

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І  
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

**Факультет захисту рослин біотехнології та екології**

**ПОГОДЖЕНО**

**Декан факультету захисту рослин,  
біотехнологій та екології**

\_\_\_\_\_ **Юлія КОЛОМІЄЦЬ**

«\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ р.

**ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ**

**Завідувач кафедри фізіології,  
біохімії рослин та біоенергетики**

\_\_\_\_\_ **Світлана ПРИЛУЦЬКА**

«\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ р.

**БАКАЛАВРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

**на тему: «Аспекти функціонування антиоксидантних ферментів рослин  
пшениці за дії стресорів»**

Спеціальність 162 «Біотехнологія і біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Біотехнологія і біоінженерія»

**Гарант освітньої програми**

кандидат біологічних наук,  
доцент

\_\_\_\_\_ **Олена КВАСКО**

(підпис)

**Керівник бакалаврської  
кваліфікаційної роботи**

кандидат  
сільськогосподарських  
наук, доцент

\_\_\_\_\_ **Наталія НЕСТЕРОВА**

(підпис)

**Виконав**

\_\_\_\_\_ (підпис)

**Андрій НАЛИВАЙКО**

**Київ – 2026**

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І  
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ  
Факультет захисту рослин біотехнології та екології**

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

**Завідувач кафедри  
фізіології, біохімії рослин та  
біоенергетики**

\_\_\_\_\_**Світлана ПРИЛУЦЬКА**  
(підпис)

«\_\_\_\_»\_\_\_\_2026 р.

**З А В Д А Н Н Я  
ДО ВИКОНАННЯ БАКАЛАВРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ  
ЗДОБУВАЧУ**

**Наливайку Андрію Васильовичу**

Спеціальність 162 «Біотехнологія і біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «**Біотехнології та біоінженерія**»

Тема бакалаврської кваліфікаційної роботи

«Аспекти функціонування антиоксидантних ферментів рослин пшениці за дії стресорів»

Затверджена наказом від «30» жовтня 2025 року № 2596 «С»

Термін подання завершеної роботи на кафедру «22» травня 2026 року

Вихідні дані до бакалаврської кваліфікаційної роботи:

Рослини пшениці звичайної (*Triticum aestivum* L.); абіотичні стресори;  
антиоксидантні ферменти; рівень ліпідної пероксидації

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Оксидативний стрес та антиоксидантна система рослин
2. Характеристика антиоксидантних ферментів пшениці
3. Вплив високотемпературного та сольового стресу на активність антиоксидантних ферментів пшениці звичайної

Дата видачі завдання «30» жовтня 2025 р.

**Керівник бакалаврської  
кваліфікаційної роботи**

**Наталія НЕСТЕРОВА**

\_\_\_\_\_  
(підпис)

**Завдання взяв до виконання**

\_\_\_\_\_  
(підпис)

**Андрій НАЛИВАЙКО**

## РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка до дипломної роботи «Аспекти функціонування антиоксидантних ферментів рослин пшениці за дії стресорів»: 39 с., 21 рисунок, 47 літературних джерела.

**Мета дослідження:** дослідити особливості функціонування антиоксидантних ферментів у рослин пшениці за дії стресорів.

**Об'єкт дослідження:** рослини пшениці звичайної (*Triticum aestivum* L.)

**Предмет дослідження:** активність антиоксидантних ферментів у рослинах пшениці за дії стресорів.

**Методи дослідження:** фізіолого-біохімічні (визначення активності антиоксидантних ферментів), морфо-фізіологічні (оцінка реакції рослин пшениці за дії стресорів), статистичні (обробка та аналіз одержаних результатів).

## ABSTRACT

Explanatory note to the bachelor's thesis "Aspects of Antioxidant Enzyme Functioning in Wheat Plants under the Influence of Stressors": 39 p., 21 figures, 47 references.

**Research objective:** to investigate the functional characteristics of antioxidant enzymes in wheat plants under the influence of stressors.

**Object of research:** common wheat plants (*Triticum aestivum* L.)

**Subject of research:** antioxidant enzyme activity in wheat plants under the influence of stressors.

**Research methods:** physiological and biochemical (determination of antioxidant enzyme activity), morphological and physiological (assessment of wheat plant responses under stressor exposure), statistical (processing and analysis of the results).

