші наночастинок металів у поєднанні з фоліарною у критичні фази розвитку рослин. Отримані результати дали можливість порівняти фізіолого-біохімічні реакції рослин пшениці м'якої на дію наночастинок металів з такими у інших сільськогосподарських культур та з'ясувати найбільш ефективні способи підвищення стрестолерантності рослин з перспективою їх подальшого використання у агровиробництві.

Отже, аналіз отриманих результатів дозволяє стверджувати, що наночастинки металів впливають на ростові процеси, можуть виступати індукторами захисних реакцій, зокрема ензиматичної ланки антиоксидантного захисту.

## ВИСНОВКИ:

У роботі наведені і обґрунтовані стратегії стрестолерантності до посухи сортів пшениці м'якої (*T. aestivum*) та пшениці двозернянки (*T. dicoccum*). Показано фізіолого-біохімічні особливості формування стрестолерантності досліджуваних сортів за умов короткотривалого та довготривалого впливу стресового чинника, на ранніх етапах розвитку та в процесі онтогенезу.

1. Розроблена модельна система осмотичного стресу на основі поліетиленгліколю дозволяє провести скринінг сортів пшениці за рівнем їх посухостійкості.
2. Показано, що сорти пшениці м'якої є більш чутливими до дії посухи порівняно з рослинами пшениці двозернянки, що свідчить про різновекторність стратегій підтримки окиснювального гомеостазу, обумовлених різною активністю низько- (пролін) та високомолекулярних (антиоксидантні ензими) сполук.
3. Виявлено індукцію активності хітиназ рослин пшениці м'якої за дії посухи.
4. Встановлено підвищення активності  $\beta$ -1,3-глюканаз з молекулярною масою 51 кДа у проростків пшениці двозернянки за умов посухи.
5. З'ясовано, що у посухостійкого сорту пшениці м'якої превалює накопичення дегідринів з молекулярною масою 57 кДа, а у сорту двозернянки – 30 кДа.
6. Оцінка ступеню проліферації пероксисом як компартменту, в якому локалізовані ключові компоненти системи редокс-гомеостазу, відображає ступінь залучення цих органел у формування відповіді на стресові умови та може бути використана для характеристики стрестолерантності рослин до посухи згідно підходів, що покладені в основу біохімічного фенотипування.
7. З'ясовано особливості регуляції стрестолерантності пшениці до посухи нанорозмірними елементами мінерального живлення. Обробка рослин наночастинками металів сприяє активації системи антиоксидантного

захисту та дозволяє зменшити прояви окиснювальних процесів, що є невід'ємними наслідками дії посухи.

8. Обґрунтовано використання нанорозмірних частинок біогенних металів для регуляції адаптивного потенціалу рослин в умовах агроценозу, що сприяло підвищенню продуктивності зернових культур.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Tuteja N, Gill SS, editors. Climate change and plant abiotic stress tolerance. 1. ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2014.
2. Pereira A. Plant Abiotic Stress Challenges from the Changing Environment. *Frontiers in Plant Science* [Internet]. 2016;7. Доступно на: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2016.01123/abstract>
3. Проценко ДФ, Кириченко ФГ, Мусиенко НН, Славный ПС. Засухоустойчивость озимой пшеницы. М.: Колос; 1975. 240 р.
4. Мусиенко НН, Капля АВ, Оканенко АА, Славный ПС. Жаростойкость и продуктивность озимой пшеницы. К.: Вища школа; 1985. 192 с.
5. Таран НЮ. Адаптаційний синдром рослин в умовах посухи. [Київ]: Автореф. дис... д-ра біол. наук: 03.00.12. Київський національний університет імені Тараса Шевченка; 2001.
6. Umezawa T, Fujita M, Fujita Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. *Current Opinion in Biotechnology*. 2006;17(2):113–22.
7. Valliyodan B, Nguyen HT. Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 2006;9(2):189–95.
8. Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA. Plant Drought Stress: Effects, Mechanisms and Management. In: Lichtfouse E, Navarrete M, Debaeke P, Véronique S, Alberola C, editors. *Sustainable Agriculture* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2009. p. 153–88. Доступно на: [http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-90-481-2666-8\\_12](http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-90-481-2666-8_12)
9. Farooq M, Hussain M, Siddique KHM. Drought Stress in Wheat during Flowering and Grain-filling Periods. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2014;33(4):331–49.

10. Foyer CH, Shigeoka S. Understanding Oxidative Stress and Antioxidant Functions to Enhance Photosynthesis. *PLANT PHYSIOLOGY*. 2011;155(1):93–100.

11. Blum A. Crop responses to drought and the interpretation of adaptation. In: Belhassen E, editor. *Drought Tolerance in Higher Plants: Genetical, Physiological and Molecular Biological Analysis* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 1996. p. 57–70. Доступно на: [http://link.springer.com/10.1007/978-94-017-1299-6\\_8](http://link.springer.com/10.1007/978-94-017-1299-6_8)

12. Ford KL, Cassin A, Bacic A. Quantitative Proteomic Analysis of Wheat Cultivars with Differing Drought Stress Tolerance. *Frontiers in Plant Science* [Internet]. 2011;2. Доступно на: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2011.00044/abstract>

13. Kosová K, Urban MO, Vítámvás P, Prášil IT. Drought Stress Response in Common Wheat, Durum Wheat, and Barley: Transcriptomics, Proteomics, Metabolomics, Physiology, and Breeding for an Enhanced Drought Tolerance. In: Hossain MA, Wani SH, Bhattacharjee S, Burritt DJ, Tran L-SP, editors. *Drought Stress Tolerance in Plants, Vol 2* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 277–314. Доступно на: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-32423-4\\_11](http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-32423-4_11)

14. Tardieu F. Any trait or trait-related allele can confer drought tolerance: just design the right drought scenario. *Journal of Experimental Botany*. 2012;63(1):25–31.

15. Parent B, Bonneau J, Maphosa L, Kovalchuk A, Langridge P, Fleury D. Quantifying Wheat Sensitivities to Environmental Constraints to Dissect Genotype × Environment Interactions in the Field. *Plant Physiology*. 2017;174(3):1669–82.

16. Tardieu F, Schurr U. White paper on plant phenotyping. In: *EPSO Workshop* [Internet]. 2009.

Доступно на: <http://www.plantphenomics.com/phenotyping2009>

17. Dhondt S, Wuyts N, Inzé D. Cell to whole-plant phenotyping: the best is yet to come. *Trends in Plant Science*. 2013;18(8):428–39.

18. Großkinsky DK, Svensgaard J, Christensen S, Roitsch T. Plant phenomics and the need for physiological phenotyping across scales to narrow the genotype-to-phenotype knowledge gap. *Journal of Experimental Botany*. 2015;66(18):5429–40.
19. Roessner U, Willmitzer L, Fernie A. Metabolic profiling and biochemical phenotyping of plant systems. *Plant Cell Reports*. 2002;21(3):189–96.
20. Yves G, Dominique R, Catherine D, Stphane B, Annick M. New Opportunities in Metabolomics and Biochemical Phenotyping for Plant Systems Biology. In: Roessner U, editor. *Metabolomics* [Internet]. InTech; 2012. Доступно на: <http://www.intechopen.com/books/metabolomics/new-opportunities-in-metabolomics-and-biochemical-phenotyping-for-plant-systems-biology>
21. Smertenko A. Can Peroxisomes Inform Cellular Response to Drought? *Trends in Plant Science*. 2017;22(12):1005–7.
22. Nair R. Effects of Nanoparticles on Plant Growth and Development. In: Kole C, Kumar DS, Khodakovskaya MV, editors. *Plant Nanotechnology* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 95–118. Доступно на: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-42154-4\\_5](http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-42154-4_5)
23. Khan MN, Mobin M, Abbas ZK, AlMutairi KA, Siddiqui ZH. Role of nanomaterials in plants under challenging environments. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2017;110:194–209.
24. Beckles DM, Thitisaksakul M. How environmental stress affects starch composition and functionality in cereal endosperm. *Starch - Stärke*. 2014;66(1–2):58–71.
25. Thitisaksakul M, Jiménez RC, Arias MC, Beckles DM. Effects of environmental factors on cereal starch biosynthesis and composition. *Journal of Cereal Science*. 2012;56(1):67–80.
26. Fábíán A, Jäger K, Rakszegi M, Barnabás B. Embryo and endosperm development in wheat (*Triticum aestivum* L.) kernels subjected to drought stress. *Plant Cell Reports*. 2011;30(4):551–63.

27. Singh S, Singh G, Singh P, Singh N. Effect of water stress at different stages of grain development on the characteristics of starch and protein of different wheat varieties. *Food Chemistry*. 2008;108(1):130–9.
28. Balla K, Rakszegi M, Li Z, Békés F, Bencze S, Veisz O. Quality of winter wheat in relation to heat and drought shock after anthesis. *Czech Journal of Food Sciences*. 2011;29(No. 2):117–28.
29. Dai Z, Yin Y, Wang Z. Starch Granule Size Distribution from Seven Wheat Cultivars Under Different Water Regimes. *Cereal Chemistry Journal*. 2009;86(1):82-7.
30. van de Wouw M, Kik C, van Hintum T, van Treuren R, Visser B. Genetic erosion in crops: concept, research results and challenges. *Plant Genet Res*. 2010;8(1):1–15.
31. Lopes MS, El-Basyoni I, Baenziger PS, Singh S, Royo C, Ozbek K, et al. Exploiting genetic diversity from landraces in wheat breeding for adaptation to climate change. *EXBOTJ*. 2015;66(12):3477–86.
32. Stagnari F, Codianni P, Pisante M. Agronomic and kernel quality of ancient wheats grown in central and Southern Italy. *Cereal Research Communications*. 2008;36(2):313–26.
33. Peng JH, Sun D, Nevo E. Domestication evolution, genetics and genomics in wheat. *Mol Breeding*. 2011;28(3):281–301.
34. Бабенко ЛМ, Рожков РВ, Парій ЯФ, Парій МФ, Водка МВ, Косаківська ІВ. *Triticum dicoccum* (Schrank) Schuebl.: походження, біологічна характеристика й перспективи використання в селекції та сільському господарстві. *Вісник Харківського національного аграрного університету Серія: Біологія*. 2017;(2):92–102.
35. Державний реєстр сортів рослин, придатних для поширення в Україні (чинний станом на 20.08.2018). Міністерство аграрної політики і продовольства України. К.; 2018. 467 р.

