

УДК [57.032:575.117+57.042/048]+575.17+633.111

doi 10.18524/2077-1746.2019.2(45).185637

В. А. Топтіков,¹ к.б.н., доцент,

С. В. Чеботар,^{1,2} д.б.н., професор

¹Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, кафедра генетики і молекулярної біології, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна

²Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення НААН України (СПІ - НЦНС),

Овідіопольська дор., 3, Одеса, 65036, Україна, e-mail: v.a.toptikov@gmail.com

ГЕНЕТИКО-БІОХІМІЧНІ АСПЕКТИ ЗВ'ЯЗКУ АЛЕЛЬНОГО СКЛАДУ ЛОКУСУ *Ppd-D1* І СТІЙКОСТІ ОЗИМОЇ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ ДО НИЗЬКОЇ ТЕМПЕРАТУРИ

Досліджували особливості експресії антиоксидантних ензимів (неспецифічних і специфічних пероксидаз, каталази, супероксиддисмутази) у рослин за нормальних умов та за дії низької позитивної температури. Досліджували два сорти з різними алелями локусу фотоперіодичної чутливості *Ppd-D1* та контрастних за стійкістю до гіпотермії. Показана різниця між досліджуваними сортами практично за всіма показниками експресії антиоксидантних ензимів (активності, частки у спектрі окремих форм, ступеню зв'язку з мембранними структурами, ступеню і напрямку змін, співвідношенню активності різних ензимів) як у контрольних умовах, так і за умов досліду.

Ключові слова: *Triticum aestivum*; ген *Ppd-D1*; антиоксидантні ензими; експресія; гіпотермія.

Озимі форми пшениці мають значно більшу врожайність, ніж ярі. Однак, успішне використання озимих форм може суттєво обмежуватись, особливо в зонах ризикованого землеробства. Однією з властивостей, що лімітує у несприятливих роки продуктивність деяких озимих сортів є незначна холодо- і зимостійкість. Крім спеціальних генів (*fr*; *wcs120*, *cbf*, *tacr7* та ін.), велике значення щодо формування резистентності до низьких температур мають генні системи, відповідальні за розвиток рослин, в тому числі гени фотоперіодичної чутливості – *Ppd* [4; 5; 11; 13; 17; 20; 25; 27]. Гени індивідуального розвитку взаємодіють як між собою, так й з множиною інших генів, виконуючи роль тригерів, що ініціюють ланцюг наступних подій в житті рослини та реалізації їх властивостей [16; 19; 29; 39; 41].

Механізми плейотропної дії генів *Ppd* практично не вивчені. Для з'ясування генетико-біохімічних механізмів впливу генів фотоперіодичної чутливості на фізіологічні властивості рослин важливо, на нашу думку, дослідження особливостей експресії ензимів у різних за алельним складом цієї генетичної системи.

Зі складного комплексу ензимів живих організмів великий інтерес викликають ензими антиоксидантної системи, функціонування яких забезпечує адаптивність організмів за впливу будь-яких факторів довкілля [2]. Антиоксидантні ензими грають ключову роль у регуляції вмісту та балансу в клітинах активних форм кисню (АФК). АФК, як відомо, крім негативної дії виконують функції посередників та сигнальних молекул в реакції у відповідь на вплив різних факторів середовища, низьких температур зокрема [3; 8; 16; 23; 24; 34; 35; 43]. Робіт, які б свідчили про вплив генів фотоперіодичної чутливості на експресію антиоксидантних ензимів, ми не знайшли. В зв'язку з цим, метою роботи було вивчити експресивність деяких ензимів за впливу несприятливих температурних умов на рослини, що відрізняються за алельним складом генів *Ppd*. В межах поставленої мети виконували такі завдання: 1) провести якісний та кількісний аналіз електрофореграм множинних форм антиоксидантних ензимів (каталаз, пероксидаз, супероксиддисмутаза); 2) встановити чи є зв'язок між показниками спектрів досліджуваних ензимів і толерантністю до низьких температур та алельним складом гену *Ppd-D1*.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проводили на етіологованих паростках двох сортів озимої м'якої пшениці, які відрізняються за алельним складом генів фотоперіодичної чутливості – Миронівська 808 і Тіра. У Миронівській 808 усі алелі цієї системи рецесивні (*Ppd-A1b*, *Ppd-Bb*, *Ppd-D1b*) тоді, як у сорту Тіра присутній домінантний алель *Ppd-D1a* [11].

Експеримент здійснювали за такою схемою. Насіння пророщували у пластмасових кюветах у багатошаровому фільтрувальному папері в темряві при 26–27 °С протягом чотирьох діб. Потім одну половину рослин продовжували вирощувати за тих ж умов – «контроль». Другу половину паростків переносили у холодильник (2–4 °С) – «дослід». Для подальших досліджень через 2, 8, 24 і 72 години відбирали для кожного варіанту пагони з 10–15 рослин.

Визначали сиру масу, а також масу паростків, зневоднену після триразової обробки ацетоном при 2–4 °С. Отримання тканинних гомогенатів для електрофоретичного аналізу ензимів та електрофорез проводили, як описані раніше [9]. Препарати розчинних форм ензимів одержували за допомогою буферу без додавання детергенту, препарати мембранозв'язаних та інших міцно зв'язаних форм – після наступного екстрагування препаратів буфером з Тритоном Х-100 (далі в тексті – «зв'язані форми»).

Ензими в гелях детектували відповідно рекомендацій [30]. Неспецифічну пероксидазну активність (КФ. 1.11.1.7) виявляли з використанням бензидину як субстрат ензиму, аскорбінатпероксидазну (КФ. 1.11.1.11) і супероксиддисмутазну (КФ 1.15.1.1) – проявляли по відновленню нітротетразолієвого синього. Каталазну активність (КФ. 1.11.1.6) виявляли за забарвленням крохмалю відновленим йодом. Специфічність множинних форм пероксидази до

ферулової кислоти виявляли за допомогою підходу, запропонованого у роботі [40]. Принцип методу ґрунтується на конкуренції між різними субстратами пероксидаз. Ферулова кислота на відміну від бензидину не дає забарвленого продукту окислення. Порівнюючи спектри неспецифічної пероксидази, отримані при використанні суміші субстратів бензидин + ферулова кислота зі спектром після фарбування бензидином, можна визначити ензим, специфічний до конкурентного субстрату (в даному випадку – до ферулової кислоти) і розрахувати його активність.

Електрофореграми документували за допомогою сканувальної приставки до комп'ютера і провадили кількісний аналіз отриманих денситограм за комп'ютерною програмою АнаИС (М. А. Поджарский, Д. Г. Рибалка, *podzharsky@ukr.net*). Визначали кількість множинних форм ферментів, їх відносну електрофоретичну рухливість (*Rf*) та питому вагу (частку) у відсотках у загальному спектрі. Ферментативну активність оцінювали за площею піків на денситограмах відповідних множинних форм, і розраховували в умовних одиницях (пікселях) на 1 мг сухої тканини (далі в тексті – «од/мг»). Зазначений спосіб не показує істинний рівень ферментативної активності, але є інформативним для порівняльних досліджень.

Ступінь інгібування росту рослин та змін показників спектрів ензимів (Δ) за впливу низьких температур розраховували за формулою:

$$\Delta = (K - D)/K \times 100\%, \text{ де}$$

K і D – значення показників у контролі та досліді відповідно.

Результати досліджень опрацьовували з використанням пакету програм *Microsoft Excel*. Достовірність різниці між порівнюваними варіантами розраховували за допомогою парного двохвибіркового t -тесту.

Результати та їх обговорення

Зниження температури в дослідних варіантах призводило до гальмування росту рослин обох сортів. Однак, як видно з рис. 1, зменшення маси паростків у порівнянні з контролем більш суттєвим було у сорту Тіра. Це добре узгоджується з відомим фактом про максимальний у порівнянні з іншими гомеологічними генами негативний вплив домінантного алелю *PpD-D1a* на зимо-морозостійкість [11].

Для з'ясування ролі ензимів в адаптації рослин важливо, з одного боку, оцінити їх початковий стан, що свідчить про «готовність» рослини до захисту від пошкоджувальної дії стресового чинника. З іншого боку, важливим показником пристосувальних можливостей є особливості змін, що виникають у відповідь на несприятливі умови.

Одним з перших етапів адаптації до дії низьких температур є детоксикація активних форм кисню [44]. Відомо, що провідними ензимами, що виконують

зазначену функцію, є різні пероксидази і каталази, які руйнують пероксиди, та супероксиддисмутази (СОД), що нейтралізують супероксидні радикали. На рис. 2 показані спектри досліджуваних ензимів у нормальних умовах культивування.

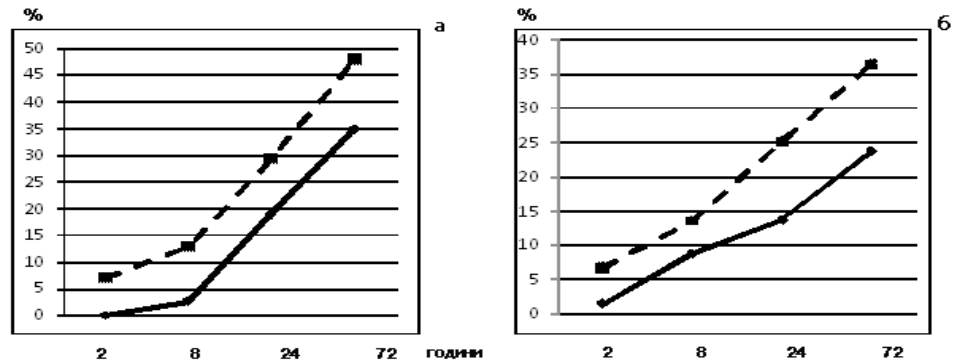


Рис. 1. Інгибування росту пагонів (%) під впливом низької температури за час експозиції (години): а – сира маса, б – маса зневоднених ацетоном паростків, суцільна лінія – сорт Миронівська 808, переривчаста лінія – сорт Тіра

Неспецифічна пероксидаза (гваякол-пероксидаза, пероксидаза III, класична пероксидаза) виявлена як серед розчинних, так і серед зв'язаних форм білків. Всього в спектрах обох сортів було до десяти множинних форм (рис. 2 а, б). За кількісного аналізу електрофоретичних спектрів виявлені форми ензиму об'єднали у три фракції: малорухливу (значення Rf 0,04, 0,06 і 0,08), зі середньою рухливістю (Rf 0,11, 0,14, 0,16 та 0,20) та швидко рухливу (Rf 0,40, 0,42 і 0,45). Як видно з табл. 1, у розподілі форм пероксидази по спектрах суттєвих, достовірних розбіжностей між сортами не встановлено. Проте, експресивність пероксидаз, що визначалась за їх активністю, значно вище в сорту Миронівська 808. Зазначена різниця торкалась в першу чергу малорухливих і швидко рухливих форм ензиму.