## ЗМІСТ

|                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ, ТЕРМІНІВ .....                                | 3  |
| ВСТУП.....                                                                          | 4  |
| РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....                                                    | 5  |
| 1.1 Оксидативний стрес у рослин .....                                               | 5  |
| 1.2 Антиоксидантна система рослин .....                                             | 7  |
| 1.3. Антиоксидантні ферменти рослин .....                                           | 8  |
| 1.3.1. Супероксиддисмутаза .....                                                    | 8  |
| 1.3.2. Каталаза .....                                                               | 9  |
| 1.3.3. Пероксидаза.....                                                             | 10 |
| 1.3.4. Аскорбатпероксидаза .....                                                    | 11 |
| 1.3.5. Глутатіонредуктаза.....                                                      | 12 |
| 1.4. Пшениця звичайна ( <i>Triticum aestivum</i> L.) .....                          | 13 |
| 1.4.1. Вплив посухи на антиоксидантні ферменти пшениці.....                         | 16 |
| 1.4.2. Вплив засолення на антиоксидантні ферменти пшениці.....                      | 17 |
| РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ .....                                     | 18 |
| 2.1 Об'єкт дослідження та його характеристика .....                                 | 18 |
| 2.2. Визначення відносного вмісту води.....                                         | 20 |
| 2.3. Визначення рівня ліпідної пероксидації.....                                    | 20 |
| 2.4. Отримання ферментних екстрактів та визначення вмісту білка.....                | 22 |
| 2.5. Визначення активності антиоксидантних ферментів.....                           | 23 |
| 2.5.1. Супероксиддисмутаза.....                                                     | 23 |
| 2.5.2. Каталаза.....                                                                | 23 |
| 2.5.3. Пероксидаза .....                                                            | 25 |
| 2.5.4. Аскорбатпероксидаза .....                                                    | 25 |
| 2.6. Статистична обробка даних .....                                                | 26 |
| РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....                                               | 27 |
| 3.1. Визначення вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів за умов посухи ..... | 27 |
| 3.2. Визначення активності супероксиддисмутази .....                                | 28 |
| 3.3. Визначення активності каталази.....                                            | 29 |

|                                                     |    |
|-----------------------------------------------------|----|
| 3.4. Визначення активності пероксидази .....        | 30 |
| 3.5. Визначення активності аскорбатпероксидази..... | 31 |
| ВИСНОВКИ.....                                       | 33 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....                     | 34 |

## **ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ, ТЕРМІНІВ**

АФК — активні форми кисню;

ТБКРР — тіобарбітурат-реактивні речовини;

ВВВ — відносний вміст води;

МДА — малоновий діальдегід;

СОД — супероксиддисмутаза;

КАТ — каталаза;

ПОД — пероксидаза;

АПХ — аскорбатпероксидаза;

ГР — глутатіонредуктаза;

GSH — відновлений глутатіон;

GSSG — окиснений глутатіон;

## ВСТУП

**Актуальність дослідження:** У сучасних умовах сільськогосподарські культури все частіше зазнають негативного впливу несприятливих чинників навколишнього середовища, серед яких особливе значення належить абіотичним та біотичним стресам різної природи. Дія посухи, засолення, високих і низьких температур, важких металів та інших стресорів призводить до порушень фізіолого-біохімічних процесів у рослинному організмі, зниження інтенсивності росту і розвитку, а також зменшення продуктивності та урожайності культур. Одним із наслідків дії такого стресу є надмірне утворення активних форм кисню, які зумовлюють розвиток оксидативного стресу та пошкодження клітинних структур рослин.

Пшениця є однією з найважливіших зернових культур, яка має велике продовольче та господарське значення. Водночас, вона є чутливою до дії різних стресорів, що негативно позначається на її ключових показниках розвитку: рості та врожайності. У зв'язку з цим вивчення аспектів функціонування антиоксидантних ферментів у рослин пшениці за дії стресорів різної природи є актуальним як з теоретичної, так і практичної точки зору, оскільки це може стати основою для подальшого пошуку шляхів підвищення стійкості культур до несприятливих умов вирощування.