36. Liu H, Meng J, Bo W, Cheng D, Li Y, Guo L, et al. Biodiversity management of organic farming enhances agricultural sustainability. *Sci Rep.* 2016;6(1):23816.
37. Chaves MM. How Plants Cope with Water Stress in the Field? Photosynthesis and Growth. *Annals of Botany.* 2002;89(7):907–16.
38. Tan Y, Liang Z, Shao H, Du F. Effect of water deficits on the activity of anti-oxidative enzymes and osmoregulation among three different genotypes of *Radix Astragali* at seeding stage. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2006;49(1):60–5.
39. Blum A. Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production: Osmotic adjustment and plant production. *Plant, Cell & Environment.* 2017;40(1):4–10.
40. Lata C, Muthamilarasan M, Prasad M. Drought Stress Responses and Signal Transduction in Plants. In: Pandey GK, editor. *Elucidation of Abiotic Stress Signaling in Plants* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2015. p. 195–225. Доступно на: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-2540-7\\_7](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-2540-7_7)
41. Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany.* 2006;58(2):221–7.
42. Singh M, Kumar J, Singh S, Singh VP, Prasad SM. Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology.* 2015;14(3):407–26.
43. Csiszár J, Gallé Á, Horváth E, Dancsó P, Gombos M, Váry Z, et al. Different peroxidase activities and expression of abiotic stress-related peroxidases in apical root segments of wheat genotypes with different drought stress tolerance under osmotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry.* 2012;52:119–29.
44. Suzuki N, Koussevitzky S, Mittler R, Miller G. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress: ROS and redox signalling in plants. *Plant, Cell & Environment.* 2012;35(2):259–70.

45. Zandalinas SI, Mittler R, Balfagón D, Arbona V, Gómez-Cadenas A. Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. *Physiologia Plantarum*. 2018;162(1):2–12.
46. Rampino P, Pataleo S, Gerardi C, Mita G, Perrotta C. Drought stress response in wheat: physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. *Plant, Cell and Environment*. 2006;29(12):2143–52.
47. Osakabe Y, Osakabe K, Shinozaki K, Tran L-SP. Response of plants to water stress. *Frontiers in Plant Science* [Internet]. 2014;5. Доступно на: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00086/abstract>
48. Levitt J. Responses of plants to environmental stresses. Volume II. Water, radiation, salt, and other stresses. 2nd ed. New York: Academic Press.; 1980. 607 p.
49. Møller IM, Jensen PE, Hansson A. Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants. *Annual Review of Plant Biology*. 2007;58(1):459–81.
50. Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*. 2012;2012:1–26.
51. Shakirova F, Allagulova C, Maslennikova D, Fedorova K, Yuldashev R, Lubyanova A, et al. Involvement of dehydrins in 24-epibrassinolide-induced protection of wheat plants against drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2016;108:539–48.
52. Pirasteh-Anosheh H, Saed-Moucheshi A, Pakniyat H, Pessarakli M. Stomatal responses to drought stress. In: Ahmad P, editor. *Water Stress and Crop Plants* [Internet]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2016. p. 24–40. Доступно на: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781119054450.ch3>
53. Peltzer D, Dreyer E, Polle A. Differential temperature dependencies of antioxidative enzymes in two contrasting species: *Fagus sylvatica* and *Coleus blumei*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2002;40(2):141–50.
54. Miller EW, Dickinson BC, Chang CJ. Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(36):15681–6.

55. del Rio LA. Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species in Peroxisomes. Production, Scavenging, and Role in Cell Signaling. *PLANT PHYSIOLOGY*. 2006;141(2):330–5.
56. Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, Vandepoele K, et al. ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science*. 2011;16(6):300–9.
57. Mittler R. ROS Are Good. *Trends in Plant Science*. 2017;22(1):11–9.
58. Bhattacharjee S. The Language of Reactive Oxygen Species Signaling in Plants. *Journal of Botany*. 2012;2012:1–22.
59. Foyer CH, Noctor G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum*. 2003;119(3):355–64.
60. Miller G, Schlauch K, Tam R, Cortes D, Torres MA, Shulaev V, et al. The Plant NADPH Oxidase RBOHD Mediates Rapid Systemic Signaling in Response to Diverse Stimuli. *Science Signaling*. 2009;2(84):ra45–ra45.
61. Ślesak I, Libik M, Karpinska B, Karpinski S, Miszalski Z. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. *Acta Biochimica Polonica*. 2007;54(1):39–50.
62. Halliwell B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *PLANT PHYSIOLOGY*. 2006;141(2):312–22.
63. Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, van de Cotte B, Morsa S, Ravanat J-L, et al. Extranuclear protection of chromosomal DNA from oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(4):1711–6.
64. Matsuda Y, Okuda T, Sagisaka S. Regulation of Protein Synthesis by Hydrogen Peroxide in Crowns of Winter Wheat. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 1994;58(5):906–9.
65. Desikan R. Regulation of the Arabidopsis Transcriptome by Oxidative Stress. *PLANT PHYSIOLOGY*. 2001;127(1):159–72.
66. Mittova V, Volokita M, Guy M. Antioxidative Systems and Stress Tolerance: Insight from Wild and Cultivated Tomato Species. In: Gupta KJ,

Igamberdiev AU, editors. Reactive Oxygen and Nitrogen Species Signaling and Communication in Plants [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 89–131. Доступно на: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-10079-1\\_6](http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-10079-1_6)

67. Foyer CH. Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses. *THE PLANT CELL ONLINE*. 2005;17(7):1866–75.

68. Apel K, Hirt H. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*. 2004;55(1):373–99.

69. Nishimura MT, Dangl JL. Arabidopsis and the plant immune system. *The Plant Journal*. 2010;61(6):1053–66.

70. Gill SS, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2010;48(12):909–30.

71. Magliozzi S, editor. Superoxide dismutase: structure, synthesis and applications. New York: Nova Science Publishers; 2018. 162 p. (Chemistry research and applications series).

72. Huseynova IM, Aliyeva DR, Aliyev JA. Subcellular localization and responses of superoxide dismutase isoforms in local wheat varieties subjected to continuous soil drought. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2014;81:54–60.

73. Sheoran S, Thakur V, Narwal S, Turan R, Mamrutha HM, Singh V, et al. Differential Activity and Expression Profile of Antioxidant Enzymes and Physiological Changes in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Under Drought. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2015;177(6):1282–98.

74. Correa-Aragunde N, Foresi N, Delledonne M, Lamattina L. Auxin induces redox regulation of ascorbate peroxidase 1 activity by S-nitrosylation/denitrosylation balance resulting in changes of root growth pattern in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*. 2013;64(11):3339–49.

75. Sharma A, Dhuria N, Rakhra G, Mamik S. Accumulation of water stress-responsive class-III type of boiling stable peroxidases (BsPOD) in different cultivars of wheat (*Triticum aestivum*). *Acta Biologica Szegediensis*. 2014;58(2):115–22.

76. Cosio C, Vuillemin L, De Meyer M, Kevers C, Penel C, Dunand C. An anionic class III peroxidase from zucchini may regulate hypocotyl elongation through its auxin oxidase activity. *Planta*. 2009;229(4):823–36.

77. Cuypers A, Karen S, Jos R, Kelly O, Els K, Tony R, et al. The cellular redox state as a modulator in cadmium and copper responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Journal of Plant Physiology*. 2011;168(4):309–16.

78. Mhamdi A, Noctor G, Baker A. Plant catalases: Peroxisomal redox guardians. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2012;525(2):181–94.

79. Su T, Shao Q, Wang P, Ma C. Oxidative Stress and its Role in Peroxisome Homeostasis in Plants. In: Gupta DK, Palma JM, Corpas FJ, editors. *Redox State as a Central Regulator of Plant-Cell Stress Responses* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 117–36. Доступно на: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-44081-1\\_6](http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-44081-1_6)

80. Ozkur O, Ozdemir F, Bor M, Turkan I. Physiochemical and antioxidant responses of the perennial xerophyte *Capparis ovata* Desf. to drought. *Environmental and Experimental Botany*. 2009;66(3):487–92.

81. Wang W-B, Kim Y-H, Lee H-S, Kim K-Y, Deng X-P, Kwak S-S. Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2009;47(7):570–7.

82. de Pinto MC, Locato V, Sgobba A, Romero-Puertas M d. C, Gadaleta C, Delledonne M, et al. S-Nitrosylation of Ascorbate Peroxidase Is Part of Programmed Cell Death Signaling in Tobacco Bright Yellow-2 Cells. *PLANT PHYSIOLOGY*. 2013;163(4):1766–75.

83. Bauwe H, Hagemann M, Kern R, Timm S. Photorespiration has a dual origin and manifold links to central metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*. 2012;15(3):269–75.

84. Voss I, Sunil B, Scheibe R, Raghavendra AS. Emerging concept for the role of photorespiration as an important part of abiotic stress response. Weber A, editor. *Plant Biology*. 2013;15(4):713–22.