Для з'ясування адаптивної значущості ензиму важливо визначити не тільки його загальну активність (загальну експресивність) та кількість, активність і питому вагу окремих множинних форм (кількість генів і алелів ензиму та їх індивідуальну експресію). Також важливо визначити внутрішньоклітинну локалізацію окремих форм ензиму [1; 10; 12; 28]. В зв'язку з цим окремо досліджували зв'язані форми пероксидази та їх частку від загальної активності ензиму. Ці форми ензиму екстрагуються тільки за допомогою неіонних детергентів, оскільки знаходяться у міцному зв'язку з мембранними структурами клітин, або всередині субклітинних органел. Зв'язані пероксидази можуть виконувати інші функції у порівнянні з цитозольними (розчинними) формами [7; 31].

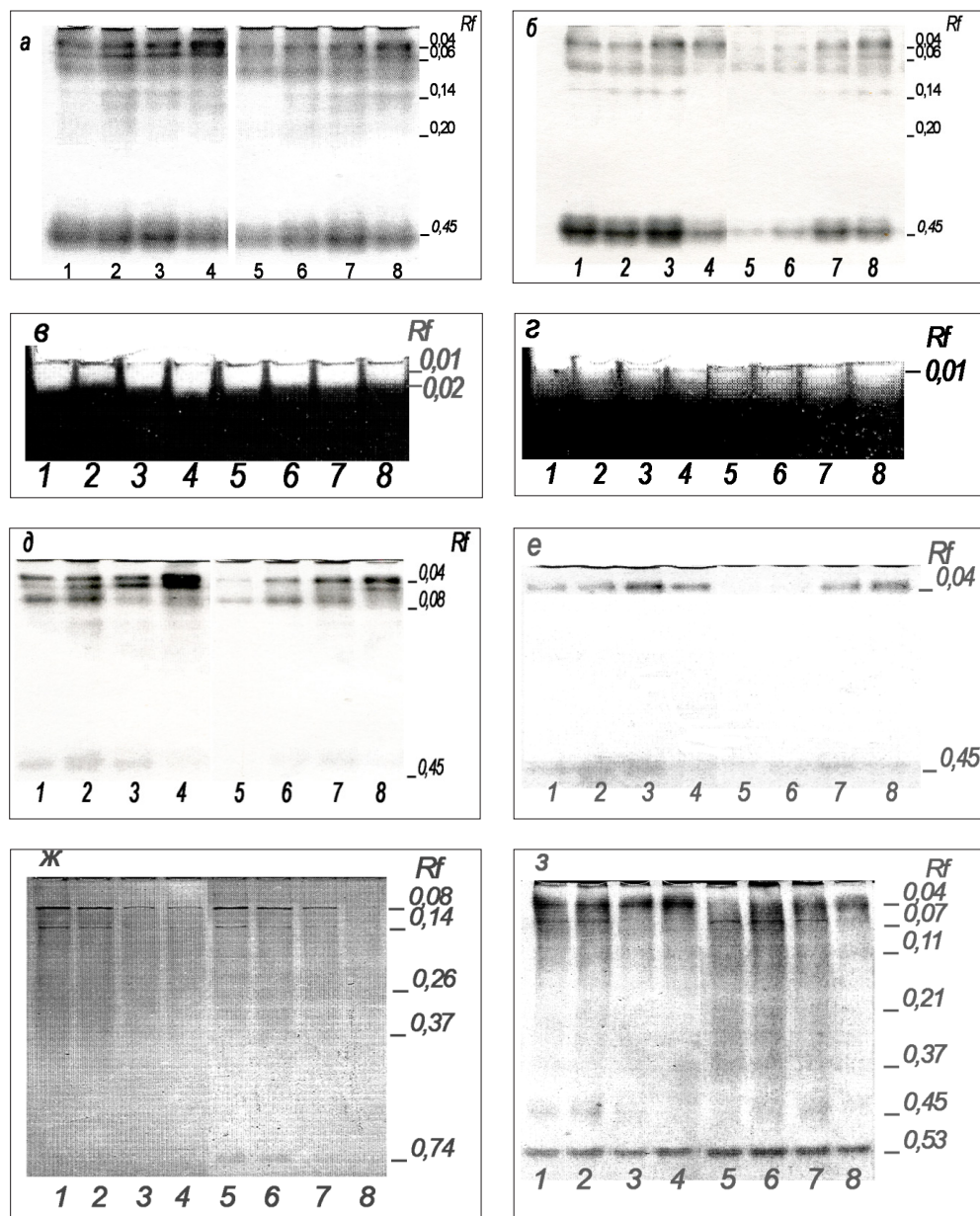


Рис. 2. Електрофоретичні спектри досліджуваних ензимів у контрольних рослин:
 а – пероксидаза неспецифічна розчинна, б – пероксидаза неспецифічна зв'язана, в – каталаза розчинна, г – каталаза зв'язана, д, е – спектри пероксидази при забарвленні сумішшю бензидин + ферулова кислота, д – розчинна форма, е – зв'язана форма, ж – аскорбінатпероксидаза, з – СОД; зображення спектрів аскорбінатпероксидази і СОД інвертовано; 1–4–Миронівська 808, 5–6–Ті-; ра; 1, 5–експозиція 2 годин, 2, 6–експозиція 8 годин, 3, 7–експозиція 24 години, 4, 8–експозиція 72 години

Таблиця 1

**Експресивність неспецифічної пероксидази досліджуваних сортів
у контролі та їх зміни у досліді**

АКТИВНІСТЬ у контролі (од/мг)								
Час спостережень, години	Миронівська 808				Тіра			
	Фракція			Загальна активність	Фракція			Загальна активність
	I	II	III		I	II	III	
2	182,81	40,05	546,47	769,34	94,41	6,00	63,44	163,85
8	257,08	58,59	461,28	776,95	110,78	18,03	116,00	244,81
24	323,38	45,80	636,32	1005,49	175,68	40,16	248,04	463,88
72	556,20	36,45	205,30	797,95	215,96	68,77	170,58	455,30
P	0,02	=	0,03	0,01				
РОЗПОДІЛ ОКРЕМИХ ФРАКЦІЙ ПО СПЕКТРУ В КОНТРОЛІ								
Час спостережень, години	Миронівська 808				Тіра			
	Фракція				Фракція			
	I	II	III		I	II	III	
2	23,76	5,21	71,03		57,62	3,66	38,72	
8	33,09	7,54	59,37		45,25	7,37	47,39	
24	32,16	4,56	63,28		37,87	8,66	53,47	
72	69,70	4,57	25,73		47,43	15,10	37,47	
P	=	=	=					
СТУПІНЬ ЗМІНИ АКТИВНОСТІ В ДОСЛІДІ У ПОРІВНЯННІ З КОНТРОЛЕМ (%)								
Час спостережень, години	Миронівська 808				Тіра			
	Фракція			Загальна активність	Фракція			Загальна активність
	I	II	III		I	II	III	
2	33,62	68,65	33,84	35,60	-61,81	-726,04	41,20	-46,25
8	38,88	63,80	20,47	29,83	-25,42	-109,12	82,93	19,75
24	65,81	81,60	51,30	57,35	44,86	29,46	86,70	65,90
72	75,07	62,40	0,94	55,42	61,12	74,22	95,16	75,85
P	0,05	=	0,02	=				
СТУПІНЬ ЗМІНИ РОЗПОДІЛУ ОКРЕМИХ ФРАКЦІЙ В ДОСЛІДІ У ПОРІВНЯННІ З КОНТРОЛЕМ (%)								
Час спостережень, години	Миронівська 808				Тіра			
	Фракція				Фракція			
	I	II	III		I	II	III	
2	-3,07	51,32	-2,74		-10,64	-464,83	59,80	
8	12,90	48,41	-13,34		-56,30	-160,60	78,72	
24	19,84	56,87	-14,18		-61,69	-106,85	60,99	
72	44,08	15,65	-122,20		-61,00	-6,74	79,95	
P	0,03	0,05	0,02					

Примітка: тут і в наступних таблицях: P – значення t-критерію; = достовірної різниці між сортами не встановлено.

Як видно з табл. 2, активність у контролі зв'язаної форми ензиму, як і загальна пероксидазна активність, в рослин сорту Миронівська 808 значно вище, ніж у сорту Тіра. Крім того, сорти суттєво різняться за часткою зв'язаної форми від загальної активності та її динамікою. Спочатку у Миронівської 808 в зв'язаній формі містилось більше половини ензиму (61,89 %) і, відповідно, висока активність, особливо у середньо- і швидкорухливої фракціях. В сорті Тіра спостерігалась протилежна картина. В паростках Миронівської 808 зміни активності зв'язаної пероксидази та їх частки, що спостерігалися на кожному строку культивування в контролі, в основному мали характер вираженого хвилеподібного коливання. У сорту Тіра зміни були більш монотонні.

Таким чином, досліджувані сорти суттєво різнилися між собою початковим станом пероксидаз, що не могло не вплинути на реакцію рослин у відповідь на дію стресового чинника.

Для аналізу особливостей реакції рослин досліджуваних сортів на гіпотермію оцінювали ступінь змін в експресії ензимів. Порівнювали показники контрольних і дослідних варіантів відповідних строків культивування. Видно, що за змінами у дослідному варіанті різниця між сортами стає ще помітнішою (табл. 1, 2). Негативні значення ступеня змін означає збільшення значення відповідного показника, позитивні – зменшення. Загальна активність неспецифічної пероксидази в паростках обох сортів в цілому зменшувалась. Але у сорту Миронівська 808 це відбувалось односпрямоване і поступово, тоді як у сорту Тіра в різні строки дії гіпотермії спостерігалися різноспрямовані зміни. В перші години культивування паростків Тіри при гіпотермії суттєво збільшувалась активність мало- і середньорухливих форм ензиму, після чого активність всіх фракцій зменшувалась. Образно кажучи, рослини сорту Тіра здійснювали «пошук» оптимального режиму функціонування в стресових умовах, що не могло не позначитись на енергоємності адаптації.

Протилежні зміни відбувались також й у розподілі фракцій пероксидази. В сорту Миронівська 808 питома вага мало- і середньорухливих форм поступово зменшувалась, а у сорту Тіра навпаки збільшувалась. Особливим для сорту Миронівська 808 було постійне зростання під час дії гіпотермії частки швидкорухливих форм ензиму (більше, ніж у два рази), які є мажорними у спектрі. У Тіри, навпаки, питома вага цих форм пероксидази неухильно знижувалась (табл. 1).

Неоднаковим чином змінювався в досліді також розподіл неспецифічної пероксидази між розчинною і зв'язаною фракціями (табл. 2). В Миронівській 808 мало- і швидкорухливі форми ензиму у всі строки культивування при гіпотермії поступово переходили в розчинний стан. Активність зв'язаної фракції зі середньою рухливістю суттєво змінювалась в різні періоди. У Тіри ж в залежності від тривалості культивування зміни мало- і швидкорухливі форми ензиму мали різноспрямований характер. Після двадцяти чотирьох годин витримування за низької температури активність мало- та середньорухливої зв'язаної форми пероксидази постійно збільшувалась.