**Метою дослідження** було дослідити особливості функціонування антиоксидантних ферментів рослин пшениці (пероксидази, каталази, аскорбатпероксидази та супероксиддисмутази) за дії стресових чинників.

**Об'єктом дослідження** є фізіолого-біохімічні процеси у рослинах пшениці за умов дії стресорів.

**Предметом дослідження** були активність антиоксидантних ферментів рослин пшениці за дії стресових чинників.

**Методи дослідження:** аналіз наукової літератури, фізіолого-біохімічні (визначення активності антиоксидантних ферментів), морфо-фізіологічні.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1 Оксидативний стрес у рослин

Оксидативний стрес є одним із ключових чинників, що обмежують ріст і продуктивність рослин у природних умовах. Він виникає внаслідок порушення рівноваги між утворенням активних форм кисню (АФК) та здатністю клітини їх нейтралізувати за допомогою антиоксидантної системи рослини. В оптимальних умовах, АФК утворюються як побічні продукти клітинного метаболізму, що виконують важливу сигнальну функцію, регулюючи процеси росту, розвитку та адаптації. Однак, під впливом несприятливих чинників навколишнього середовища, таких як посуха або низькі температури, засолення, водний дефіцит, а також забруднення ґрунту токсичними важкими металами, відбувається надмірне накопичення АФК. Це призводить до пошкодження клітинних структур, зокрема білків, нуклеїнових кислот та інших біомолекул [8].

Окрім безпосереднього пошкоджуючого впливу, АФК відіграють ключову роль у складних сигнальних мережах рослинної клітини. Так, встановлено, що АФК здатні ініціювати специфічні сигнальні каскади, які забезпечують передачу інформації про стресові умови між різними клітинними компартментами. Важливим механізмом є так званий ретроградний сигналінг, при якому сигнали, сформовані в хлоропластах під впливом АФК, передаються до ядра клітини, що призводить до зміни експресії генів і адаптації рослини до стресу. Такий зв'язок між органелами забезпечує координацію метаболічних процесів і підтримання клітинного гомеостазу [24].

Крім того, АФК беруть участь у взаємодії з іншими сигнальними системами, включаючи фітогормони (абсцизова кислота та саліцилова кислота). Це дозволяє інтегрувати різні стресові чинники в єдину системну відповідь рослини та забезпечує формування комплексних захисних реакцій. Також, показано, що АФК можуть поширюватися не лише в межах однієї клітини, але і між клітинами, формуючи міжклітинні сигнали, які запускають адаптаційні

реакції у віддалених тканинах рослин. Така властивість дозволяє культурі реагувати на локальний стрес як на загрозу для всього організму [30].

Важливим аспектом розвитку оксидативного стресу є локалізація процесів утворення АФК в різних клітинних органелах. Основним їх джерелом у рослин є хлоропласти, де за умов стресу порушується робота фотосинтетичного електротранспортного ланцюга. Надлишок енергії призводить до витоку електронів на молекулярний кисень з утворенням супероксидного аніон-радикала [8].

Реактивні форми кисню утворюються в клітинах рослин як побічні продукти процесів перенесення електронів, що відбуваються під час фотосинтезу та дихання. В оптимальних умовах їх допустимий рівень підтримується на стабільному рівні завдяки функціонуванню антиоксидантної системи, яка забезпечує збереження окисно-відновного балансу [4].

До основних елементів АФК, що утворюються в клітинах рослин, належать супероксидний аніон-радикал, перекис водню, гідроксильний радикал та синглетний кисень. Кожна з цих сполук має різну хімічну активність і ступінь токсичності. Найреакційноздатнішим є гідроксильний радикал, який може швидко взаємодіяти з біомолекулами до їх незворотного пошкодження. Водночас, перекис водню є стабільнішою формою, здатною дифундувати між клітинними компартментами та виконувати сигнальні функції [36].

Таким чином, оксидативний стрес є універсальною реакцією рослин на дію несприятливих чинників середовища. Його розвиток пов'язаний із порушенням рівноваги між утворенням АФК та здатністю клітини їх нейтралізувати. Ступінь прояву оксидативного стресу значною мірою визначає рівень пошкодження клітинних структур і, відповідно, життєздатність рослин в умовах стресу. Тому підтримання окисно-відновного балансу є ключовим чинником адаптації рослин до дії абіотичних стресів [17].