85. Faize M, Burgos L, Faize L, Piqueras A, Nicolas E, Barba-Espin G, et al. Involvement of cytosolic ascorbate peroxidase and Cu/Zn-superoxide dismutase for improved tolerance against drought stress. *Journal of Experimental Botany*. 2011;62(8):2599–613.

86. Luna CM. Drought controls on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. *Journal of Experimental Botany*. 2004;56(411):417–23.

87. Mittler R, Zilinskas BA. Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. *The Plant Journal*. 1994;5(3):397–405.

88. Rubio MC, Gonzalez EM, Minchin FR, Webb KJ, Arrese-Igor C, Ramos J, et al. Effects of water stress on antioxidant enzymes of leaves and nodules of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutases. *Physiologia Plantarum*. 2002;115(4):531–40.

89. Jiang M. Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *Journal of Experimental Botany*. 2002;53(379):2401–10.

90. Guo Z, Ou W, Lu S, Zhong Q. Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2006;44(11–12):828–36.

91. Willekens H. Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C3 plants. *The EMBO Journal*. 1997;16(16):4806–16.

92. Ajithkumar IP, Panneerselvam R. ROS Scavenging System, Osmotic Maintenance, Pigment and Growth Status of *Panicum sumatrense* Roth. Under Drought Stress. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2014;68(3):587–95.

93. Mittova V. Salinity up-regulates the antioxidative system in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Journal of Experimental Botany*. 2004;55(399):1105–13.

94. Fini A, Guidi L, Ferrini F, Brunetti C, Di Ferdinando M, Biricolli S, et al. Drought stress has contrasting effects on antioxidant enzymes activity and phenylpropanoid biosynthesis in *Fraxinus ornus* leaves: An excess light stress affair? *Journal of Plant Physiology*. 2012;169(10):929–39.

95. Ehsanpour AA, Zarei S, Abbaspour J. The role of over expression of P5CS gene on proline, catalase, ascorbate peroxidase activity and lipid peroxidation of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plant under in vitro drought stress. *Journal of Cell and Molecular Research* [Internet]. 2012 Sep;(1). Доступно на: <http://jcmr.um.ac.ir/index.php/biology/article/view/18249>

96. Kanwischer M. Alterations in Tocopherol Cyclase Activity in Transgenic and Mutant Plants of Arabidopsis Affect Tocopherol Content, Tocopherol Composition, and Oxidative Stress. *PLANT PHYSIOLOGY*. 2005;137(2):713–23.

97. de Pinto MC. Changes in the ascorbate metabolism of apoplastic and symplastic spaces are associated with cell differentiation. *Journal of Experimental Botany*. 2004;55(408):2559–69.

98. Potters G. Dehydroascorbate Influences the Plant Cell Cycle through a Glutathione-Independent Reduction Mechanism. *PLANT PHYSIOLOGY*. 2004;134(4):1479–87.

99. Tokunaga T, Miyahara K, Tabata K, Esaka M. Generation and properties of ascorbic acid-overproducing transgenic tobacco cells expressing sense RNA for l-galactono-1,4-lactone dehydrogenase. *Planta*. 2005;220(6):854–63.

100. Agami RA. Applications of ascorbic acid or proline increase resistance to salt stress in barley seedlings. *Biologia Plantarum*. 2014;58(2):341–7.

101. Rizhsky L, Hallak-Herr E, Van Breusegem F, Rachmilevitch S, Barr JE, Rodermel S, et al. Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. *The Plant Journal*. 2002;32(3):329–42.

102. Iqbal N, Nazar R, A. Khan N, editors. *Osmolytes and Plants Acclimation to Changing Environment: Emerging Omics Technologies* [Internet]. New Delhi: Springer India; 2016. Доступно на: <http://link.springer.com/10.1007/978-81-322-2616-1>
103. Sami F, Yusuf M, Faizan M, Faraz A, Hayat S. Role of sugars under abiotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2016;109:54–61.
104. Bhaskara GB, Yang T-H, Verslues PE. Dynamic proline metabolism: importance and regulation in water limited environments. *Frontiers in Plant Science* [Internet]. 2015;6. Доступно на: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2015.00484/abstract>
105. Heuer B. Role of Proline in Plant Response to Drought and Salinity. In: Pessaraki M, editor. *Handbook of Plant and Crop Stress, Third Edition* [Internet]. CRC Press; 2010. p. 213–38. Доступно на: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/b10329-12>
106. Колупаев ЮЕ, Карпец ЮВ. *Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров*. Основа. Киев; 2010. 352 с.
107. Колупаев ЮЕ, Вайнер АА, Ястреб ТО. Пролин: физиологические функции и регуляция содержания в растениях в стрессовых условиях. *Вісник Харківського національного аграрного університету: Серія біологія*. 2014;2(32):6–22.
108. Ben Rejeb K, Abdelly C, Savouré A. How reactive oxygen species and proline face stress together. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2014;80:278–84.
109. Vass I, Ateeq ur Rehman. The activity of proline as singlet oxygen and superoxide scavenger. *Free Radical Biology and Medicine*. 2018;120:75–6.
110. Bandurska H. Does proline accumulated in leaves of water deficit stressed barley plants confine cell membrane injury? I. Free proline accumulation and membrane injury index in drought and osmotically stressed plants. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2000;22(4):409–15.

111. Maggio A, Miyazaki S, Veronese P, Fujita T, Ibeas JI, Damsz B, et al. Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? *The Plant Journal*. 2002;31(6):699–712.
112. Ahmed AAM, Roosens N, Dewaele E, Jacobs M, Angenon G. Overexpression of a novel feedback-desensitized  $\Delta$ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline accumulation and confers salt tolerance in transgenic *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2015;122(2):383–93.
113. Surender Reddy P, Jogeswar G, Rasineni GK, Maheswari M, Reddy AR, Varshney RK, et al. Proline over-accumulation alleviates salt stress and protects photosynthetic and antioxidant enzyme activities in transgenic sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2015;94:104–13.
114. Moustakas M, Sperdouli I, Kouna T, Antonopoulou C-I, Therios I. Exogenous proline induces soluble sugar accumulation and alleviates drought stress effects on photosystem II functioning of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Growth Regulation*. 2011;65(2):315–25.
115. Farooq M, Nawaz A, Chaudhry MAM, Indrasti R, Rehman A. Improving resistance against terminal drought in bread wheat by exogenous application of proline and gamma-aminobutyric acid. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 2017;203(6):464–72.
116. Hasan M, Kibria M, Jahiruddin M, Murata Y, Hoque M. Improvement of Salt Tolerance in Maize by Exogenous Application of Proline. *Journal of Environmental Science and Natural Resources*. 2015;8(1):13.
117. Butt M, Ayyub CM, Amjad M, Ahmad R. Proline application enhances growth of chilli by improving physiological and biochemical attributes under salt stress. *The Pakistan Journal of Agricultural Sciences*. 2016;53(01):43–9.
118. Hayat S, Hayat Q, Alyemeni MN, Ahmad A. Proline enhances antioxidative enzyme activity, photosynthesis and yield of *Cicer arietinum* L. exposed to cadmium stress. *Acta Botanica Croatica*. 2013;72(2):323–35.

119. Zouari M, Ben Ahmed Ch, Zorrig W, Elloumi N, Rabhi M, Delmail D, et al. Exogenous proline mediates alleviation of cadmium stress by promoting photosynthetic activity, water status and antioxidative enzymes activities of young date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2016;128:100–8.
120. Hu J, Baker A, Bartel B, Linka N, Mullen RT, Reumann S, et al. Plant Peroxisomes: Biogenesis and Function. *The Plant Cell*. 2012;24(6):2279–303.
121. Nyathi Y, Baker A. Plant peroxisomes as a source of signalling molecules. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2006;1763(12):1478–95.
122. Kunz H-H, Scharnewski M, Feussner K, Feussner I, Flugge U-I, Fulda M, et al. The ABC Transporter PXA1 and Peroxisomal-Oxidation Are Vital for Metabolism in Mature Leaves of Arabidopsis during Extended Darkness. *THE PLANT CELL ONLINE*. 2009;21(9):2733–49.
123. Kaur N, Hu J. Defining the Plant Peroxisomal Proteome: From Arabidopsis to Rice. *Frontiers in Plant Science* [Internet]. 2011;2. Доступно на: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2011.00103/abstract>
124. Rio LA del, Corpas FJ, Sandalio L, Palma J, Barroso J. Plant Peroxisomes, Reactive Oxygen Metabolism and Nitric Oxide. *IUBMB Life*. 2003;55(2):71–81.
125. Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*. 2004;9(10):490–8.
126. Palma JM, Gomez M, Yanez J, Del Rio LA. Increased Levels of Peroxisomal Active Oxygen-Related Enzymes in Copper-Tolerant Pea Plants. *PLANT PHYSIOLOGY*. 1987;85(2):570–4.
127. Ferreira RMB, Bird B, Davies DD. The Effect of Light on the Structure and Organization of Lemna Peroxisomes. *Journal of Experimental Botany*. 1989;40(9):1029–35.