Таблиця 2

Активність та питома вага зв'язаних форм пероксидази у досліджуваних сортів пшениці під час спостережень у контролі та їх зміни у досліді

АКТИВНІСТЬ У КОНТРОЛІ (од/мг)								
Час спостережень, години	Миронівська 808				Тіра			
	Фракції				Фракції			
	I	II	III	Всього	I	II	III	Всього
2	45,00	32,54	398,63	476,16	0,66	0,00	9,78	10,44
8	25,51	14,98	285,13	325,62	4,13	4,25	22,78	31,15
24	87,31	19,78	400,50	507,59	26,99	4,95	114,88	146,81
72	65,33	1,17	85,08	151,57	40,08	30,83	84,46	155,38
P	0,03	=	0,04	0,04				
ЧАСТКА АКТИВНОСТІ ЗВ'ЯЗАНИХ ФОРМ ВІД ЗАГАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ У КОНТРОЛІ (%)								
Час спостережень, години	Миронівська 808				Тіра			
	Фракції				Фракції			
	I	II	III	Всього	I	II	III	Всього
2	24,62	81,23	72,95	61,89	21,20	0,00	15,41	6,37
8	9,93	25,56	61,81	41,91	19,63	23,57	19,64	12,73
24	27,00	43,18	62,94	50,48	5,18	12,33	46,31	31,65
72	11,745	3,20	41,44	18,99	4,59	44,84	49,52	34,13
P	=	=	0,05	0,04				
СТУПІНЬ ЗМІНИ АКТИВНОСТІ В ДОСЛІДІ У ПОРІВНЯННІ З КОНТРОЛЕМ (%)								
Час спостережень, години	Миронівська 808				Тіра			
	Фракція			Загальна активність	Фракція			Загальна активність
	I	II	III		I	II	III	
2	83,57	4,43	45,59	49,42	38,20	-100,00	-137,07	-319,81
8	69,97	-102,19	34,79	28,44	20,27	-194,94	-95,44	-122,26
24	82,61	2,76	27,43	30,59	-81,35	-527,18	10,83	10,87
72	-7,62	-2305,58	87,73	-68,58	-157,22	-78,67	28,18	27,90
P	0,05	=	0,02	=				
СТУПІНЬ ЗМІНИ РОЗПОДІЛУ ОКРЕМИХ ФРАКЦІЙ В ДОСЛІДІ У ПОРІВНЯННІ З КОНТРОЛЕМ (%)								
Час спостережень, години	Миронівська 808			Тіра				
	Фракція			Фракція				
	I	II	III	I	II	III		
2	-3,07	51,32	-2,74	-10,64	-464,83	59,80		
8	12,90	48,41	-13,34	-56,30	-160,60	78,72		
24	19,84	56,87	-14,18	-61,69	-106,85	60,99		
72	44,08	15,65	-122,20	-61,00	-6,74	79,95		
P	0,03	0,05	0,02					

Сорт Миронівську 808 можна вважати стандартом стійкості до низьких температур. Зіставляючи активності пероксидази в тканинах досліджуваних сортів наприкінці витримування в умовах гіпотермії і напрямком змін у дослідних варіантах, можна припустити, що рослини сорту Тіра «намагаються» досягнути необхідного для оптимальної адаптації стандартного рівня.

Таким чином, досліджувані сорти різняться не тільки початковим станом ген-ензимної системи неспецифічної пероксидази, але й особливостями її функціонування в стресових умовах.

Іншим ферментом, що руйнує пероксид водню, є каталаза. Каталазна активність досліджуваних сортів, як і неспецифічна пероксидазна, знайдена в обох типах екстрактів: розчинному і зв'язаному (рис. 2 в, г). В розчинній фракції виявлено дві множинні форми, у зв'язаній – одна. Відносна електрофоретична рухливість множинних форм каталази складала 0,01 і 0,02. На відміну від пероксидази, більша частина каталази виявлялась у розчинній формі. За розподілом у спектрі і часткою зв'язаної форм ферменту досліджувані сорти у контролі достовірно не відрізнялись. Проте паростки сорту Тіра мали більш високу загальну каталазну активність. Можливо, це компенсувало відносно низьку у порівнянні з Миронівською 808 активність неспецифічної пероксидази (табл. 3).

По змінах у експресії каталазної активності при гіпотермії досліджувані сорти реагували неоднаковим чином (табл. 3). Так, у паростках Миронівської 808 активність і питома частка малорухливої каталази наприкінці дії гіпотермії знижувались, а в швидкорухливій зоні спостерігався протилежний процес змін. При цьому загальна активність ферменту практично не змінювалась. У сорту Тіра на тлі підвищення загальної активності каталази за 72-годинного впливу низької температури зміни активності і питомої ваги окремих фракцій ферменту мали протилежний характер у порівнянні з Миронівською 808.

Слід мати на увазі, що пероксид водню є не тільки одною з активних форм кисню. Це важлива сигнальна молекула, що впливає на ініціацію та розвиток процесів, необхідних при адаптації [14; 37]. Відповідно до цього, ген-ензимні системи, що відповідають за руйнацію пероксиду, повинні функціонувати таким чином, щоб підтримувати певну його концентрацію для виконання сигнальної функції. В зв'язку з цим, стають очевидними різні наслідки дії пероксидаз і каталаз. Вони пов'язані з різним механізмом нейтралізації пероксиду водню зазначеними ферментами [33; 42]. Каталаза з високою швидкістю самостійно відновлює обидва атоми водню, тобто повністю знищує пероксид. Пероксидаза ж один атом водню відновлює сама, а другий – за допомогою іншого донору протона шляхом окислювання якогось субстрату. Завдяки цьому пероксидаза може впливати на редокс-стан клітин та баланс різноманітних фізіологічно активних сполук [33; 42]. В зв'язку з вище сказаним, крім неспецифічної вивчали стан специфічних пероксидаз: пероксидази ферулової та аскорбінової кислот (рис. 2, д, е, ж).

Таблиця 3

Експресивність каталази в контролі та її зміни у досліді

ЗАГАЛЬНА АКТИВНІСТЬ В КОНТРОЛІ (ОД/МГ)						
Час спостережень, години	Миронівська 808			Тіра		
	Фракція		Всього	Фракція		Всього
	I	II		I	II	
2	48,68	27,78	76,46	46,84	16,50	63,34
8	42,20	13,44	55,64	65,90	34,02	99,92
24	67,46	28,02	95,48	76,88	49,98	126,86
72	66,86	40,74	107,60	69,74	56,52	126,26
P	=	=	0,05			
РОЗПОДІЛ ОКРЕМИХ ФРАКЦІЙ В КОНТРОЛІ (%)						
Час спостережень, години	Миронівська 808			Тіра		
	Фракція			Фракція		
	I	II		I	II	
2	63,67	36,33		73,95	26,05	
8	75,84	24,16		65,95	34,05	
24	70,65	29,35		60,60	39,40	
72	62,14	37,86		55,24	44,76	
P	=	=				
ЧАСТКА ЗВ'ЯЗАНИХ ФОРМ ВІД ЗАГАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ КАТАЛАЗИ В КОНТРОЛІ (%)						
Час спостережень, години	Миронівська 808			Тіра		
2	7,64			12,00		
8	33,14			8,25		
24	14,54			11,89		
72	11,12			8,05		
P	=			=		
СТУПІНЬ ЗМІН АКТИВНОСТІ КАТАЛАЗИ В ДОСЛІДІ У ПОРІВНЯНІ С КОНТРОЛЕМ (%)						
Час спостережень, години	Миронівська 808			Тіра		
	Фракція		Загальна активність	Фракція		Загальна активність
	I	II		I	II	
2	-35,37	4,10	-21,03	-69,51	-29,45	-59,08
8	-14,27	-17,86	-39,29	-19,33	15,70	-7,41
24	54,79	18,20	44,05	1,38	36,37	15,17
72	37,96	-51,69	4,01	-8,35	69,53	26,52
P	0,05	=	=			
СТУПІНЬ ЗМІН РОЗПОДІЛУ ФРАКЦІЙ КАТАЛАЗИ В ДОСЛІДІ У ПОРІВНЯНІ С КОНТРОЛЕМ (%)						
Час спостережень, години	Миронівська 808			Тіра		
	Фракція			Фракція		
	I	II		I	II	
2	-11,85	20,77		-6,56	18,62	
8	17,96	56,41		-11,10	21,51	
24	19,19	-46,20		-16,25	25,00	
72	35,36	-58,04		-47,44	58,54	
P	0,04	0,03				

Продовження таблиці 3

ЗМІНА ЧАСТКИ ЗВ'ЯЗАНИХ ФОРМ ВІД ЗАГАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ КАТАЛАЗИ В ДОСЛІДІ (%)		
Час спостережень, години	Миронівська 808	Тіра
2	-328,34	13,98
8	31,42	-36,04
24	-148,09	-52,27
72	-107,35	-336,65
P	=	

Ферулова кислота виконує у рослині багато функцій та сприяє розвитку толерантності до стресових впливів [21]. Вона, зокрема, легко вступає у вільно радикальні реакції, забезпечує їх зупинку через формування стабільного фенокислого радикалу [21; 26].

Як видно з табл. 4, пероксидази мають дуже велику спорідненість до ферулової кислоти. Незважаючи на те, що в цілому рівень спорідненості однаковий в обох досліджуваних сортах, розподіл у спектрі специфічних до ферулової кислоти ензимів неоднаковий. Особливо суттєва різниця спостерігалась серед швидкорухливих форм ензиму: у сорту Миронівська 808 їх частка значно нижча.

Різним чином також змінювалась спорідненість пероксидаз у відповідь на гіпотермію (табл. 4). Так, у Миронівській 808 частка специфічних до ферулової кислоти форм пероксидаз у зоні середньої рухливості зменшувалась, а в швидкорухливій – збільшувалась майже у два рази. В паростках сорту Тіри спорідненість середньорухливих форм навпаки зростала (особливо у перші години дії гіпотермії), специфічність швидкорухливих форм ензиму практично не змінювалась. Вказані відмінності посилювались різною питомою активністю пероксидаз у досліджуваних сортів, яка в цілому була значно вище в сорту Миронівська 808 (табл. 5).

Неоднаковим у різних сортів був розподіл специфічних до ферулової кислоти пероксидаз між розчинною та зв'язаною фракціями (табл. 6). Як видно з таблиці в Миронівській 808 за контрольних умов в цілому у зв'язаній формі була більша кількість пероксидази, ніж у Тіри. Лише наприкінці спостережень частка зв'язаного ензиму у Тіри досягала значень для Миронівської. Розрізнявся також і розподіл зв'язаних і розчинних форм по окремих фракціях.

Ще контрастніше розрізнялися сорти за зміною розподілу у відповідь на гіпотермію. У рослин Миронівської 808 за дії низької температури швидко- і малорухливі форми ензиму переходили у розчинний стан. Лише у мінорній (із середньою рухливістю) зоні домінував зворотний процес. У сорту Тіра зміни мали інший характер. В цілому частка зв'язаних пероксидаз, специфічних до ферулової кислоти, суттєво збільшувалась. Це відбувалося за рахунок форм з малою та середньою рухливістю. У швидкорухливій зоні зміни мали коливальний характер: у перші 2 години їх частка збільшувалась вдвічі, після чого (як у Миронівській) почала зменшуватись.