## 1.2 Антиоксидантна система рослин

Антиоксидантні ферменти є ключовими компонентами захисної системи рослинного організму, що забезпечують нейтралізацію АФК, які утворюються в процесі оптимального метаболізму та надлишково накопичуються за умов стресу. Ці ферменти каталізують специфічні реакції перетворення АФК на менш реакційно здатні або нетоксичні сполуки, тим самим запобігаючи окислювальному пошкодженню клітинних структур [34].

Ферментативна антиоксидантна система рослин включає кілька груп ензимів, які функціонують у різних компартментах. До основних антиоксидантних ферментів відносять супероксиддисмутазу (СОД), каталазу (КАТ), аскорбатпероксидазу (АПХ), гваяколпероксидазу (ГВПХ) та глутатіонредуктазу (ГР). Кожен із цих ферментів діє на певний тип АФК у конкретному відділі клітини – хлоропластах, мітохондріях, пероксисомах або цитозолі [35].

Важливою особливістю антиоксидантних ферментів є те, що вони не діють ізольовано, а працюють у злагодженій системі, де продукт реакції одного ферменту є субстратом для іншого. Прикладом такої взаємодії є аскорбат-глутатіоновий цикл, у якому АПХ, ГР послідовно забезпечують знешкодження АФК за рахунок відновлених форм аскорбату та глутатіону. Завдяки такій організації система здатна працювати безперервно навіть за умов тривалого стресу [29].

Поряд із ферментативними компонентами важливу роль у захисті рослин від окислювального пошкодження відіграють неферментативні антиоксиданти – аскорбінова кислота, глутатіон, каротиноїди, токофероли та флавоноїди. Вони функціонують як у водній фазі клітини, так і у мембранах, де захищають ліпіди від окислення. Ці сполуки діють як безпосередні поглиначі АФК, а також як регулятори редокс-чутливих сигнальних шляхів [11].

Активність антиоксидантних ферментів у рослин не є сталою величиною – вона динамічно змінюється залежно від типу, інтенсивності та тривалості стресового впливу. Так, встановлено, що адаптація рослин до підвищеного рівня

АФК визначається низкою ключових чинників, серед яких – тривалість і напруженість стресу, енергетичний стан клітини, фаза розвитку рослини та її загальна антиоксидантна місткість. За помірного стресу активність захисних ферментів, як правило, зростає, тоді як при надмірному навантаженні захисна система перевантажується і виникає незворотне пошкодження клітин [45].

Регуляція активності антиоксидантних ферментів відбувається на рівні експресії генів за участі специфічних транскрипційних факторів. Встановлено, що транскрипційні фактори родини WRKY є ключовими молекулярними регуляторами стресової відповіді рослин – вони зв'язуються з W-боксами промоторних ділянок генів антиоксидантних ферментів і активують їх транскрипцію. Крім того, WRKY фактори взаємодіють з іншими регуляторними білками – MYB та NAC – формуючи складні регуляторні мережі, що дозволяють рослині точно і швидко налаштувати рівень антиоксидантного захисту залежно від характеру стресового сигналу [22].

Таким чином, антиоксидантна система рослин є надзвичайно складним і багаторівневим механізмом захисту, що об'єднує ферментативні та неферментативні компоненти. Показано, що оксидативний стрес розвивається тоді, коли продукція АФК забезпечує здатність антиоксидантної системи їх нейтралізувати, що призводить до порушення процесів фотосинтезу, дихання та засвоєння живильних речовин, а відтак – до зниження росту і продуктивності рослин. Розуміння механізмів роботи цієї системи є необхідною основою для розробки ефективних стратегій підвищення стресостійкості сільськогосподарських рослин [40].

### **1.3. Антиоксидантні ферменти рослин**

#### **1.3.1. Супероксиддисмутаза**

Супероксиддисмутаза (СОД; КФ 1.15.1.1) є металовмісним ферментом, що каталізує реакцію перетворення супероксидного радикала на пероксид водню та молекулярний кисень. Цей фермент є першою і найважливішою ланкою антиоксидантного захисту, оскільки саме супероксидний радикал є вихідним

продуктом одноелектронного відновлення кисню і попередником токсичніших АФК. Результати свідчать, що рівень стресостійкості рослин позитивно корелює з активністю СОД – чим вищою є активність ферменту, тим краще рослина справляється з окислювальним навантаженням [7].