128. Morre DJ, Sellden G, Ojanpera K, Sandelius AS, Egger A, Morre DM, et al. Peroxisome proliferation in Norway spruce induced by ozone. *Protoplasma*. 1990 Feb;155(1–3):58–65.
129. Oksanen E, Häikiö E, Sober J, Karnosky DF. Ozone-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in field-grown aspen and birch is linked to foliar ultrastructure and peroxisomal activity. *New Phytologist*. 2004;161(3):791–9.
130. Mitsuya S, El-Shami M, Sparkes IA, Charlton WL, De Marcos Lousa C, Johnson B, et al. Salt Stress Causes Peroxisome Proliferation, but Inducing Peroxisome Proliferation Does Not Improve NaCl Tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Mickelbart MV, editor. *PLoS ONE*. 2010;5(2):e9408.
131. Charlton WL, Matsui K, Johnson B, Graham IA, Ohme-Takagi M, Baker A. Salt-induced expression of peroxisome-associated genes requires components of the ethylene, jasmonate and abscisic acid signalling pathways. *Plant, Cell and Environment*. 2005;28(4):513–24.
132. Li J, Hu J. Using Co-Expression Analysis and Stress-Based Screens to Uncover Arabidopsis Peroxisomal Proteins Involved in Drought Response. Bassham D, editor. *PLOS ONE*. 2015;10(9):e0137762.
133. Fahy D, Sanad MNME, Duscha K, Lyons M, Liu F, Bozhkov P, et al. Impact of salt stress, cell death and autophagy on peroxisomes: quantitative and morphological analyses using small fluorescent probe N-BODIPY. *Scientific Reports* [Internet]. 2017;7(1). Доступно на: <http://www.nature.com/articles/srep39069>
134. Wang X, Li S, Liu Y, Ma C. Redox regulated peroxisome homeostasis. *Redox Biology*. 2015;4:104–8.
135. Marshall PA. Redox-sensitive homodimerization of Pex11p: a proposed mechanism to regulate peroxisomal division. *The Journal of Cell Biology*. 1996;135(1):123–37.
136. Oono Y, Yazawa T, Kawahara Y, Kanamori H, Kobayashi F, Sasaki H, et al. Genome-Wide Transcriptome Analysis Reveals that Cadmium Stress Signaling

Controls the Expression of Genes in Drought Stress Signal Pathways in Rice. Tran L-SP, editor. PLoS ONE. 2014;9(5):e96946.

137. Mantri NL, Ford R, Coram TE, Pang EC. Transcriptional profiling of chickpea genes differentially regulated in response to high-salinity, cold and drought. BMC Genomics. 2007;8(1):303.

138. Gregorová Z, Kováčik J, Klejdus B, Maglovski M, Kuna R, Hauptvogel P, et al. Drought-Induced Responses of Physiology, Metabolites, and PR Proteins in *Triticum aestivum*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2015;63(37):8125–33.

139. Edreva A. Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. Gen Appl Plant Physiol. 2005;31(1-2):105-24.

140. Dang NX, Popova AV, Hundertmark M, Hinch DK. Functional characterization of selected LEA proteins from *Arabidopsis thaliana* in yeast and in vitro. Planta. 2014;240(2):325–36.

141. Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. Current Opinion in Plant Biology. 2000;3(3):217–23.

142. Zhu J-K. Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants. Annual Review of Plant Biology. 2002;53(1):247–73.

143. Graether SP, Boddington KF. Disorder and function: a review of the dehydrin protein family. Frontiers in Plant Science [Internet]. 2014;5. Доступно на: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00576/abstract>

144. Hara M. The multifunctionality of dehydrins: An overview. Plant Signaling & Behavior. 2010;5(5):503–8.

145. Close TJ. Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. Physiologia Plantarum. 1996;97(4):795–803.

146. Lisse T, Bartels D, Kalbitzer HR, Jaenicke R. The Recombinant Dehydrin-Like Desiccation Stress Protein from the Resurrection Plant *Craterostigma plantagineum* Displays No Defined Three-Dimensional Structure in Its Native State. Biological Chemistry Hoppe-Seyler. 1996;377(9):555–62.

147. Szalainé Ágoston B, Kovács D, Tompa P, Perczel A. Full backbone assignment and dynamics of the intrinsically disordered dehydrin ERD14. *Biomolecular NMR Assignments*. 2011;5(2):189–93.
148. Livernois AM, Hnatchuk DJ, Findlater EE, Graether SP. Obtaining highly purified intrinsically disordered protein by boiling lysis and single step ion exchange. *Analytical Biochemistry*. 2009;392(1):70–6.
149. Koag M-C. The binding of Maize DHN1 to Lipid Vesicles. Gain of Structure and Lipid Specificity. *PLANT PHYSIOLOGY*. 2003;131(1):309–16.
150. Clarke MW, Boddington KF, Warnica JM, Atkinson J, McKenna S, Madge J, et al. Structural and Functional Insights into the Cryoprotection of Membranes by the Intrinsically Disordered Dehydrins. *Journal of Biological Chemistry*. 2015;290(45):26900–13.
151. Perdiguero P, Barbero MC, Cervera MT, Soto Á, Collada C. Novel conserved segments are associated with differential expression patterns for Pinaceae dehydrins. *Planta*. 2012;236(6):1863–74.
152. Ismail AM, Hall AE, Close TJ. Purification and Partial Characterization of a Dehydrin Involved in Chilling Tolerance during Seedling Emergence of Cowpea. *Plant Physiology*. 1999;120(1):237–44.
153. Drira M, Saibi W, Brini F, Gargouri A, Masmoudi K, Hanin M. The K-Segments of the Wheat Dehydrin DHN-5 are Essential for the Protection of Lactate Dehydrogenase and  $\beta$ -Glucosidase Activities In Vitro. *Molecular Biotechnology*. 2013;54(2):643–50.
154. Lin C-H, Peng P-H, Ko C-Y, Markhart AH, Lin T-Y. Characterization of a Novel Y2K-type Dehydrin VrDhn1 from *Vigna radiata*. *Plant and Cell Physiology*. 2012;53(5):930–42.
155. Wisniewski M, Webb R, Balsamo R, Close TJ, Yu X-M, Griffith M. Purification, immunolocalization, cryoprotective, and antifreeze activity of PCA60: A dehydrin from peach (*Prunus persica*). *Physiologia Plantarum*. 1999;105(4):600–8.

156. Wang Y, Xu H, Zhu H, Tao Y, Zhang G, Zhang L, et al. Classification and expression diversification of wheat dehydrin genes. *Plant Science*. 2014;214:113–20.
157. Tompa P, Bánki P, Bokor M, Kamasa P, Kovács D, Lasanda G, et al. Protein-Water and Protein-Buffer Interactions in the Aqueous Solution of an Intrinsically Unstructured Plant Dehydrin: NMR Intensity and DSC Aspects. *Biophysical Journal*. 2006;91(6):2243–9.
158. Goyal K, Walton LJ, Tunnacliffe A. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochemical Journal*. 2005;388(1):151–7.
159. Reyes JL, Rodrigo M-J, Colmenero-Flores JM, Gil J-V, Garay-Arroyo A, Campos F, et al. Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects in vitro. *Plant, Cell and Environment*. 2005;28(6):709–18.
160. Reyes JL, Campos F, Wei H, Arora R, Yang Y, Karlson DT, et al. Functional dissection of Hydrophilins during in vitro freeze protection. *Plant, Cell & Environment*. 2008;31(12):1781–90.
161. Hara M, Shinoda Y, Kubo M, Kashima D, Takahashi I, Kato T, et al. Biochemical characterization of the Arabidopsis KS-type dehydrin protein, whose gene expression is constitutively abundant rather than stress dependent. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2011;33(6):2103–16.
162. Liu Y, Wang L, Zhang T, Yang X, Li D. Functional characterization of KS-type dehydrin ZmDHN13 and its related conserved domains under oxidative stress. *Scientific Reports* [Internet]. 2017;7(1). Доступно на: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-07852-y>
163. Saibi W, Drira M, Yacoubi I, Feki K, Brini F. Empiric, structural and in silico findings give birth to plausible explanations for the multifunctionality of the wheat dehydrin (DHN-5). *Acta Physiologiae Plantarum* [Internet]. 2015;37(3). Доступно на: <http://link.springer.com/10.1007/s11738-015-1798-7>
164. Kumar M, Lee S-C, Kim J-Y, Kim S-J, Aye SS, Kim S-R. Over-expression of dehydrin gene, OsDhn1, improves drought and salt stress tolerance

through scavenging of reactive oxygen species in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Biology*. 2014;57(6):383–93.

165. Saibi W, Feki K, Ben Mahmoud R, Brini F. Durum wheat dehydrin (DHN-5) confers salinity tolerance to transgenic *Arabidopsis* plants through the regulation of proline metabolism and ROS scavenging system. *Planta*. 2015;242(5):1187–94.

166. Eriksson S, Eremina N, Barth A, Danielsson J, Harryson P. Membrane-induced folding of the plant-stress protein Lti30. *Plant Physiology*. 2016; 171(2):932-943.

167. Nylander M, Svensson J, Palva ET, Welin BV. Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*. 2001;45(3):263–79.

168. Hanin M, Brini F, Ebel C, Toda Y, Takeda S, Masmoudi K. Plant dehydrins and stress tolerance: versatile proteins for complex mechanisms. *Plant Signaling & Behavior*. 2011;6(10):1503–9.

169. Kosová K, Vítámvás P, Prášil IT. Proteomics of stress responses in wheat and barley—search for potential protein markers of stress tolerance. *Front Plant Sci* [Internet]. 2014;5. Доступно на: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2014.00711/full>

170. Nakashima K, Jan A, Todaka D, Maruyama K, Goto S, Shinozaki K, et al. Comparative functional analysis of six drought-responsive promoters in transgenic rice. *Planta*. 2014;239(1):47–60.

171. Zhu W, Zhang D, Lu X, Zhang L, Yu Z, Lv H, et al. Characterisation of an SKn-type Dehydrin Promoter from Wheat and Its Responsiveness to Various Abiotic and Biotic Stresses. *Plant Molecular Biology Reporter*. 2014;32(3):664–78.