Таблиця 4

Спорідненість до ферулової кислоти форм неспецифічної пероксидази

ЧАСТКА ВІД ЗАГАЛЬНОЇ ПЕРОКСИДАЗНОЇ АКТИВНОСТІ (%) АКТИВНОСТІ, СПЕЦИФІЧНОЇ ДО ФЕРУЛОВОЇ КИСЛОТИ, У КОНТРОЛІ								
Час спостережень, години	Миронівська 808				Тіра			
	Фракції				Фракції			
	I	II	III	В цілому	I	II	III	В цілому
2	100,00	97,39	5,23	96,15	84,72	0,00	92,91	88,45
8	100,00	74,05	13,60	89,97	100,00	0,00	93,25	96,80
24	100,00	90,50	5,56	96,05	100,00	98,42	94,92	97,15
72	100,00	80,20	4,23	98,01	100,00	94,57	95,95	97,66
P	=	=	0,00	=				
ЗМІНА СПОРІДНЕНОСТІ (%) ДО ФЕРУЛОВОЇ КИСЛОТИ В ДОСЛІДІ У ПОРІВНЯННІ З КОНТРОЛЕМ								
Час спостережень, години	Миронівська 808				Тіра			
	Фракції				Фракції			
	I	II	III	В цілому	I	II	III	В цілому
2	0,00	100,0	-53,12	2,07	35,05	-100,00	-6,07	19,61
8	0,00	-26,93	30,53	-3,82	15,53	-100,00	-7,23	8,05
24	66,35	100,00	-59,51	20,36	19,55	-1,60	-5,35	9,38
72	61,95	100,00	-102,41	27,60	11,16	-5,74	-4,22	6,33
P	=	0,02	=	=				

Таблиця 5

Питома активність (од/мг) пероксидаз, специфічних до ферулової кислоти

КОНТРОЛЬ								
Час спостережень, години	Миронівська 808				Тіра			
	Фракції				Фракції			
	I	II	III	В цілому	I	II	III	В цілому
2	182,81	39,01	517,88	739,70	79,99	6,00	58,94	144,92
8	257,08	43,38	398,53	698,99	110,78	18,03	108,18	236,98
24	323,38	41,45	600,95	965,78	175,68	39,53	235,44	450,64
72	556,20	29,23	196,62	782,05	215,96	65,03	163,68	444,67
P	0,04	=	0,05	0,03				
ДОСЛІД								
Час спостережень, години	Миронівська 808				Тіра			
	Фракції				Фракції			
	I	II	III	В цілому	I	II	III	В цілому
2	121,35	12,56	332,59	466,50	84,06	49,56	36,76	170,38
8	157,12	19,93	332,21	509,26	117,36	37,71	19,80	174,87
24	37,21	8,43	282,42	328,06	77,94	28,33	32,99	139,26
72	52,75	13,71	185,96	252,41	74,59	17,73	8,26	100,58
P	=	0,05	0,00	0,01				

Неоднаковим чином змінювався в досліді також розподіл неспецифічної пероксидази між розчинним і зв'язаним фракціями (табл. 4, 6). В Миронівській 808 мало- і швидкорухливі форми ензиму у всі строки культивування при гіпотермії поступово переходили в розчинний стан. Активність зв'язаної фракції зі середньою рухливістю суттєво змінювалась в різні періоди. У Тіра ж в залежності від тривалості культивування зміни мало- і швидкорухливі форми ензиму мали різноспрямований характер. Після двадцяти чотирьох годин витримування за низької температури активність мало- та середньорухливої зв'язаної форми пероксидази постійно збільшувалась.

Таблиця 6

Частка від всього специфічного ензиму і розподіл зв'язаної пероксидази, специфічної до ферулової кислоти, (%)

КОНТРОЛЬ								
Час спостережень, години	Миронівська 808				Тіра			
	Фракції				Фракції			
	I	II	III	В цілому	I	II	III	В цілому
2	5,33	5,53	65,84	76,70	0,40	0,00	3,64	4,04
8	0,59	3,37	57,11	61,07	3,08	3,26	13,33	19,67
24	4,42	2,94	55,59	62,95	3,59	1,74	36,60	41,92
72	13,86	0,44	29,95	44,25	0,00	13,48	35,12	48,60
P	0,05	=	=	0,04				
ЗМІНА РОЗПОДІЛУ ЗВ'ЯЗАНОЇ ПЕРОКСИДАЗИ, СПЕЦИФІЧНОЇ ДО ФЕРУЛОВОЇ КИСЛОТИ, У ДОСЛІДІ ЗА ПОРІВНЯННЯ З КОНТРОЛЕМ (%)								
Час спостережень, години	Миронівська 808				Тіра			
	Фракції				Фракції			
	I	II	III	В цілому	I	II	III	В цілому
2	84,64	56,38	32,67	38,00	-2815,29	0,00	-110,97	-821,88
8	-57,56	-4,22	34,31	31,29	-304,40	-359,27	67,39	-61,57
24	89,06	77,15	59,01	61,96	-82,04	-806,08	73,27	23,56
72	90,46	-331,67	100,00	92,68	0,00	-4,72	91,68	44,65
P	=	=	0,05	0,05				

Специфічною пероксидазою, яка виконує важливі функції, є аскорбінатпероксидаза [38]. Аскорбінатпероксидазна активність спостерігалась лише у розчинній формі (рис. 2, ж). Всього виявлено 15 множинних форм цього ензиму. Для кількісного аналізу різні електрофоретичні форми об'єднали у п'ять фракцій. У малорухливу фракцію I включили чотири форми з електрофоретичною рухливістю від 0,04 до 0,10, до малорухливій фракції II – п'ять форм з R_f від 0,11 до 0,20. Середньорухливі форми об'єднали в дві фракції: III – з двома формами (R_f 0,24 і 0,27), IV – з двома формами (R_f 0,30 і 0,37). У швидкорухливій фракції V була одна форма з відносною електрофоретичною рухливістю 0,74.

В обох сортах за вирощування в контрольних умовах зі збільшенням строку експозиції спостерігалось постійне зниження питомої активності аскорбіна-

тпероксидази (табл. 7). Але досліджувані сорти розрізнялися початковим станом ензиму, як за активністю, так і за розподілом окремих фракцій у спектрі. Рослини сорту Миронівська 808 мали більш високу активність цієї специфічної пероксидази, як за сумарним показником, так і по окремих фракціях, крім швидкорухливої. Зазначена різниця зберігалась до кінця спостережень. Відносно розподілу фракції у спектрі можна відмітити таке: найбільш малорухлива (фракція I) і швидкорухлива фракція у Тіри мали вищі значення порівняно з Миронівською, частка решти фракцій форм ензиму – менші.

Таблиця 7

Показники ген-ензимної системи аскорбінатпероксидази у контрольних рослин

ПИТОМА АКТИВНІСТЬ (ОД/МГ)						
Миронівська 808						
Час спостережень, години	Фракції					Всього
	I	II	III	IV	V	
2	42,82	32,82	10,62	9,41	1,50	98,07
8	27,16	23,29	7,34	6,65	1,10	66,54
24	9,11	14,51	4,32	3,84	0,21	33,29
72	2,88	8,87	2,03	1,58	0,09	16,32
Тіра						
2	21,91	6,90	0,70	0,39	2,23	32,12
8	17,87	6,75	0,48	0,64	2,32	28,06
24	9,37	6,84	0,97	0,62	0,58	18,37
72	5,39	2,55	0,53	0,39	0,86	9,71
P	=	0,05	0,05	0,05	0,01	0,05
РОЗПОДІЛ ОКРЕМИХ ФРАКЦІЙ ПО СПЕКТРУ (%)						
Миронівська 808						
Час спостережень, години	Фракції					
	I	II	III	IV	V	
2	43,66	33,47	10,83	9,60	1,54	
8	40,81	35,00	11,03	10,00	1,68	
24	27,38	43,60	12,98	11,54	0,66	
72	17,66	54,34	12,44	9,68	0,58	
Тіра						
2	68,20	21,47	2,18	1,21	6,93	
8	63,70	24,05	1,72	2,27	8,26	
24	50,99	37,21	5,29	3,35	3,16	
72	55,52	26,22	5,44	4,02	8,80	
P	0,01	0,05	0,01	0,01	0,01	

За дії гіпотермії стан ген-ензимної системи аскорбінатпероксидази в досліджуваних сортів суттєво розрізнявся (табл. 8). В Миронівської 808 з самого початку впливу низької температури активність ензиму знижувалась і лише на пізніх строках експозиції збільшувалась у порівнянні з контролем активність малорухливої фракції I. У рослин сорту Тіра навпаки активність аскорбінатпе-

роксидази одразу різко підвищувалася і досягала такої у Миронівської. Різним чином у досліджуваних сортів змінювався при гіпотермії розподіл окремих множинних форм ензиму. У Миронівської за рахунок усіх інших форм збільшувалася частка у спектрі малорухливої фракції I. У Тіри навпаки частка цієї фракції зменшувалась, а питома вага у спектрі форм з середньою рухливістю і швидкорухливих – збільшувалась.

Таблиця 8

Зміни в експресії аскорбінатпероксидази за дії гіпотермії

СТУПІНЬ ЗМІН АКТИВНОСТІ У ДОСЛІДІ ЗА ПОРІВНЯННЯ З КОНТРОЛЕМ (%)						
Миронівська 808						
Час спостережень, години	Фракції					Всього
	I	II	III	IV	V	
2	58,15	78,70	75,85	64,54	72,00	67,86
8	30,37	86,94	93,38	89,48	72,73	64,24
24	-137,04	62,28	82,92	86,37	23,81	10,94
72	-597,11	33,06	79,45	71,52	55,56	-74,35
Тіра						
2	-9,66	-25,06	-229,83	-1117,73	-177,78	-42,85
8	-44,99	88,23	-525,43	-699,53	-255,99	-53,50
24	-127,54	30,27	-8,48	-160,41	-685,25	-81,21
72	62,87	33,83	-23,58	-63,27	8,77	40,73
P	=	=	0,05	0,05	0,05	=
СТУПІНЬ ЗМІН РОЗПОДІЛУ ФОРМ ЕНЗИМУ У ДОСЛІДІ ЗА ПОРІВНЯННЯ З КОНТРОЛЕМ (%)						
Миронівська 808						
Час спостережень, години	Фракції					
	I	II	III	IV	V	
2	-30,21	33,74	24,86	-10,31	12,89	
8	-94,72	63,49	81,49	70,58	23,73	
24	-166,15	57,65	80,82	84,69	14,45	
72	-299,85	61,61	88,21	83,67	74,51	
Тіра						
2	23,23	12,45	-130,89	-752,46	-94,46	
8	5,55	92,33	-307,44	-420,86	-131,91	
24	-25,57	61,52	40,14	-43,71	-333,33	
72	37,35	-11,63	-108,49	-175,45	-53,91	
P	0,04	=	0,04	0,04	0,04	

Таким чином, ензими, що руйнують пероксид водню, у різних за алельним складом локусу *Ppd-D1* та різною толерантністю до гіпотермії сортів по-різному реагують на вплив цього стресора. Причому, особливості реагування полягають не тільки і не стільки в змінах активності. Можна припускати, що більш важливим є перерозподіл активності ензимів між різними їх формами. Так, для Миронівської 808 є властивим висока активність неспецифічних пе-

роксидаз, серед яких при гіпотермії зростала частка швидкорухливих форм, які переходили у розчинний стан. Крім того, змінювалась також їх специфічність, а саме підвищувалась спорідненість до ферулової кислоти. Загальна активність специфічної аскорбінатпероксидази навпаки зменшувалась. Таким чином, нейтралізація надлишку пероксиду у рослин сорту Миронівська 808 сполучалася з регуляцією редокс-стану, оскільки аскорбінова кислота разом із глутатіоном є важливішими компонентами підтримки окислювально-відновлюваного балансу клітин [32].