У рослин виділяють три основні ізоформи СОД, що різняться за металом у активному центрі: Cu/Zn-СОД, Mn-СОД та Fe-СОД. Встановлено, що кожна ізоформа локалізована у певному клітинному компартменті – Cu/Zn-СОД міститься переважно в цитозолі, хлоропластах та пероксисомах, Mn-СОД – у мітохондріях, а Fe-СОД – переважно в хлоропластах. Така просторова організація дозволяє рослині знешкоджувати АФК безпосередньо в місцях їх утворення, не допускаючи їх поширення на інші клітинні структури [37].

Практичне значення СОД підтверджується дослідженнями на трансгенних рослинах. Так, виявлено, що надекспресія генів різних ізоформ Cu/Zn-СОД конферує стійкість до цілого ряду абіотичних стресів – посухи, засолення та низьких температур. Крім того, визначено, що підвищення активності СОД супроводжується одночасним зростанням активності АПХ, що свідчить про тісну координацію між різними ланками антиоксидантного захисту. Такі результати підкреслюють перспективність СОД як мішені для біотехнологічних методів підвищення стресостійкості сільськогосподарських культур [18].

### **1.3.2. Каталаза**

Каталаза (КАТ; КФ 1.11.1.6) є гемовмісним тетрамерним ферментом, що каталізує розкладання пероксиду водню до води та молекулярного кисню. Фермент присутній у всіх аеробних організмах і є одним із найпотужніших біологічних каталізаторів – одна молекула КАТ здатна розкласти мільйон молекул пероксиду водню за секунду без витрат відновних еквівалентів. Саме ця властивість робить каталазу незамінним компонентом антиоксидантного захисту рослинної клітини [32].

Каталаза є одним із ключових ферментів антиоксидантної системи рослин, що бере участь у регуляції рівня АФК та підтриманні клітинного гомеостазу.

Встановлено, що каталази присутні практично у всіх живих організмах і відіграють важливу роль у процесах росту, розвитку та адаптації до стресових умов. У рослин вони представлені цілими сімействами генів, які кодують різні ізоформи ферменту, що відрізняються за структурою та функціональними особливостями. Дослідження показують, що експресія генів каталази регулюється різними чинниками, зокрема світлом, рівнем кисню, фітогормонами та іншими чинниками, що свідчить про їх важливу роль у формуванні адаптаційної відповіді рослин.

У відповідь на дію абіотичних стресових чинників, таких як посуха, засолення або температурні коливання, активність каталази в рослин зазвичай суттєво коливається, що відображає її участь у захисних реакціях клітини. У більшості випадків спостерігається підвищення активності цього ферменту на початкових етапах стресу, що сприяє ефективному зниженню рівня перекису водню та обмеженню оксидативного пошкодження. Водночас, під час тривалого або надмірного впливу стресових чинників стає можливим зниження активності каталази, що призводить до накопичення  $H_2O_2$  і порушення клітинного гомеостазу. Таким чином, зміни активності каталази можуть слугувати важливим показником стійкості рослин до несприятливих умов середовища [46].

### 1.3.3. Пероксидаза

Пероксидаза (ПОД; КФ 1.11.1.7) характеризується високою активністю у захисті рослин від стресу. Встановлено, що цей фермент функціонує у тісній взаємодії з іншими антиоксидантними ферментами, такими як супероксиддисмутаза та каталаза, забезпечуючи ефективне знешкодження надлишкових вільних радикалів. Пероксидаза бере участь у детоксикації клітини, зокрема шляхом видалення перекису водню та інших сполук, а також сприяє утворенню метаболітів, необхідних для оптимального функціонування клітини. Крім того, рівень активності пероксидази розглядається як важливий показник антиоксидантної стійкості рослин до стресових чинників [43].