172. Bajguz A, Hayat S. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2009;47(1):1–8.

173. Hao J, Yin Y, Fei S. Brassinosteroid signaling network: implications on yield and stress tolerance. *Plant Cell Reports*. 2013 Jul;32(7):1017–30.

174. Hara M, Terashima S, Fukaya T, Kuboi T. Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. *Planta*. 2003;217:290–298.
175. Xing X, Liu Y, Kong X, Liu Y, Li D. Overexpression of a maize dehydrin gene, ZmDHN2b, in tobacco enhances tolerance to low temperature. *Plant Growth Regulation*. 2011;65(1):109–18.
176. Hara M, Fujinaga M, Kuboi T. Radical scavenging activity and oxidative modification of citrus dehydrin. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2004;42(7–8):657–62.
177. Xie C, Zhang R, Qu Y, Miao Z, Zhang Y, Shen X, et al. Overexpression of MtCAS31 enhances drought tolerance in transgenic *Arabidopsis* by reducing stomatal density. *New Phytologist*. 2012;195(1):124–35.
178. Labhili M, Joudrier P, Gautier M-F. Characterization of cDNAs encoding *Triticum durum* dehydrins and their expression patterns in cultivars that differ in drought tolerance. *Plant Science*. 1995;112(2):219–30.
179. Kim EC, Lee HS, Choi D-W. Sequence variability and expression pattern of the dehydrin gene family in *Populus alba* × *P. tremula* var. *glandulosa*. *Plant Omics Journal*. 2012;5(2):122–7.
180. Receveur-Bréchet V, Bourhis J-M, Uversky VN, Canard B, Longhi S. Assessing protein disorder and induced folding. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2005;62(1):24–45.
181. Ali S, Ganai BA, Kamili AN, Bhat AA, Mir ZA, Bhat JA, et al. Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiological Research*. 2018;212–213:29–37.
182. Kasprzewska A. Plant chitinases--regulation and function. *Cell Mol Biol Lett*. 2003;8(3):809–24.
183. Yokoyama R, Nishitani K. Genomic Basis for Cell-Wall Diversity in Plants. A Comparative Approach to Gene Families in Rice and *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*. 2004;45(9):1111–21.

184. The International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC), Mayer KFX, Rogers J, Dole el J, Pozniak C, Eversole K, et al. A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. *Science*. 2014;345(6194):1251788–1251788.
185. Majewska-Sawka A, Nothnagel EA. The Multiple Roles of Arabinogalactan Proteins in Plant Development. *Plant Physiology*. 2000;122(1):3–10.
186. Seifert GJ, Roberts K. The Biology of Arabinogalactan Proteins. *Annual Review of Plant Biology*. 2007;58(1):137–61.
187. Mareri L, Romi M, Cai G. Arabinogalactan proteins: actors or spectators during abiotic and biotic stress in plants? *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*. 2018;153(1):173–85.
188. Su S, Higashiyama T. Arabinogalactan proteins and their sugar chains: functions in plant reproduction, research methods, and biosynthesis. *Plant Reproduction*. 2018;31(1):67–75.
189. Singh D, Ambroise A, Haicour R, Sihachakr D, Rajam MV. Increased resistance to fungal wilts in transgenic eggplant expressing alfalfa glucanase gene. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2014;20(2):143–50.
190. Wu Y-R, Lin Y-C, Chuang H. Laminarin modulates the chloroplast antioxidant system to enhance abiotic stress tolerance partially through the regulation of the defensin-like gene expression. *Plant Science*. 2016;247:83–92.
191. Nedukha OM. Callose: Localization, functions, and synthesis in plant cells. *Cytology and Genetics*. 2015;49(1):49–57.
192. Raeini-Sarjaz M, Chalavi V. Effects of water stress and constitutive expression of a drought induced chitinase gene on water-use efficiency and carbon isotope composition of strawberry. *J Appl Bot Food Qual*. 2011;84:90–4.
193. Guo XL, Bai LR, Su CQ, Shi LR, Wang DW. Molecular cloning and expression of drought-induced protein 3 (DIP3) encoding a class III chitinase in upland rice. *Genetics and Molecular Research*. 2013;12(4):6860–70.

194. Dana M d. I. M, Pintor-Toro JA, Cubero B. Transgenic Tobacco Plants Overexpressing Chitinases of Fungal Origin Show Enhanced Resistance to Biotic and Abiotic Stress Agents. *PLANT PHYSIOLOGY*. 2006;142(2):722–30.
195. Žur I, Gołębiowska G, Dubas E, Golemiec E, Matušíková I, Libantová J, et al.  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase activities in winter triticales during cold hardening and subsequent infection by *Microdochium nivale*. *Biologia* [Internet]. 2013;68(2). Доступно на: <http://www.degruyter.com/view/j/biolog.2013.68.issue-2/s11756-013-0001-0/s11756-013-0001-0.xml>
196. Jongedijk E, Tigelaar H, van Roekel JSC, Bres-Vloemans SA, Dekker I, van den Elzen PJM, et al. Synergistic activity of chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. *Euphytica*. 1995;85(1–3):173–80.
197. Lee B-R, Jung W-J, Lee B-H, Avice J-C, Ourry A, Kim T-H. Kinetics of drought-induced pathogenesis-related proteins and its physiological significance in white clover leaves. *Physiologia Plantarum*. 2008;132(3):329–37.
198. Wu C-T. Class I Chitinase and -1,3-Glucanase Are Differentially Regulated by Wounding, Methyl Jasmonate, Ethylene, and Gibberellin in Tomato Seeds and Leaves. *PLANT PHYSIOLOGY*. 2003;133(1):263–73.
199. Su Y, Wang Z, Liu F, Li Z, Peng Q, Guo J, et al. Isolation and Characterization of ScGluD2, a New Sugarcane beta-1,3-Glucanase D Family Gene Induced by *Sporisorium scitamineum*, ABA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NaCl, and CdCl<sub>2</sub> Stresses. *Frontiers in Plant Science* [Internet]. 2016;7. Доступно на: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2016.01348/abstract>
200. Soule M. Phenetics of Natural Populations I. Phenetic Relationships of Insular Populations of the Side-Blotched Lizard. *Evolution*. 1967;21(3):584.
201. Houle D, Govindaraju DR, Omholt S. Phenomics: the next challenge. *Nature Reviews Genetics*. 2010;11(12):855–66.
202. Ghanem ME, Marrou H, Sinclair TR. Physiological phenotyping of plants for crop improvement. *Trends in Plant Science*. 2015;20(3):139–44.

203. Furbank RT, Tester M. Phenomics – technologies to relieve the phenotyping bottleneck. *Trends in Plant Science*. 2011 Dec;16(12):635–44.
204. Stitt M, Gibon Y. Why measure enzyme activities in the era of systems biology? *Trends in Plant Science*. 2014;19(4):256–65.
205. Мусієнко М, Таран Н, Стороженко В, Бацманова Л, Грудіна Н, Світлова Н, та ін. Фенотипування за біохімічними маркерами фізіологічної відповіді рослин для скринінгу сортів озимої пшениці. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка: Проблеми регуляції фізіологічних функцій*. 2017;23(2):42–7.
206. Gupta U, Kalra Y. Residual Effect of Copper and Zinc from Fertilizers on Plant Concentration, Phytotoxicity, and Crop Yield Response. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 2006;37(15–20):2505–11.
207. Liu R, Lal R. Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions. *Science of The Total Environment*. 2015;514:131–9.
208. Dietz K-J, Herth S. Plant nanotoxicology. *Trends in Plant Science*. 2011;16(11):582–9.
209. Hossain Z, Mustafa G, Komatsu S. Plant Responses to Nanoparticle Stress. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(11):26644–53.
210. Ghafariyan MH, Malakouti MJ, Dadpour MR, Stroeve P, Mahmoudi M. Effects of Magnetite Nanoparticles on Soybean Chlorophyll. *Environmental Science & Technology*. 2013;130906140819003.
211. Delfani M, Baradarn Firouzabadi M, Farrokhi N, Makarian H. Some Physiological Responses of Black-Eyed Pea to Iron and Magnesium Nanofertilizers. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 2014;45(4):530–40.
212. Rui M, Ma C, Hao Y, Guo J, Rui Y, Tang X, et al. Iron Oxide Nanoparticles as a Potential Iron Fertilizer for Peanut (*Arachis hypogaea*). *Frontiers in Plant Science* [Internet]. 2016;7. Доступно на:  
<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2016.00815/abstract>

213. Pradhan S, Patra P, Das S, Chandra S, Mitra S, Dey KK, et al. Photochemical Modulation of Biosafe Manganese Nanoparticles on *Vigna radiata*: A Detailed Molecular, Biochemical, and Biophysical Study. *Environmental Science & Technology*. 2013;47(22):13122–31.
214. Mahajan P, Dhoke SK, Khanna AS. Effect of Nano-ZnO Particle Suspension on Growth of Mung (*Vigna radiata*) and Gram (*Cicer arietinum*) Seedlings Using Plant Agar Method. *Journal of Nanotechnology*. 2011;2011:1–7.
215. Zhao L, Sun Y, Hernandez-Viezcas JA, Servin AD, Hong J, Niu G, et al. Influence of CeO<sub>2</sub> and ZnO Nanoparticles on Cucumber Physiological Markers and Bioaccumulation of Ce and Zn: A Life Cycle Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013;61(49):11945–51.
216. Zhao L, Peralta-Videa JR, Rico CM, Hernandez-Viezcas JA, Sun Y, Niu G, et al. CeO<sub>2</sub> and ZnO Nanoparticles Change the Nutritional Qualities of Cucumber (*Cucumis sativus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014;62(13):2752–9.
217. Lin D, Xing B. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution*. 2007;150(2):243–50.
218. López-Moreno ML, de la Rosa G, Hernández-Viezcas JÁ, Castillo-Michel H, Botez CE, Peralta-Videa JR, et al. Evidence of the Differential Biotransformation and Genotoxicity of ZnO and CeO Nanoparticles on Soybean (*Glycine max*) Plants. *Environmental Science & Technology*. 2010;44(19):7315–20.
219. Zhao J, Wang Z, Dai Y, Xing B. Mitigation of CuO nanoparticle-induced bacterial membrane damage by dissolved organic matter. *Water Research*. 2013;47(12):4169–78.
220. Shaw AK, Hossain Z. Impact of nano-CuO stress on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Chemosphere*. 2013;93(6):906–15.
221. Nekrasova GF, Ushakova OS, Ermakov AE, Uimin MA, Byzov IV. Effects of copper(II) ions and copper oxide nanoparticles on *Elodea densa* Planch. *Russian Journal of Ecology*. 2011;42(6):458–63.