В рослин сорту Тіра «пріоритет» у захисту від пероксиду належав каталази. Пероксидази, специфічні до ферулової кислоти, зв'язувались з мембранними структурами. Підвищувалась загальна активність аскорбінатпероксидази, що не могло не спричинити зменшення кількості такої важливої речовини як аскорбінова кислота, і в результаті могло призвести до порушення редокс-стану.

Інший ензим, що виконує важливу роль в антиоксидантному захисті – це СОД. В досліджуваних рослинах супероксиддисмутазна активність виявлена лише в розчинній формі. Всього в електрофоретичному спектрі ензиму було до 15 смуг. При здійсненні кількісного аналізу електрофореграм множинні форми об'єднали у чотири фракції: малорухливу I (з Rf 0,04, 0,05, 0,07 і 0,09), малорухливу II (Rf 0,11, 0,14, 0,17 і 0,21), середньорухливу – III (Rf 0,28, 0,34, 0,37 і 0,40) і швидкорухливу – IV (Rf 0,43, 0,45 і 0,53).

За узагальненими показниками активності СОД у контролі рослини сорту Тіра не поступаються рослинам Миронівської 808, але за динамікою активності під час розвитку паростків у контрольних умовах сорти помітно розрізнялися (табл. 9). В Миронівській 808 за період від 2 до 72 годин активність ензиму на одиницю маси поступово зростала. При цьому мажорною (біля половини всій активності) була малорухлива фракція I. У Тіри на початку спостережень активність розподілялася приблизно рівномірно між окремими фракціями. За подальшою експозицією активності малорухливої I та швидкорухливої фракцій практично не змінювались, активність ж решти фракцій – зменшувалась. Відповідно рівню активності фракцій різнився їх розподіл у спектрі ензиму.

Міжсортові розбіжності в експресії супероксиддисмутази зберігаються й під впливом низької температури (табл. 10). У рослин Миронівської 808 з перших ж годин різко збільшувалась активність всіх форм ензиму. У Тіри це відбувалось лише у двох фракціях: малорухливій I і швидкорухливій. У наступні години у Миронівської подовжувала зростати активність СОД, крім малорухливій фракції I. Лише наприкінці експозиції за низької температури (3 доби) зупинилась активація ензиму. У рослин сорту Тіра процес збільшення активності подовжувався лише в швидкій фракції ензиму, причому головним чином у перші години. В підсумку, загальна активність СОД за впливу гіпотермії в Миронівській 808 збільшувалась, у Тіри – знижувалась. Відповідним чином відбувалися зміни у розподілі фракцій по спектру ензиму.

Таблиця 9

Показники ген-ензимної системи СОД у контрольних рослин

ПИТОМА АКТИВНІСТЬ (ОД/МГ)					
Миронівська 808					
Час спостережень, години	Фракції				
	I	II	III	IV	Всього
2	72,60	22,44	2,32	22,50	119,85
8	78,23	25,00	9,49	60,35	173,06
24	78,45	10,21	13,19	36,25	138,09
72	111,23	30,87	28,98	48,68	219,75
Тіра					
2	43,94	51,83	31,20	32,78	159,74
8	81,45	53,25	36,83	49,65	221,18
24	53,33	43,58	21,90	47,01	165,81
72	44,12	14,49	6,28	31,12	96,01
P	0,05	0,05	=	=	=
РОЗПОДІЛ ОКРЕМИХ ФРАКЦІЙ ПО СПЕКТРУ (%)					
Миронівська 808					
Час спостережень, години	Фракції				
	I	II	III	IV	
2	60,57	18,72	1,93	18,77	
8	45,20	14,44	5,48	34,87	
24	56,81	7,39	9,55	26,25	
72	50,61	14,05	13,19	22,15	
Тіра					
2	27,50	32,44	19,53	20,52	
8	36,83	24,08	16,65	22,45	
24	32,16	26,28	13,21	28,35	
72	45,96	15,09	6,54	32,41	
P	0,04	0,03	=	=	

Супероксидний радикал – це активна форма кисню, яка є першою у ланцюгу хімічних реакцій, що призводить до оксидативного стресу [6; 19]. В зв'язку з цим, для забезпечення стійкості до стресових чинників, низької температури зокрема, є необхідним адекватний рівень агентів, руйнуючих супероксидний радикал, до яких із ензимів відноситься СОД. Як свідчать отримані дані, Тіра володіла меншим потенціалом щодо нейтралізації цієї активної форми кисню. Те, що Миронівська 808 має високий рівень супероксиддисмутазної активності, добре пояснює значну пероксидазну активність у рослин цього сорту. Справа в тому, що у процесі нейтралізації супероксид-аніону виникає пероксид водню, створюючи тим самим надлишок цієї фізіологічно активної речовини.

Не викликає сумніву думка, що для дослідження механізмів адаптації важливо не тільки з'ясування особливостей функціонування ген-ензимних систем окремо, а й їх взаємодію. З цією метою розраховували співвідношення активності досліджуваних ензимів та їх коливання у часі (табл. 11, рис. 3). Для вста-

Таблиця 10

Зміни в експресії супероксиддисмутази за дії гіпотермії

СТУПІНЬ ЗМІН АКТИВНОСТІ У ДОСЛІДІ ЗА ПОРІВНЯННЯ З КОНТРОЛЕМ (%)					
Миронівська 808					
Час спостережень, години	Фракції				
	I	II	III	IV	Всього
2	-34,71	-198,85	-1795,83	-288,67	-147,17
8	6,91	-138,82	-210,20	-22,05	-36,14
24	44,84	-316,46	-117,35	-27,66	-16,39
72	63,12	-42,13	30,69	19,88	34,48
Тіра					
2	-22,53	33,84	24,28	-74,37	-5,74
8	30,06	43,72	60,41	11,69	34,28
24	30,15	2,75	28,53	-16,46	9,52
72	50,37	15,06	30,83	-29,50	17,87
P	=	0,03	0,05	=	0,05
СТУПІНЬ ЗМІН РОЗПОДІЛУ ФОРМ ЕНЗИМУ У ДОСЛІДІ ЗА ПОРІВНЯННЯ З КОНТРОЛЕМ (%)					
Миронівська 808					
Час спостережень, години	Фракції				
	I	II	III	IV	
2	45,50	-20,91	-667,00	-57,24	
8	31,62	-75,42	-127,85	10,35	
24	52,60	-257,83	-86,75	-9,69	
72	43,71	-116,92	-5,78	-22,28	
Тіра					
2	-15,88	37,43	28,39	-64,91	
8	-6,41	14,36	39,76	-34,37	
24	22,80	-7,48	21,01	-28,72	
72	39,56	-3,42	15,78	-57,69	
P	0,03	0,05	0,05	0,05	

новлення розбіжностей між сортами, з одного боку, порівнювали часову динаміку змін співвідношень активності досліджуваних ензимів у контрольних умовах. З іншого боку, з'ясовували для кожного сорту, чи є різниця напряму змін у досліді за порівняння з контролем. Тобто, чи відбувається за дії стресора перебудова функціонування всього геному, або принаймні відповідного комплексу генів. Загальний напрям змін визначали за різницею значень на початку і наприкінці спостережень.

Як видно, у контролі по семі з дев'яти показників динаміка їх змін є діаметрально протилежною у досліджуваних сортах. Винятком, за яким немає різниці між сортами, є відношення активності розчинних форм неспецифічної пероксидази та аскорбінатпероксидази до активності СОД. Це можна пояснити необхідністю для клітин будь-якого сорту нейтралізації надлишку пероксиду водню, якого продукує СОД, та збереження необхідного вмісту аскорбінової кислоти.

Таблиця 11

Співвідношення активності ензимів у досліджуваних сортах та їх динаміка

Сорт	Умови культивування	Години	Види співвідношень*								
			За загальною активністю				За активністю розчинних форм ензимів				
			nsPO/ SOD	ferPO/ SOD	cat/ SOD	nsPO/ cat	nsPO/ SOD	ascPO/ SOD	ferPO/ SOD	cat/ SOD	nsPO/ cat
М	Контроль	2	6,42	6,17	0,64	10,06	2,45	0,81	1,14	0,59	4,15
		8	4,49	4,04	0,32	13,96	2,61	0,38	1,00	0,21	12,13
		24	7,28	6,99	0,69	10,53	3,61	0,23	1,80	0,59	6,10
		72	3,63	3,56	0,49	7,42	2,94	0,07	0,67	0,44	6,76
	Напря́м змін	↓0,18	↓0,14	↓0,00	↓0,31	↑0,39	↓0,92	↓0,00	↓0,04	↑0,01	
Т	Контроль	2	3,73	0,91	2,30	2,59	0,96	0,20	0,87	0,35	2,75
		8	3,01	1,07	2,71	2,45	0,97	0,13	0,47	0,41	2,33
		24	8,70	2,72	3,94	3,66	1,91	0,11	1,00	0,67	2,84
		72	10,32	4,63	2,75	3,61	3,12	0,10	1,22	1,21	2,58
	Напря́м змін	↑0,83	↑0,91	↑0,00	↑0,90	↑0,88	↓0,81	↑0,88	↑0,43	0,00=	
R ^к		=	0,05	0,01	0,02	0,05	=	=	=	0,03	
М	Дослід	2	1,67	1,57	0,31	5,35	1,15	0,11	0,49	0,24	4,80
		8	2,31	2,16	0,33	7,03	1,62	0,10	0,77	0,28	5,74
		24	2,67	2,04	0,33	8,03	1,73	0,18	2,49	0,26	6,57
		72	2,47	1,75	0,72	3,44	1,68	0,19	3,69	0,65	2,58
	Напря́м змін	↑0,68	↑0,04	↑0,64	↓0,09	↑0,68	↑0,81	↑0,94	↑0,65	↓0,19	
Т	Дослід	2	1,42	1,01	0,60	2,38	1,04	0,27	0,63	0,53	1,94
		8	1,35	1,20	0,74	1,83	0,97	0,30	0,82	0,66	1,48
		24	1,05	0,93	0,72	1,47	0,76	0,22	0,63	0,59	1,29
		72	1,39	1,28	1,18	1,19	1,05	0,07	0,93	0,76	1,38
	Напря́м змін	0,08 =	↑0,17	↑0,76	↓0,98	0,03 =	↓0,74	↑0,38	↑0,65	↓0,70	
R ^д		0,04	0,01	0,01	0,02	0,05	=	=	0,02	0,03	

Примітка: * – наведено дані відношення активності загальної або розчинної форми ензимів; М – Миронівська 808, Т – Тіра; nsPO – неспецифічна пероксидаза, ferPO – пероксидаза, специфічна до ферулової кислоти, ascPO – аскорбінатпероксидаза, cat – каталаза, SOD – супероксиддисмутаза; напрям змін – тенденція зміни на підставі зіставлення показників з початку і наприкінці спостережень: ↓ – зменшення значень, ↑ – збільшення значень, = – суттєвої зміни немає, цифри означають достовірність (R²) лінійної апроксимації, напівжирним шрифтом відмічені задовільна і висока достовірність лінійної апроксимації; R^к – вірогідність різниці середнього між сортами в контролі, R^д – вірогідність різниці середнього між сортами у досліді, = достовірної різниці між середніми значеннями для сортів не встановлено.