Пероксидази виконують не лише антиоксидантну функцію, але й беруть

участь у важливих фізіологічних процесах рослин, зокрема у формуванні клітинної стінки та синтезу лігніну. Встановлено, що ці ферменти здатні каталізувати окиснення різних органічних сполук за участю перекису водню, що призводить до зміцнення клітинних структур і підвищення механічної стійкості тканин. Крім того, пероксидази беруть участь у регуляції росту, розвитку та відповіді рослин на стресові чинники, виконуючи важливу роль у підтриманні балансу АФК у клітині [26].

### 1.3.4 Аскорбатпероксидаза

Аскорбатпероксидаза (АПХ; КФ 1.11.1.11) є ключовим ферментом аскорбат-глутатіонового циклу, що каталізує відновлення перексиду водню до води, використовуючи аскорбат як специфічний донор електронів. На відміну від каталази, АПХ має значно вищу спорідненість до  $\text{H}_2\text{O}_2$  і тому ефективно знешкоджує його навіть у низьких концентраціях. Саме це робить АПХ особливо важливою для захисту хлоропластів, де пероксид водню утворюється безперервно в процесі фотосинтетичних реакцій [22].

У вищих рослинах АПХ представлена кількома ізоформами, що різняться за субклітинною локалізацією: цитозольна, строматична хлоропластна, тилакоїдна, пероксисомальна та мітохондріальна. Дослідження показали, що розподіл цих ізоформ по компартментах є не випадковим, а відображає важливість контролю рівня  $\text{H}_2\text{O}_2$  в кожному з місць його утворення. Хлоропластні ізоформи АПХ відіграють особливу роль у фотозахисті та ретроградній сигналізації, яка передає інформацію щодо стресового стану хлоропластів до ядра клітини [25].

Дослідження показали, що надекспресія генів АПХ у трансгенних рослинах підвищує стійкість до цілого ряду абіотичних стресів – посухи, засолення та водного дефіциту. Зокрема, було встановлено, що надекспресія хлоропластної форми АПХ у тютюні забезпечувала вищу стійкість до засолення та водного дефіциту порівняно з контрольними рослинами, а рослини із підвищеною активністю АПХ демонстрували нижчі рівні  $\text{H}_2\text{O}_2$  та малонового діальдегіду. Такі результати підкреслюють центральну роль АПХ у формуванні антиоксидантного

захисту при абіотичних стресах і роблять цей фермент перспективною мішенню для генно-інженерного підвищення стресостійкості пшениці [33].

### 1.3.5 Глутатіонредуктаза (ГР)

Глутатіонредуктаза (ГР; КФ 1.8.1.7) є флавопротеїновим ферментом, що каталізує відновлення окисленого глутатіону (GSSG) до відновленої форми (GSH) з використанням НАДФН як донора електронів. Цей фермент є важливим в аскорбат-глутатіоновому циклі, оскільки підтримує високе співвідношення GSH/GSSG у клітині, необхідне для безперервного функціонування всього циклу. Було встановлено, що ГР бере участь у захисті рослин від широкого спектру абіотичних стресів – важких металів, засолення, посухи, УФ-випромінювання, та холоду, а активність цього ферменту зростає за більшості стресових умов [14].

У рослин ГР представлена двома основними класами ізоформ – цитозольною (GR1) та органельною (GR2), причому остання може транспортуватися одночасно до хлоропластів і мітохондрій завдяки двоспрямованому транзитному пептиду. Встановлено, що понад 70-80% загальної активності ГР у фотосинтетичних тканинах зосереджено в хлоропластах, що підкреслює особливу роль цього ферменту у захисті фотосинтетичного апарату. Цитозольна ізоформа, попри меншу частку, відіграє важливу роль у підтриманні редокс-гомеостазу в цитоплазмі і пероксисомах [16].

У пшениці звичайній було ідентифіковано сім генів ГР, які утворюють дві гомеологічні групи в алогексаплоїдному геномі. Дослідження показали, що за умов високотемпературного та сольового стресів експресія цих генів та активність ферменту змінювалися, що свідчить про їх важливу роль в адаптивній відповіді пшениці до абіотичних стресів. Крім того, досліджено, що підвищення активності ГР у пшениці спостерігається як захисний механізм проти окислювального стресу, спричиненого кадмієм, а також що ГР тісно скоординована з активністю КАТ у формуванні комплексної антиоксидантної відповіді [27].