222. Shah V, Belozerova I. Influence of Metal Nanoparticles on the Soil Microbial Community and Germination of Lettuce Seeds. *Water, Air, and Soil Pollution*. 2009;197(1–4):143–8.
223. Ma C, White JC, Dhankher OP, Xing B. Metal-Based Nanotoxicity and Detoxification Pathways in Higher Plants. *Environmental Science & Technology*. 2015;49(12):7109–22.
224. Nawrocka A. Conformational Changes in Wheat Gluten After using Ag-nanoparticles. *International Agrophysics*. 2014;28(3):311–7.
225. Michel BE, Kaufmann MR. The Osmotic Potential of Polyethylene Glycol 6000. *PLANT PHYSIOLOGY*. 1973;51(5):914–6.
226. Poorter H, Garnier E. Plant growth analysis: an evaluation of experimental design and computational methods. *J Exp Bot*. 1996;47(9):1343–51.
227. Fischer R, Maurer R. Drought resistance in spring wheat cultivars. I. Grain yield responses. *Australian Journal of Agricultural Research*. 1978;29(5):897.
228. Blum A. Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential—are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? *Australian Journal of Agricultural Research*. 2005;56(11):1159.
229. Sagisaka S. The Occurrence of Peroxide in a Perennial Plant, *Populus gelrica*. *PLANT PHYSIOLOGY*. 1976;57(2):308–9.
230. Kumar G, Knowles NR. Changes in Lipid Peroxidation and Lipolytic and Free-Radical Scavenging Enzyme Activities during Aging and Sprouting of Potato (*Solanum tuberosum*) Seed-Tubers. *Plant Physiology*. 1993;102(1):115–24.
231. Bates LS, Waldren RP, Teare ID. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*. 1973;39(1):205–7.
232. Lichtenthaler HK, Wellburn AR. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*. 1983 Oct;11(5):591–2.
233. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;72(1–2):248–54.

234. Giannopolitis CN, Ries SK. Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher Plants. *PLANT PHYSIOLOGY*. 1977;59(2):309–14.
235. Aebi H. [13] Catalase in vitro. In: *Methods in Enzymology* [Internet]. Elsevier; 1984. p.121–6. Доступно на:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687984050163>
236. Verma S, Dubey RS. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science*. 2003;164(4):645–55.
237. Dias A, Costa M. Effect of Low Salt Concentrations on Nitrate Reductase and Peroxidase of Sugar Beet Leaves. *Journal of Experimental Botany*. 1983;34(5):537–43.
238. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680–5.
239. Trudel J, Asselin A. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*. 1989;178(2):362–6.
240. Pan SQ. A Technique for Detection of Chitinase,  $\beta$ -1,3-Glucanase, and Protein Patterns After a Single Separation Using Polyacrylamide Gel Electrophoresis or Isoelectrofocusing. *Phytopathology*. 1991;81(9):970.
241. Лопатько КГ, Афтанділянц ЄГ, Каленська СМ, Тонха ОЛ. Маточний колоїдний розчин металів. Патент №38459, 2009.
242. Fiskesjö G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*. 1985;102(1):99–112.
243. Toosi A, Bakar B, Azizi M. Effect of Drought Stress by Using PEG 6000 on Germination and Early Seedling Growth of Brassica juncea Var. Ensabi. *Scientific Papers - Series A, Agronomy*. 2014;57:360–3.
244. Partheeban C, Chandrasekhar CN, Jeyakumar P, Ravikesavan R, Gnanam R. Effect of PEG Induced Drought Stress on Seed Germination and Seedling Characters of Maize (*Zea mays* L.) Genotypes. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2017;6(5):1095–104.

245. Almansouri A, Kinet J-M, Lutts S. Effect of salt and osmotic stresses on germination in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Plant and Soil*. 2001;231(2):243–254.

246. Obroucheva NV, Sinkevich IA, Lityagina SV, Novikova GV. Water relations in germinating seeds. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2017;64(4):625–33.

247. Maucieri C, Caruso C, Bona S, Borin M, Barbera AC, Cavallaro V. Influence of salinity and osmotic stress on germination process in an old sicilian landrace and a modern cultivar of *Triticum Durum* Desf. *Cereal Research Communications*. 2018;46(2):253–62.

248. Konvalina P, Moudrý J, Dotlačil L, Stehno Z, Moudrý J. Drought tolerance of land races of emmer wheat in comparison to soft wheat. *Cereal Research Communications*. 2010;38(3):429–39.

249. Blum A. *Plant breeding for water-limited environments*. New York, NY: Springer; 2011. 255 p.

250. Fritz M, Ehwald R. Mannitol permeation and radial flow of water in maize roots. *New Phytologist*. 2011;189(1):210–7.

251. Hura T, Hura K, Grzesiak S, Banaszak Z. Simulation of osmotic stress during the early stages of triticale development as a promising laboratory test for screening drought resistance. *Cereal Research Communications*. 2010;38(3):327–34.

252. Коваль Ю, Коваленко М, Светлова Н, Таран Н. Вплив поліетиленгліколь-індукованої посухи на ростові процеси пшениці на ранніх етапах онтогенезу. Матеріали XIII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології»; 2017 квітень 25–27; м. Львів, с. 283–4.

253. Faisal S. *Physiological Studies on Six Wheat (*Triticum aestivum* L.) Genotypes for Drought Stress Tolerance at Seedling Stage*. *Agricultural Research & Technology: Open Access Journal* [Internet]. 2016;1(2). Доступно на: <http://juniperpublishers.com/artoaj/ARTOAJ.MS.ID.555559.php>

254. Мусієнко ММ, Стороженко ВО, Бацманова ЛМ, Серга ОІ, Грудіна НС, Макаренко ВІ, та ін. Скринінг сортів пшениці озимої для пошуку генотипів із підвищеним адаптаційним потенціалом. Вісник аграрної науки. 2016;11:38–42.

255. Колупаев Е, Ястреб ТО. Физиологические функции неэнзиматических антиоксидантов растений. Вісник Харківського національного аграрного університету Серія : Біологія. 2015;35(2):6–25.

256. **Kovalenko M**, Konotop Ye, Smirnov O, Koval Yu, Musienko M. Growth and water consumption parameters of wheat seedlings under osmotic stress. Біологічні студії (за матеріалами IV Міжнародної конференції “Онтогенез рослин у природному та трансформованому середовищі. Фізіолого-біохімічні та екологічні аспекти” (4-6 жовтня 2017р., м. Львів)); 2017:11(3-4):65

257. **Kovalenko MS**, Konotop YeO, Svetlova NB, Storozhenko VO, Koval YuA. Effect of metal nanoparticles on the antioxidant activity of *Triticum* sp. plants under drought conditions. Proceedings of the International research and practice conference: Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2017); 2017 August 23-26; Chernivtsi, Ukraine, p. 99

258. Marcińska I, Czyczyło-Mysza I, Skrzypek E, Filek M, Grzesiak S, Grzesiak MT, et al. Impact of osmotic stress on physiological and biochemical characteristics in drought-susceptible and drought-resistant wheat genotypes. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2013;35(2):451–61.

259. Konotop Ye, Kovalenko M, Matušiková I, Batsmanova L, Taran N. Proline application triggers temporal redox imbalance, but alleviates cadmium stress in wheat seedlings. *Pakistan journal of botany*. 49(6):2145–51.

260. Jha S, Pudake RN. Molecular Mechanism of Plant–Nanoparticle Interactions. In: Kole C, Kumar DS, Khodakovskaya MV, editors. *Plant Nanotechnology* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 155–81. Доступно на: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-42154-4\\_7](http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-42154-4_7)

261. Карпець Л-А, Зінченко А, Коваленко М, Смірнов О, Белавя В. Зміни вмісту фотосинтетичних пігментів проростків пшениці за дії посухи.

Матеріали Міжнародної конференції молодих учених «Актуальні проблеми ботаніки та екології»; 2017 вересень 5-10, м. Луцьк, Україна; с. 72.

262. Maglovski M, Gregorová Z, Rybanský Ľ, Mészáros P, Moravčíková J, Hauptvogel P, et al. Nutrition supply affects the activity of pathogenesis-related  $\beta$ -1,3-glucanases and chitinases in wheat. *Plant Growth Regulation*. 2017;81(3):443–53.

263. Bardáčová M, Maglovski M, Gregorová Z, Konotop Y, Horník M, Moravčíková J, et al. The Activity of Cell-Wall Modifying  $\beta$ -1,3-Glucanases in Soybean Grown in Presence of Heavy Metals. *Nova Biotechnologica et Chimica*. 2016;15(2):114–21.

264. Grover A. Plant Chitinases: Genetic Diversity and Physiological Roles. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2012;31(1):57–73.