Також розрізнялися сорти і за змінами співвідношень, що відбувались при гіпотермії за порівняння з контролем. У Миронівській 808 майже за всіма показниками змінювалась спрямованість процесів. Це свідчить про істотну перебудову функціонування відповідних ген-ензимних систем у відповідь на дію стресора. Реакція рослин сорту Тіра значно слабкіше: зміни спостерігались лише за чотирма показниками. Слід відмітити, що динаміка експресії досліджуваних ензимів (активність, частка у спектрі окремих форм, відношення активності і т.д.) лише у декількох випадках задовільно відповідала лінійної

закономірності. Здебільше вона добре описувалася (достовірність апроксимації – $R^2=1$) поліноміальною функцією третього ступеня (рис. 3).

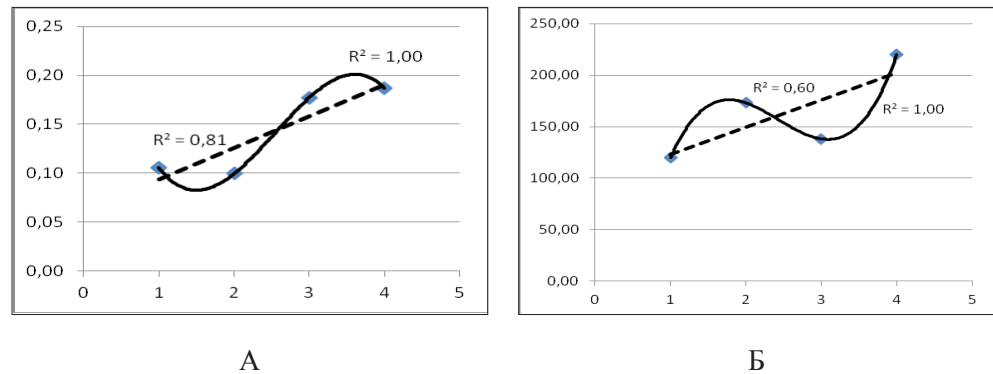


Рис. 3. Приклад графічного опису зміни показників у часі:

А – співвідношення активності аскорбінатпероксидази до активності СОД при культивуванні рослин Миронівської 808 у досліді, Б – загальна активність СОД у Миронівської 808 у контролі; переривчаста лінія – лінійна апроксимація, суцільна – поліноміальна; поруч з відповідною лінією вказано значення достовірності апроксимуючої лінії

Таким чином, динаміці змін досліджуваних ген-ензимних систем властиві коливання. Коливальні процеси є головною особливістю живих систем і спостерігаються на всіх рівнях їх організації та віддзеркалюють особливості механізмів регулювання життєдіяльності при розвитку організмів та їх адаптації. Зазначені механізми здійснюються за принципом зворотного зв'язку із запізненням. Можна припустити, що регуляція експресії антиоксидантних ензимів, що була виявлена, здійснюється речовинами, АФК зокрема, які виникають у процесі індивідуального розвитку та за дії стресорів. Це, в цілому відоме положення, проте потребує конкретного підтвердження в спеціальних експериментах.

Висновок

Добре відомо, що сорти озимої м'якої пшениці з доміантним алелем у локусі *PpD-D1*, мають знижену стійкість до низьких температур у порівнянні з рослинами, що мають альтернативний рецесивний алель. Але генетико-біохімічні механізми такого зв'язку мало з'ясовані. Не викликає сумнівів, що важливою складовою цього механізму є ген-ензимні системи, відповідальні за експресію антиоксидантних ензимів. Саме від адекватного функціонування ензимів антиоксидантного захисту залежить багато сторін життєдіяльності організму: підтримання необхідного мінімального рівня активних форм кисню, що виконують сигнальну і медіаторну функції, захист від руйнуючої дії надлишку радикалів, забезпечення оптимального редокс-статусу, інактивація побічних токсичних речовин та ін.

Як показали наведені у роботі дані, у сортів, що відрізнялися за складом алелів *Ppd-D1* та стійкістю до гіпотермії, ген-ензимні системи функціонують неоднаковим, часто протилежним чином. Причому, різниця спостерігалася як у контрольних умовах, так і за дії стресового чинника. Це свідчить про те, що для формування адаптації має значення не тільки особливості реагування метаболічних процесів за впливу несприятливих умов, а також їх первинний, попередній стан.

У рослинах сорту Миронівська 808, на відміну від Тіри, головну роль у нейтралізації пероксиду грає пероксидаза. Це проявляється як у більш високій її активності, як у особливостях змін її експресії під час дії гіпотермії, так і у співвідношеннях активності пероксидази до активності інших антиоксидантних ензимів. Як вже відмічалось, пероксидаза значно багатофункціональніше, ніж каталаза. Провідна роль пероксидази приводить до більш тонкої регуляції клітинного метаболізму при адаптації. Крім того, у Миронівській 808 в порівнянні з сортом Тіра у відповідь на дію низької температури протилежним чином змінюється функціонування специфічних пероксидаз: аскорбінатпероксидази і пероксидази, специфічної до ферулової кислоти. Зниження при цьому активності аскорбінатпероксидази сприяє збереженню дуже важливого компоненту – аскорбінової кислоти, що забезпечує адекватне підтримання редокс-стану клітин під час дії стресора.

Неоднаково змінюється експресія такого важливого антиоксидантного ензиму як СОД. На підставі отриманих даних можна вважати, що у Тіри система захисту від оксидативного вибуху при стресі «не справляється» з надлишком виникаючих при цьому супероксидних радикалів.

Весь комплекс вище зазначених розходжень є однією з причин нижчої стійкості рослин сорту Тіра до гіпотермії у порівнянні з Миронівською 808.

Стаття надійшла до редакції 15.08.2019.

Список використаної літератури

1. Виноградова Е. Н. Пероксидазная активность в клетках листьев и в связи с их устойчивостью к выбросам коксохимического предприятия / Виноградова Е. Н. // Промышленная ботаника. – 2006. – Вып. 6. – С. 35–40.
2. Колупаев Ю. Е. Механизмы адаптации растений к гипотермии: роль антиоксидантной системы / Ю. Е. Колупаев, Е. И. Горелова, Т. О. Ястреб // Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія : Біологія. – 2018. – Вип. 1. – С. 6–33. –: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Vkhnau_biol_2018_1_3
3. Колупаев Ю. Е. Активные формы кислорода и стрессовый сигналинг у растений / Ю. Е. Колупаев, Ю. В. Карпец // Ukr. Biochem. J. – 2014. – Vol. 86, N 4. – P. 18–35.
4. Литвиненко Н. О. Связь темпов осеннего и ранневесеннего роста и развития растений с продуктивностью и морозостойкостью у озимой мягкой пшеницы / Н. О. Литвиненко, В. В. Козлов // Технология возделывания зерновых колосовых культур и проблемы их селекции. – Мирновка, 1990. – С. 24–30.
5. Мокану Н. В. Различия эффектов аллелей генов *Vrd1* и *Ppd-D1* по зимо-морозостойкости и

- урожаю у озимой пшеницы / Н. В. Мокану, В. И. Файт // Цитология и генетика, 2006. – Т. 42, № 6. – С. 26–33.
6. Нетюхайло Л. Г., Харченко С.В. Активні форми кисню / Л. Г. Нетюхайло, С. В. Харченко // *Young Scientist*. – 2014. – № 9 (12). – С. 131–135.
 7. Олюнина Л. Н. Изменение активности пероксидазы апопластного и цитозольного компартментов при гипертермическом воздействии на проростки пшеницы / Л. Н. Олюнина, В. П. Французова, Н. М. Мещанинова // В кн.: Факторы устойчивости растений в экстремальных природных условиях и техногенной среде: Материалы Всероссийской научной конференции. Иркутск, 10-13 июня 2013 г. – Directveida, 2015, 501 с. – С. 185–188.
 8. Ткачук В. А. Пероксид водорода как новый вторичный посредник / В. А. Ткачук, П. А. Тюрин-Кузьмин, В. В. Белоусов, А. В. Воротников // *Биологические мембраны*. – 2012. – Т. 29, № 1–2. – С. 21–37.
 9. Топтиков В. А. Генетико-биохимические особенности мутантных линий сои / В. А. Топтиков, Д. А. Жарикова, Г. А. Чеботарь, И. В. Темченко, С. В. Чеботарь // *Вісник ОНУ. Біологія*. – 2018. – Т. 22, вип.2 (44). – С. 73–94.
 10. Тупик Н. Д. Изоферментный спектр пероксидазы Chlorophyta / Н. Д. Тупик, Е. К. Золотарева // *Альгология*. – 2008. – Т. 18, № 2. – С. 123–133.
 11. Файт В. И. Влияние различий генов Ppd на агрономические признаки озимой мягкой пшеницы / В. И. Файт, В. Р. Федорова // *Цитология и генетика*, 2007. – Т. 41, № 6. – С. 26–33.
 12. Часов А. В. Активация экстраклеточной пероксидазы корней пшеницы при действии ксенобиотиков / А. В. Часов, В. Я. Алексеева, О. П. Колесников, Ф. В. Минибаева // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2010. – Т. 46, № 4. – С. 472–478.
 13. Babben S. Association genetics studies on frost tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) reveal new highly conserved amino acid substitutions in CBF-A3, CBF-A15, VRN3 and PPD1 genes / S. Babben, E. Schliephake, P. Janitza, T. Berner, J. Keilwagen, M. Koch, F. A. Arana-Ceballos, S. E. Templer, Y. Chesnokov, T. Pshenichnikova, J. Schondelmaier, A. Börner, K. Pillen, F. Ordon, D. Perovic // *BMC Genomics*. 2018. – Vol. 19. – P. 409–433. doi: 10.1186/s12864-018-4795-6
 14. Cerný M. Hydrogen Peroxide: Its Role in Plant Biology and Crosstalk with Signalling Networks / M. Cerný, H. Habánová, M. Berka, M. Luklová, B. Brzobohatý // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – Vol. 19 (9). – P. 1–30; doi:10.3390/ijms19092812
 15. Chinnusami V. Gene regulation during cold acclimation in plants / V. Chinnusami, J. Zhu, J.-K. Zhu // *Physiol. Plantarum*. – 2006. – Vol. 126. – P. 52–61.
 16. Considine M. J. Redox regulation of plant development / M. J. Considine, C. H. Foyer // *Antioxidants and redox signaling*. – 2014. – Vol. 21, No 9, – P. 1305–1326.
 17. Fowler D. B. Overwinter Low-Temperature Responses of Cereals: Analyses and Simulation / D. B. Fowler, B. M. Byrns, K. J. Greer // *Crop science*. – 2014. – Vol. 54 (6). – P. 2395–2405.
 18. Fowler S. Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are indicated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway / S. Fowler, M. F. Thomashow // *Plant Cell*. – 2002. – Vol. 14. – P. 1675–1690.
 19. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutase / I. Fridovich // *Annu. Rev. Biochem.* – 1995. – Vol. 64. – P. 97–112.
 20. Gorash A. The relationship among freezing tolerance, vernalization requirement, Ppd alleles and winter hardiness in European wheat cultivars / A. Gorash, R. Armoniene, Ž. Lliatucas, G. Brasauskas // *The Journal of Agricultural Science*. – 2017. – Vol 155, Issue 9 – P. 1353–1370. <https://doi.org/10.1017/S0021859617000521>
 21. Graf E. Antioxidant potential of ferulic acid/ E. Graf // *Free Radic Biol Med*. – 1992. – Vol. 13(4). – P. 435–448. doi: 10.1016/0891-5849(92)90184-i
 22. Hura T. Physiological and biochemical tools useful in drought tolerance detection in genotypes of winter triticale: Accumulation of ferulic acid correlates with drought tolerance / T. Hura, S. Grzesiak, K. Hura, E. Thiemt, K. Tokarz, M. Wedzony // *Ann. Bot.* – 2007. – Vol. 100 (4). – P. 767–775. doi: 10.1093/aob/mcm162