## 1.4. Пшениця звичайна (*Triticum aestivum* L.)

Пшениця звичайна (*Triticum aestivum* L.) є однорічною трав'янистою рослиною, яка може досягати висоти до 1,5 м і формувати декілька пагонів. Вона належить до найважливіших продовольчих культур і використовується як основне джерело харчування для мільярдів людей у світі. За історичними даними, пшениця культивується вже близько 5000 років і нині вирощується в більшості країн світу. Завдяки своїй широкій адаптивності до різних кліматичних умов вона може зростати як у помірних, так і тепліших регіонах, що забезпечує її глобальне поширення та значення для сільського господарства [28].

*Triticum aestivum* L. також забезпечує понад 20% добової потреби людства у білках та калоріях і вирощується більш ніж на 220 млн гектарів у всьому світі. Попри своє стратегічне значення для продовольчої безпеки, виробництво пшениці дедалі більше страждає від глобального потепління, яке спричиняє похолодання екстремальних температурних явищ, дефіцит води, засолення ґрунтів та підвищену вразливість до хвороб [41].

Пшениця звичайна є алогексаплоїдним організмом з геномом AABBDD ( $2n = 6x = 42$  хромосоми), що виник внаслідок двох послідовних гібридизаційних подій між дикими злаковими видами. Гексаплоїдна природа пшениці забезпечує їй широку адаптаційну пластичність і підвищену витривалість до стресових чинників порівняно з її тетраплоїдними предками. Водночас складна геномна організація ускладнює молекулярні механізми регуляції стресових відповідей, оскільки багато генів представлені трьома гомеологічними копіями, що діють у різних субгеномах [13].



Рис. 1.1. Пшениця звичайна (*Triticum aestivum* L.) [28];

Пшениця є надзвичайно чутливою до широкого спектру абіотичних стресорів – посухи, засолення, підвищених і знижених температур, а також токсичної дії важких металів. Було встановлено, що ці стресові чинники порушують водний баланс, пригнічують фотосинтез, змінюють клітинну сигналізацію та спричиняють масове накопичення АФК, що активує антиоксидантну систему рослини. Саме тому пшениця звичайна є одним із найдосліджуваних об'єктів у вивченні взаємозв'язку між абіотичним стресом та активністю антиоксидантних ферментів [15].

За морфологічною будовою пшениця звичайна належить до родини тонконогових (*Poaceae*). Коренева система – мичкувата, добре розвинута, проникає в ґрунт на глибину до 1,5-2 м, однак основна маса коренів зосереджена в орному шарі. Стебло – порожниста соломина, пряма, що складається з 4-7 міжвузлів і досягає висоти від 60 до 125 см залежно від сорту. Листки лінійні, чергові, завдовжки 15-30 см і завширшки 1-2 см, складаються з листкової

пластинки, піхви та язичка. Суцвіття – складний колос, що містить 15-25 колосків, у кожному з яких формується від 1 до 6 зернівок. Плід – зернівка видовженої форми завдовжки 4-9 мм, масою 1000 зерен 35-50 г [5].

Зерно пшениці звичайної характеризується багатим та збалансованим хімічним складом. У середньому воно містить 12-14% білка, близько 63-70% вуглеводів, 1,5-2% жирів, а також харчові волокна, мінеральні речовини та вітаміни. Особливу цінність пшениці надає клейковина – нерозчинний пружно-еластичний гель, що визначає хлібопекарські властивості борошна. Зерно також містить вітаміни групи В, вітамін Е та важливі мінерали – залізо, магній, цинк і калій, які необхідні для нормального функціонування організму [33].