265. Langner T, Göhre V. Fungal chitinases: function, regulation, and potential roles in plant/pathogen interactions. *Current Genetics*. 2016;62(2):243–54.

266. Mészáros P, Rybanský Ľ, Spieß N, Socha P, Kuna R, Libantová J, et al. Plant chitinase responses to different metal-type stresses reveal specificity. *Plant Cell Rep*. 2014;33(11):1789–99.

267. Mészáros P, Rybanský Ľ, Hauptvogel P, Kuna R, Libantová J, Moravčíková J, et al. Cultivar-specific kinetics of chitinase induction in soybean roots during exposure to arsenic. *Molecular Biology Reports*. 2013;40(3):2127–38.

268. Gálusová T, Rybanský Ľ, Mészáros P, Spieß N, Piršelová B, Kuna R, et al. Variable responses of soybean chitinases to arsenic and cadmium stress at the whole plant level. *Plant Growth Regulation*. 2015;76(2):147–55.

269. Chang Y-M, Chen L-C, Wang H-Y, Chiang C-L, Chang C-T, Chung Y-C. Characterization of an Acidic Chitinase from Seeds of Black Soybean (*Glycine max* (L) Merr Tainan No. 3). Permyakov EA, editor. *PLoS ONE*. 2014;9(12):e113596.

270. Moravčíková J, Ujvariová N, Žur I, Gálová Z, Gregorová Z, Zimová M, et al. Chitinase Activities in Wheat and Its Relative Species. *Agriculture*

(Polnohospodárstvo) [Internet]. 2017;63(1). Доступно на: <http://content.sciendo.com/view/journals/agri/63/1/article-p14.xml>

271. Kovalenko M, Gregorová Z, Matušíková I. The chitinase and b-1,3-glucanase activity of wheat (*Triticum aestivum* L.) and emmer (*Triticum dicoccum* Schrank ex Schübl.) under osmotic stress. Proceedings of the 11th International Conference "Plant Functioning Under Environmental Stress"; 2018 September 12-15; Cracow, Poland; p. 28.

272. Moore JP, Vicré-Gibouin M, Farrant JM, Driouich A. Adaptations of higher plant cell walls to water loss: drought vs desiccation. *Physiologia Plantarum*. 2008;134(2):237–45.

273. Piršelová B, Matušíková I. Callose: the plant cell wall polysaccharide with multiple biological functions. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2013;35(3):635–44.

274. Moravčíková J, Margetínyová D, Gálová Z, Žur I, Gregorová Z, Zimová M, et al. Beta-1,3-Glucanase Activities in Wheat and Relative Species. *Nova Biotechnologica et Chimica*. 2016;15(2):122–32.

275. Ruan Y-L. Genotypic and Developmental Evidence for the Role of Plasmodesmatal Regulation in Cotton Fiber Elongation Mediated by Callose Turnover. *PLANT PHYSIOLOGY*. 2004;136(4):4104–13.

276. Kosová K, Vitámvás P, Prášil I. Wheat and barley dehydrins under cold, drought, and salinity – what can LEA-II proteins tell us about plant stress response? *Frontiers in Plant Science* [Internet]. 2014;5. Доступно на: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00343/abstract>

277. Klimešová J, Holková L, Středa T. The expression of dehydrin genes and the intensity of transpiration in drought-stressed maize plants. *Cereal Research Communications*. 2017;45(3):355–68.

278. Ganeshan S, Vitamvas P, Fowler DB, Chibbar RN. Quantitative expression analysis of selected COR genes reveals their differential expression in leaf and crown tissues of wheat (*Triticum aestivum* L.) during an extended low

temperature acclimation regimen. *Journal of Experimental Botany*. 2008;59(9):2393–402.

279. Arumingtyas EL, Savitri ES, Purwoningrahayu RD. Protein Profiles and Dehydrin Accumulation in Some Soybean Varieties (*Glycine max* L. Merr) in Drought Stress Conditions. *American Journal of Plant Sciences*. 2013;04(01):134–41.

280. Halder T, Upadhyaya G, Basak C, Das A, Chakraborty C, Ray S. Dehydrins Impart Protection against Oxidative Stress in Transgenic Tobacco Plants. *Frontiers in Plant Science* [Internet]. 2018;9. Доступно на: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2018.00136/full>

281. Stasik O, Kovalenko M, Sokolovska-Sergiienko O, Kiriziy D, Hickey K, Nazarov T, et al. Impact of drought on photosynthetic activity, ROS homeostasis and yield in winter wheat varieties. *Plant Biology* 2018; 2018 July 14-18; Montreal, Québec.

282. Moloi MJ, Department of Plant Sciences, University of the Free State, Bloemfontein, South Africa, Mwenye OJ, Bvumbwe Research Station, Limbe, Malawi, van der Merwe R, Department of Plant Sciences, University of the Free State, Bloemfontein, South Africa. Differential involvement of ascorbate and guaiacol peroxidases in soybean drought resistance. *South African Journal of Science* [Internet]. 2016;Volume 112(Number 9/10). Доступно на: <http://sajs.co.za/article/view/3656>

283. Noctor G. Drought and Oxidative Load in the Leaves of C3 Plants: a Predominant Role for Photorespiration? *Annals of Botany*. 2002;89(7):841–50.

284. Shibata M, Oikawa K, Yoshimoto K, Kondo M, Mano S, Yamada K, et al. Highly Oxidized Peroxisomes Are Selectively Degraded via Autophagy in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 2013;25(12):4967–83.

285. Зінченко АВ, Коваленко МС, Смірнов ОЄ. Вплив посухи на фотохімічні показники функціонування фотосинтетичного апарату різних сортів *Triticum aestivum* L. Матеріали XII Міжнародної конференції молодих

науковців «Біологія: від молекули до біосфери»; 2017 листопад 29 – грудень 1; м. Харків, с. 103–4.

286. Прядкіна ГО, Маслюківська ОВ, Стасик ОО, Оксьом ВП. Зв'язок вмісту хлорофілу в листках і хлорофільного індексу посівів озимої пшениці в період наливання зерна з урожайністю. Физиология растений и генетика. 2015;47(2):167–74.

287. Kole C, Kumar DS, Khodakovskaya MV, editors. Plant nanotechnology: principles and practices. Cham: Springer; 2016. 383 p.

288. Taran N, Batsmanova L, Konotop Ye, Okanenko A. Redistribution of elements of metals in plant tissues under treatment by non-ionic colloidal solution of biogenic metal nanoparticles. Nanoscale Research Letters. 2014;9:354.

289. Medina-Velo IA, Zuverza-Mena N, Tan W, Hernandez-Viezcas JA, Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL. Biophysical Methods of Detection and Quantification of Uptake, Translocation, and Accumulation of Nanoparticles. In: Kole C, Kumar DS, Khodakovskaya MV, editors. Plant Nanotechnology [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 29–63. Доступно на: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-42154-4\\_3](http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-42154-4_3)

290. Ahanger MA, Morad-Talab N, Abd-Allah EF, Ahmad P, Hajiboland R. Plant growth under drought stress: Significance of mineral nutrients. In: Ahmad P, editor. Water Stress and Crop Plants [Internet]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2016. p. 649–68.

Доступно на: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781119054450.ch37>

291. Конотоп ЄО, Коваленко МС, Улинець ВЗ, Мелешко АО, Бацманова ЛМ, Таран НЮ. Дослідження фітотоксичності колоїдних розчинів металовмісних наночастинок. Цитология и генетика. 2014; 48(2): 37-42.

292. Kovalenko MS, Konotop YeO, Karpets L-AM, Smirnov OYe, Batsmanova LM, Taran NYu. Phytotoxicity of colloidal solutions of stabilized and non-stabilized nanoparticles of essential metals and their oxides. Proceedings of the International research and practice conference: Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2018); 2018 August 27-30; Kyiv, Ukraine, p. 89.

293. Taran NYu, Batsmanova LM, Konotop YeO, Kovalenko MS, Ulynets VZ, Volkogon MV, et al. Physiological responses of plants to non-ionic colloidal solution of metal nanoparticles. Proceeding of the International research and practice conference: Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2014); 2014 August 22-23; Yaremche-Lviv, Ukraine, p. 577.

294. Lee W-M, An Y-J, Yoon H, Kweon H-S. Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*Phaseolus radiatus*) and wheat (*Triticum aestivum*): plant agar test for water-insoluble nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2008;27(9):1915.

295. Potarzycki J, Grzebisz W. Effect of zinc foliar application on grain yield of maize and its yielding compone. *Plant, Soil and Environment*. 2009;55(No. 12):519–27.

296. Рязанова МС, Бацманова ЛМ, Коваленко МС, Михальська ЛМ, Швартау ВВ. Вплив іонів міді та рН середовища на антиоксидантну активність у тканинах коренів проростків озимої пшениці. *Физиология растений и генетика*. 2015;47(6):497–504.

297. Новицька НВ. Шляхи зниження негативних наслідків травмування насіння. *Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України Сер: Агрономія*. 2012;(176):40–5.

298. Taran N, Storozhenko V, Svetlova N, Batsmanova L, Shvartau V, Kovalenko M. Effect of Zinc and Copper Nanoparticles on Drought Resistance of Wheat Seedlings. *Nanoscale Research Letters*. 2017;12(1):60.

299. Taran N, Batsmanova L, Kovalenko M, Okanenko A. Impact of Metal Nanoform Colloidal Solution on the Adaptive Potential of Plants. *Nanoscale Research Letters* [Internet]. 2016;11(1).