23. Janmohammadi M. Proteomic analysis of cold acclimation in winter wheat under field conditions / M. Janmohammadi, H.-P. Mock, A. Matros // *Icel. Agric. Sci.* – 2014. – No 27. – P. 3–15.
24. Jiménez-Quesada M. J. NADPH Oxidase-Dependent Superoxide Production in Plant Reproductive Tissues / M. J. Jiménez-Quesada, J. Á. Traverso, J. Dios Alché de // *Frontiers in Plant Science.* – 2016. – Vol. 7. – Article 359 doi: 10.3389/fpls.2016.00359.
25. Khotyljova L.V. Influence of genetic systems of VRN and PPD genes on the ecological adaptation of wheat and triticale / L.V. Khotyljova, L.N. Kaminskaya, L.V. Koren // *Biologiya*, 2002. – № 4. – P. 45–48.
26. Kikuzaki H. Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds / H. Kikuzaki, M. Hisamoto, K. Hirose, K. Akiyama, H. J. Taniguchi // *Agric Food Chem.* – 2002. – Vol. 50(7) – P. 2161–2168. doi: 10.1021/jf011348w
27. Limin A. E. D. Low-temperature tolerance and genetic potential in wheat (*Triticum aestivum* L.): response to photoperiod, vernalization, and plant development / A. E. D. Limin, B. Fowler // *Planta.* – 2006. – Vol. 224, No. 2. – P. 360–366. <https://www.jstor.org/stable/23389462>
28. Lin C. C. Cell wall peroxidase activity, hydrogen peroxide level and NaCl inhibited root growth of rice seedlings / C. C. Lin, C. H. Kao // *Plant and Soil.* – 2001. – Vol. 230(1). – P. 135–143.
29. Loukoianov A. Regulation of VRN-1 vernalization genes in normal and transgenic polyploidy wheat / A. Loukoianov, L. Yan, A. Blechl, A. Sanchez, J. Dubcovsky // *Plant Physiol.* – 2005. – Vol. 138. – P. 2364–2373. doi: 10.1104/pp.105.064287
30. Manchenko G. P. Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels / G. P. Manchenko. – CRC Press LLC, 2003. 592 p.
31. Minibaeva F.V. Superoxide Production and the Activity of Extracellular Peroxidase in Plant Tissues under Stress Conditions / F.V. Minibaeva, L.Kh. Gordon // *Russian Journal of Plant Physiology.* – 2003. – Vol. 50, № 3. – C. 411–416.
32. Noctor G. Ascorbate and glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control / G. Noctor, C. H. Foyer // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1998. – Vol. 49. – P. 249–79.
33. Pandey V.P. A Comprehensive Review on Function and Application of Plant Peroxidases / V. P. Pandey, M. Awasthi, S. Singh, S. Tiwari, U.N. Dwivedi // *Biochem Anal Biochem.* – 2017. – Vol. 6, № 1 – P. 308–324. doi: 10.4172/2161-1009.1000308
34. Penfield S. Temperature perception and signal transduction in plants / S. Penfield // *New Phytologist.* – 2008. – No 179. – P. 615–628.
35. Qu Y. Functional regulation of plant NADPH oxidase and its role in signaling / Y. Qu, M. Yan, Q. Zhang // *Plant signaling and behavior.* – 2017. – Vol. 12, No. 8. – P. 1–3.
36. Sakai A., Larcher W. Frost Survival of Plants: Responses and Adaptation to Freezing Stress. *Ecological Studies* (V. 62). - Springer Science & Business Media, 2012. – 321 p.
37. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress / H. Sies // *Redox Biology.* – 2017. Vol. 11 – P. 613–619. <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.035>
38. Sofo A. Ascorbate Peroxidase and Catalase Activities and Their Genetic Regulation in Plants Subjected to Drought and Salinity Stresses / A. Sofo, A. Scopa, M. Nuzzaci, A. Vitti // *Int. J. Mol. Sci.* – 2015. – Vol. 16. – P. 13561–13578. doi:10.3390/ijms160613561
39. Sung S. Molecular genetic studies of the memory of winter / S. Sung, R. M. Amasino // *J. Exp. Bot.* – 2006. – Vol. 57, N 13. – P. 3369–3377. DOI: 10.1093/jxb/erl105
40. Toptikov V. A. Effect of various compounds on electrophoretic spectra of multiple molecular forms of peroxidase / V. A. Toptikov, L. F. D'iachenko, V. N. Totskii // *Ukrainskii Biokhimicheskii zhurnal.* – 1997. – Vol. 69, N. 1 – P. 41–49.
41. Tranquilli G. E.. Epistatic interactions between vernalization genes *Vrn-Am1* and *Vrn-Am2* in diploid wheat / G. E. Tranquilli, J. Dubcovsky J. // *J. Hered.* – 2000. – Vol. 91. – P. 304–306.
42. Vidossich P. Catalases versus peroxidases: DFT investigation of H₂O₂ oxidation in models systems and implications for heme protein engineering / P. Vidossich, M. Alfonso-Prieto, C. Rovira // *J. Inorg. Biochem.* – 2012. – Vol. 117. – P. 292–297. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2012.07.002

43. Xia X.-J. Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance / X.-J. Xia, Y.-H. Zhou, K. Shi, et al. // J. Exp. Bot. – 2015. – Vol. 66, No. 10. – P. 2839–2856.
44. Yadav S. K. Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. / S. K. Yadav // Agron. Sustain. Dev. – 2010. – Vol. 30. – P. 515–527. doi: 10.1051/agro/2009050.

V. A. Toptikov¹, S. V. Chebotar^{1,2}

¹Odesa Mechnykov National University, Department of Genetics and Molecular Biology, Dvoranska Street, 2, Odesa, 65082, Ukraine

²Breeding and Genetic Institute - National Center for Seed Science and Variety Research of the National Academy of Sciences of Ukraine, Ovidiopolska Street, 3, Odesa, 65036, Ukraine

GENETIC AND BIOCHEMICAL ASPECTS OF THE ASSOCIATION OF THE Ppd-D1 LOCUS WITH THE RESISTANCE OF WINTER SOFT WHEAT TO LOW TEMPERATURE

Abstract

The aim of this work was to study the expression of some enzymes under the influence of unfavorable temperature conditions on plants that differ in allelic composition of Ppd genes. To accomplish this goal, the following tasks were set: 1) to carry out qualitative and quantitative analysis of electrophoregrams of multiple forms of antioxidant enzymes (catalase, peroxidase, superoxide dismutase); 2) to establish whether there is a relationship between the spectra of the enzyme under study and the tolerance to low temperatures and allelic composition of the Ppd-D1 gene.

Material. Winter wheat varieties: Mironovskaya 808 (recessive alleles of the Ppd-D1 gene) and Tira (the dominant allele of the Ppd-D1 gene). **Methods.** Electrophoresis. Complex comparative analysis. Methods of descriptive statistics. Computer data processing.

Results. It was shown that in varieties that differ in the composition of Ppd-D1 alleles and resistance to hypothermia gene-enzyme systems function in a different, often opposite way. Moreover, the difference was observed both in control conditions and under stress. This indicates that for the formation of adaptation, not only the peculiarities of the reaction of the metabolic reaction to adverse conditions, but also their initial state are important.

In Mironovskaya 808 plants, unlike Tira, peroxidase plays a major role in neutralizing peroxide. This is manifested both in higher activity and in features of changes in enzyme expression during hypothermia, as well as in the ratio of peroxidase activity to the activity of other antioxidant enzymes. The leading role of peroxidase, due to its versatility, leads to a finer regulation of cellular metabolism during adaptation. In addition, in Mironovskaya 808, in response to the action of low temperature, the functioning of specific peroxidases, ascorbate peroxidase and ferulic-specific peroxidase, changes in the opposite way, compared to the variety Tira. The expression of such an important antioxidant enzyme as SOD also changes in different ways.

Based on the data obtained, it can be assumed that Tira's system of protection against

oxidative explosion in stress "does not cope" with the excess of superoxide radicals formed.

Keywords: *Triticum aestivum*; Ppd-D1 gene; antioxidant enzymes; expression; hypothermia.

References

1. Vinogradova Ye.N., (2006), «Peroxidase activity in cells of *Fraxinus lanceolata* Borkh. and *Acer pseudoplatanus* L. leaves in connection with their tolerance to coke-chemical plant» [«Пероксидазная активность в клетках листьев и в связи с их устойчивостью к выбросам коксохимического предприятия»], *Industrial botany* [Промышленная ботаника], No. 6, P. 35-40.
2. Kolupaev Yu. E., Gorelova E. I., Yastreba T. O., (2018), «Mechanisms of plant adaptation to hypothermia: role of antioxidant system» [«Механизмы адаптации растений к гипотермии: роль антиоксидантной системы»], *Bulletin of Kharkiv National Agrarian University. Series: Biology*, [Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія : Біологія], No. 1, P. 6-33, http://nbuv.gov.ua/UJRN/Vkhnu_biol_2018_1_3
3. Kolupaev Yu. E., Karpets Yu. V., (2014), «Reactive oxygen species and stress signaling in plants» [«Активные формы кислорода и стрессовый сигналинг у растений»], *Ukr. Biochem. J.*, Vol. 86, No 4, P. 18-35.
4. Litvinenko N.A. Kozlov V.V., (1990), «Relationship between the rates of autumn and early spring growth and development of plants with productivity and frost resistance in winter common wheat» [«Связь темпов осеннего и ранневесеннего роста и развития растений с продуктивностью и морозостойкостью у озимой мягкой пшеницы»], *The technology of cultivation of cereal crops and problems of their selection – Mironovka* [Технологія вирощування зернових колосових культур і проблеми їх селекції – Міроновка], P. 24-30.
5. Mokanu N.V., Fayt V.I., (2006), «The differences of the effects of *Vrd1* and *Ppd-D1* gene alleles on winterhardiness, frost resistance and yield in winter wheat» [«Различия эффектов аллелей генів *Vrd1* і *Ppd-D1* по зимо-морозостійкості і урожаю у озимій пшениці»], *Cytology and Genetics*, Vol. 42, No 6, P. 26-33.
6. Netukhaylo L.G., Kharchenko S.V., (2014), «Reactive oxygen» [«Активні форми кисню»], *Young Scientist*, No 9 (12), P. 131–135.
7. Olyunina L.N., Frantsuzova V.P., Meshchaninova N.M., (2015) «Change in the activity of peroxidase of apoplastic and cytosolic compartments with hyperthermic effect on wheat seedlings» [«Изменение активности пероксидазы апопластного и цитозольного компартментов при гипертермическом воздействии на проростки пшеницы»] In: *Factors of plant resistance in extreme environmental conditions and industrial environment: Materials of the All-Russian Scientific Conference. Irkutsk, June 10-13, 2013* [Факторы устойчивости растений в экстремальных природных условиях и техногенной среде: Материалы Всероссийской научной конференции. Иркутск, 10-13 июня 2013 г.]– Directmedia, 501 p., P. 185-188.
8. Tkachuk V. A., Tyurin-Kuzmin P. A., Belousov V. V., Vorotnikov A. V. (2012), «Hydrogen Peroxide as a New Second Messenger» [«Пероксид водорода как новый вторичный посредник»], *Biological membranes* [Биологические мембраны], 2012, Vol. 29, No 1–2. – С. 21–37.
9. Toptikov V. A., Zharikova D. A., Chebotar H. A., Temchenko I. V., Chebotar S. V., (2018), «Genetic and biochemical peculiarities of soya mutant lines» [«Генетико-биохимические особенности мутантных линий сои»], *Bulletin of ONU, Biology* [Вісник ОНУ, Біологія], Vol. 22, No 2 (44), P. 73-94.
10. Tupik N.D., Zolotareva E.K., (2008), «Isoenzyme spectrum of peroxidase chlorophyta» [«Изоферментный спектр пероксидазы хлорофиты»], *Algology* [Альгология], Vol. 18, No 2, P. 123-133.
11. Fayt V. I., Fedorova V. R., (2007), Influence of differences in *Ppd* genes on agronomic indicators of soft winter wheat, *Cytology and Genetics*, Vol. 18, No 2, P. 350-356.

12. Chasov A.V., Alekseeva V. Ya., Kolesnikov O.P., Minibaeva F. V., (2010) «Activation of extracellular peroxidase of wheat roots under the action of xenobiotics» [«Aktivatsiya ekstrakletchnoy peroksidazy korney pshenitsy pri deystvii ksenobiotikov»], *Applied Biochemistry and Microbiology*, [Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya], Vol. 46, No 4, P. 472-478.
13. Babben S., Schliephake E., Janitzka P., Berner, Keilwagen J., Koch M., Arana-Ceballos F. A., Templer S. E., Chesnokov Y., Pshenichnikova T., Schondelmaier J., Börner A., Pillen K., Ordon F. and Perovic D. (2018) «Association genetics studies on frost tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) reveal new highly conserved amino acid substitutions in *CBF-A3*, *CBF-A15*, *VRN3* and *PPD1* genes», *BMC Genomics*, Vol. 19, No 1: 409. doi: 10.1186/s12864-018-4795-6
14. Černý M., Habánová H., Berka M., Luklová M., Brzobohatý B. (2018), «Hydrogen Peroxide: Its Role in Plant Biology and Crosstalk with Signalling Networks», *Int. J. Mol. Sci.*, Vol. 19, No 2812, P. 1-30; doi:10.3390/ijms19092812
15. Chinnusami V., Zhu J., Zhu J.-K. (2006) «Gene regulation during cold acclimation in plants», *Physiol. Plantarum*, Vol. 126, P. 52-61.
16. Considine M. J., Foyer C. H. (2014), «Redox regulation of plant development», *Antioxidants and redox signaling*, Vol. 21, No 9, P. 1305–1326.
17. Fowler D. B., Byrns B. M., Greer K. J. (2014), «Overwinter Low-Temperature Responses of Cereals: Analyses and Simulation», *Crop science*, Vol. 54, november–december, P. 2395-2405.
18. Fowler S., Thomashow M. F., (2002), «Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are indicated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway», *Plant Cell.*, Vol. 14. P. 1675-1690.
19. Fridovich I., (1995), «Superoxide radical and superoxide dismutase», *Annu. Rev. Biochem.*, V.64, P. 97 – 112.
20. Gorash A., Armoniene R., Lliatucas Ž., Brasauskas G., (2017), «The relationship among freezing tolerance, vernalization requirement, *Ppd* alleles and winter hardiness in European wheat cultivars», *The Journal of Agricultural Science*, Vol. 155, Issue 9, P. 1353-1370. <https://doi.org/10.1017/S0021859617000521>
21. Graf E., (1992), «Antioxidant potential of ferulic acid», *Free Radic Biol Med.*, Oct;13(4), P. 435- 448. doi: 10.1016/0891-5849(92)90184-i
22. Hura T., Grzesiak S., Hura K. et al., (2007), «Physiological and biochemical tools useful in droughttolerance detection in genotypes of winter triticale: Accumulation of ferulic acid correlates with drought tolerance», *Ann. Bot.*, Vol. 100, P. 767-775.
23. Janmohammadi M., Mock H.-P., Matros A., (2014), «Proteomic analysis of cold acclimation in winter wheat under field conditions», *Icel. Agric. Sci.*, No 27, P. 3–15.
24. Jiménez-Quesada M. J., Traverso J. Á., Alché J. Dios de, (2016), «NADPH Oxidase-Dependent Superoxide Production in Plant Reproductive Tissues», *Frontiers in Plant Science*, Vol. 7, Article 359 doi: 10.3389/fpls.2016.00359.
25. Khotyljova L.V., Kaminskaya L.N., Koren L.V. (2002) «Influence of genetic systems of *VRN* and *PPD* genes on the ecological adaptation of wheat and TRITICALE», *Biologiya*, № 4, P. 45-48.
26. Kikuzaki H, Hisamoto M, Hirose K, Akiyama K, Taniguchi H. J., (2002), «Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds», *Agric Food Chem.*, Mar 27; 50(7):2161-2168. doi: 10.1021/jf011348w
27. Limin A. E., Fowler D. B., (2006), « Low-temperature tolerance and genetic potential in wheat (*Triticum aestivum* L.): response to photoperiod, vernalization, and plant development», *Planta*, Vol. 224, No. 2, P. 360-366. <https://www.jstor.org/stable/23389462>
28. Lin C. C., Kao C. H., (2001), «Cell wall peroxidase activity, hydrogen peroxide level and NaCl inhibited root growth of rice seedlings», *Plant and Soil.*, Vol. 230, P. 135–143.
29. Loukoianov A., Yan L., Blechl A., Sanchez A., Dubcovsky J., (2005), «Regulation of *VRN-1* vernalization genes in normal and transgenic polyploidy wheat», *Plant Physiol.*, Vol. 138., P. 2364- 2373.
30. Manchenko G. P., (2003), *Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels*, CRC Press LLC, 592 p.

31. Minibaeva F.V., Gordon L.Kh., (2003), «Superoxide Production and the Activity of Extracellular Peroxidase in Plant Tissues under Stress Conditions», *Russian Journal of Plant Physiology.*, Vol. 50. No 3. С. 411-416.
32. Noctor G., Foyer C. H., (1998), «Ascorbate and glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control», *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, Vol. 49., P. 249–79
33. Pandey V.P., Awasthi M., Singh S., Tiwari S., Dwivedi U.N., (2017), «A Comprehensive Review on Function and Application of Plant Peroxidases», *Biochem Anal Biochem*, Vol. 6, No 1, 308. doi: 10.4172/2161-1009.1000308
34. Penfield S., (2008), «Temperature perception and signal transduction in plants», *New Phytologist.*, No 179, P. 615–628.
35. Qu Y., Yan, Q. Zhang, (2017), «Functional regulation of plant NADPH oxidase and its role in signaling», *Plant signaling and behavior.*, Vol. 12, No. 8, P. 1–3.
36. S. K. Yadav., (2010), «Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review», *Agron. Sustain. Dev.* Vol. 30, P. 515–527.
37. Sakai A., Larcher W., (2012), *Frost Survival of Plants: Responses and Adaptation to Freezing Stress. Ecological Studies*, Vol. 62., Springer Science & Business Media, 321 p.
38. Sies H., (2017), «Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress», *Redox Biology*, Vol. 11, P. 613–619. <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.035>
39. Sofò A., Scopa A., Nuzzaci M. and Vitti A., (2015), «Ascorbate Peroxidase and Catalase Activities and Their Genetic Regulation in Plants Subjected to Drought and Salinity Stresses», *Int. J. Mol. Sci.* Vol. 16, P. 13561-13578; doi:10.3390/ijms160613561
40. Sung S., Amasino R. M., (2006), «Molecular genetic studies of the memory of winter», *J. Exp. Bot.*, Vol. 57., No 13, P. 3369-3377.
41. Toptikov V. A., D'iachenko L. F., Totskii V. N., (1997), «Effect of various compounds on electrophoretic spectra of multiple molecular forms of peroxidase», *Ukrainskii Biokhimičeskii zhurnal.*, Vol. 69, No.1, P. 41–49.
42. Tranquilli G. E., Dubcovsky J., (2000), «Epistatic interactions between vernalization genes Vrn-Am1 and Vrn-Am2 in diploid wheat», *J. Hered.*, Vol. 91, P. 304-306.
43. Vidossich P., Alfonso-Prieto M, Rovira C., (2012), «Catalases versus peroxidases: DFT investigation of H₂O₂ oxidation in models systems and implications for heme protein engineering», *J. Inorg. Biochem.*, Dec.117, P. 292-297. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2012.07.002
44. Xia X.-J., Zhou Y.-H., Shi K., et al., (2015), «Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance», *J. Exp. Bot.*, Vol. 66, No. 10, P. 2839–2856,