Доступно на: <http://www.nanoscalereslett.com/content/11/1/89>

300. Taran NYu, Batsmanova LM, Kovalenko MS, Konotop YeO, Kosyk OI, Nowicki NV, et al. Impact of nanoform biogenic metal colloidal solution on the adaptive potential of plants. International research and practice conference:

Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2015); 2015 August 26-29, Lviv, Ukraine, p. 440.

301. Taran N, Gonchar OM, Lopatko KG, Batsmanova LM, Patyka MV, Volkogon MV. The effect of colloidal solution of molybdenum nanoparticles on the microbial composition in rhizosphere of *Cicer arietinum* L. *Nanoscale Research Letters*. 2014;9(1):289.

302. Taran N, Batsmanova L, Kosyk O, Smirnov O, Kovalenko M, Honchar L, et al. Colloidal Nanomolybdenum Influence upon the Antioxidative Reaction of Chickpea Plants (*Cicer arietinum* L.). *Nanoscale Research Letters* [Internet]. 2016;11(1). Доступно на:

<http://nanoscalereslett.springeropen.com/articles/10.1186/s11671-016-1690-4>

303. Taran NYu, Batsmanova LM, Kovalenko MS, Konotop YeO, Gonchar LM. Nanomolybdenum impact on chickpeas plant adaptation reaction development. *Proceedings of the Ukrainian-German Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and Nanobiotechnology*; 2015 September 21-25; Kyiv, Ukraine, p. 247.

304. Demmig-Adams B, Adams WW. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science*. 1996;1(1):21–6.

305. Kaiser BN, Gridley KL, Ngair Brady J, Phillips T, Tyerman SD. The Role of Molybdenum in Agricultural Plant Production. *Annals of Botany*. 2005;96(5):745–54.

306. Ma X, Wang W, Bittner F, Schmidt N, Berkey R, Zhang L, et al. Dual and Opposing Roles of Xanthine Dehydrogenase in Defense-Associated Reactive Oxygen Species Metabolism in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 2016;28(5):1108–26.

307. Taran N, Batsmanova L, Kosyk O, Smirnov O, Kovalenko M, Gonchar O, et al. Colloidal nanomolybdenum influence upon the antioxidative reaction of chickpeas plants (*Cicer arietinum* L.). *Proceedings of the International research and practice conference: Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2016)*; 2016 August 24-27; Lviv, Ukraine, p. 507.

308. Zou J-J, Li X-D, Ratnasekera D, Wang C, Liu W-X, Song L-F, et al. *Arabidopsis* CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE8 and CATALASE3 Function in Abscisic Acid-Mediated Signaling and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Homeostasis in Stomatal Guard Cells under Drought Stress. *The Plant Cell*. 2015;27(5):1445–60.

309. Lopez CG, Banowitz G, Peterson CJ, Kronstad WE. Differential Accumulation of a 24-kd Dehydrin Protein in Wheat Seedlings Correlates with Drought Stress Tolerance at Grain Filling. *Hereditas*. 2004;135(2–3):175–81.

## ДОДАТОК 1

### ПЕРЕЛІК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ ТА ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

#### *Наукові праці, в яких опубліковано основні наукові результати дисертації:*

1. Konotop Y, **Kovalenko M**, Batsmanova L, Taran N, Matušíková I. Proline application triggers temporal redox imbalance, but alleviates cadmium stress in wheat seedlings. *Pakistan Journal of Botany*. 2017; 49(6): 2145-2151.
2. Taran N, Storozhenko V, Sviatlova N, Batsmanova L, Shvartau V, **Kovalenko M**. Effect of Zinc and Copper Nanoparticles on Drought Resistance of Wheat Seedlings. *Nanoscale Research Letters*. 2017; 12(1): 60.
3. Taran N, Batsmanova L, **Kovalenko M**, Okanenko A. Impact of Metal Nanoform Colloidal Solution on the Adaptive Potential of Plants. *Nanoscale research letters*. 2016; 11(1): 89.
4. Мусієнко ММ, Стороженко ВО, Бацманова ЛМ, Серга ОІ, Грудіна НС, Макаренко ВІ, **Коваленко МС**, Артюшенко АП. Скринінг сортів пшениці озимої для пошуку генотипів із підвищеним адаптаційним потенціалом. *Вісник аграрної науки*. 2016; 11: 38-42.
5. Taran N, Batsmanova L, Kosyk O, Smirnov O, **Kovalenko M**, Honchar L, Okanenko A. Colloidal Nanomolybdenum Influence upon the Antioxidative Reaction of Chickpea Plants (*Cicer arietinum* L.). *Nanoscale research letters*. 2016; 11(1):476.
6. Рязанова МС, Бацманова ЛМ, **Коваленко МС**, Михальська ЛМ, Швартау ВВ. Вплив іонів міді та рН середовища на антиоксидантну активність у тканинах коренів проростків озимої пшениці. *Физиология растений и генетика*. 2015; 47(6): 497-504.
7. Конотоп ЄО, **Коваленко МС**, Улинець ВЗ, Мелешко АО, Бацманова ЛМ, Таран НЮ. Дослідження фітотоксичності колоїдних розчинів металовмісних наночастинок. *Цитология и генетика*. 2014; 48(2): 37-42.

#### *Наукові праці, які зісвідчують апробацію матеріалів дисертації:*

1. **Kovalenko M**, Gregorová Z, Matušíková I. The chitinase and 1,3- $\beta$ -glucanase activity of wheat (*Triticum aestivum* L.) and emmer (*Triticum dicoccum* Schrank ex Schübl.) under osmotic stress. Proceedings of the 11th International Conference "Plant Functioning Under Environmental Stress"; 2018 September 12-15; Cracow, Poland, p. 28, *усна доповідь*.

2. **Kovalenko MS**, Konotop YeO, Karpets L-AM, Smirnov OYe, Batsmanova LM, Taran NYu. Phytotoxicity of colloidal solutions of stabilized and non-stabilized nanoparticles of essential metals and their oxides. Proceedings of the International research and practice conference: Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2018); 2018 August 27-30; Kyiv, Ukraine, p. 89, *стендова доповідь*.

3. Stasik O, **Kovalenko M**, Sokolovska-Sergiienko O, Kiriziy D, Hickey K, Nazarov T, Taran N, Batsmanova L, Sytnyk S, Cuber K, Morgun B, Panchenko O, Smertenko A. Impact of drought on photosynthetic activity, ROS homeostasis and yield in winter wheat varieties. Plant Biology 2018; 2018 July 14-18; Montreal, Québec, *стендова доповідь*.

4. Зінченко АВ, **Коваленко МС**, Смірнов ОЄ. Вплив посухи на фотохімічні показники функціонування фотосинтетичного апарату різних сортів *Triticum aestivum* L. Матеріали XII Міжнародної конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери»; 2017 листопад 29 – грудень 1; м. Харків, Україна, с. 103-104, *публікація тез*.

5. **Kovalenko M**, Konotop Ye, Smirnov O, Koval Yu, Musienko M. Growth and water consumption parameters of wheat seedlings under osmotic stress. Біологічні студії (за матеріалами IV Міжнародної конференції "Онтогенез рослин у природному та трансформованому середовищі. Фізіолого-біохімічні та екологічні аспекти" (4-6 жовтня 2017р., м. Львів)); 2017:11(3-4):65, *стендова доповідь*.

6. Карпець Л-А, Зінченко А, **Коваленко М**, Смірнов О, Белава В. Зміни вмісту фотосинтетичних пігментів проростків пшениці за дії посухи. Матеріали Міжнародної конференції молодих учених «Актуальні проблеми

ботаніки та екології»; 2017 вересень 5-10; Луцьк, Україна, с. 72, *публікація тез*.

7. **Kovalenko MS**, Konotop YeO, Sviatlova NB, Storozhenko VO, Koval YuA. Effect of metal nanoparticles on the antioxidant activity of *Triticum* sp. plants under drought conditions. Proceedings of the International research and practice conference: Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2017); 2017 August 23-26; Chernivtsi, Ukraine, p. 99, *стендова доповідь*.

8. Коваль Ю, **Коваленко М**, Світлова Н, Таран Н. Вплив поліетиленгліколь-індукованої посухи на ростові процеси пшениці на ранніх етапах онтогенезу. Збірник тез XIII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології»; 2017 квітня 25-27; м. Львів, Україна, с. 283-4, *стендова доповідь*.

9. Taran N, Batsmanova L, Kosyk O, Smirnov O, **Kovalenko M**, Gonchar L, Okanenko A. Colloidal nanomolybdenum influence upon the antioxidative reaction of chickpeas plants (*Cicer arietinum* L.). Proceedings of the International research and practice conference: Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2016); 2016 August 24-27; Lviv, Ukraine, p. 507, *стендова доповідь*.

10. Taran NYu, Batsmanova LM, **Kovalenko MS**, Konotop YeO, Gonchar LM. Nanomolybdenum impact on chickpeas plant adaptation reaction development. Proceedings of the Ukrainian-German Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology; 2015 September 21-25; Kyiv, Ukraine, p. 247, *публікація тез*.

11. Taran NY, Batsmanova LM, **Kovalenko MS**, Konotop EO, Kosyk OI, Nowicki NV, Kalensky SM. Impact of nanoform biogenic metal colloidal solution on the adaptive potential of plants. Proceedings of the International research and practice conference: Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2015); 2015 August 26-29; Lviv, Ukraine, p. 440, *стендова доповідь*.

12. Taran NYu, Batsmanova LM, Konotop YeO, **Kovalenko MS**, Ulynets VZ, Volkogon MV, Meleshko AO. Physiological responses of plants to non-ionic colloidal solution of metal nanoparticles. Proceedings of the International research

and practice conference: Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2014); 2014 August 22-23; Yaremche-Lviv, Ukraine, p. 577, *публікація тез.*