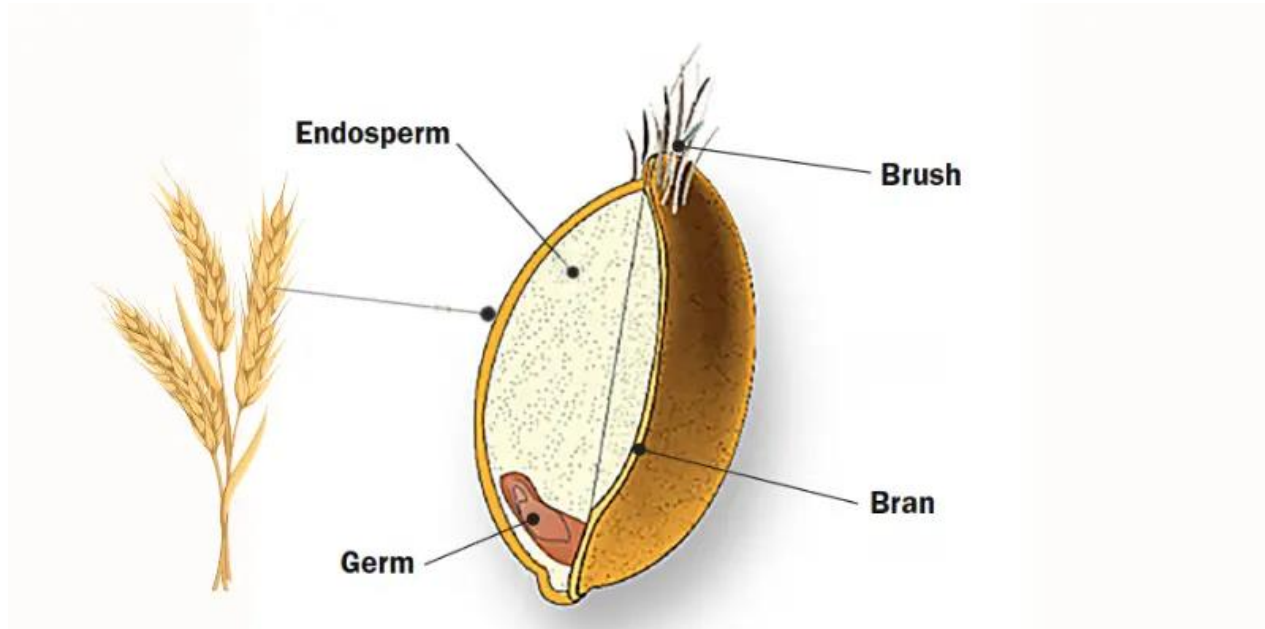


Рис 1.2. Будова зернівки пшениці звичайної (*Triticum aestivum* L.) [42]

За агробіологічними та господарськими ознаками пшеницю звичайну класифікують за кількома критеріями. Залежно від строків сівби розрізняють озиму та яру форми: озима висівається восени, потребує яровизації (впливу низьких температур протягом 30-60 діб) для переходу до генеративного розвитку та відрізняється вищою врожайністю; яра висівається навесні та проходить повний цикл розвитку за один вегетаційний сезон. За твердістю ендосперму виділяють м'яку (*T. aestivum*) та тверду (*T. durum*) пшеницю: м'яка є гексаплоїдною і використовується переважно для хлібопекарської промисловості завдяки

еластичній клейковині, тоді як тверда є тетраплоїдною і слугує сировиною для виробництва макаронних виробів. Близько 95 % світового виробництва пшениці припадає саме на м'яку звичайну пшеницю [21].

#### **1.4.1. Вплив посухи на антиоксидантні ферменти пшениці**

Посуха є одним із найпоширеніших і найруйнівніших абіотичних стресів для пшениці, що призводить до масового утворення АФК у клітинах та активації антиоксидантного захисту. Дослідження показали, що у відповідь на більшість абіотичних стресів – включно з посухою, холодом, спекою, засоленням та УФ-випромінюванням – більшість антиоксидантних ферментів пшениці підвищували свою активність. При цьому, відповідь мала виражену генотипову специфічність – стійкі генотипи, як правило, підтримували вищу антиоксидантну місткість і зазнавали меншого окислювального пошкодження порівняно з чутливими [9].

Дослідження відповіді антиоксидантних ферментів пшениці на посуховий стрес показало, що активність СОД, КАТ та АПХ зростала разом із посиленням та тривалістю водного дефіциту. При цьому стійкий сорт демонстрував підвищену активність СОД, КАТ та АПХ і нижче накопичення малонового діальдегіду – маркера окислювального пошкодження мембран, порівняно з чутливим. Після відновлення поливу водний потенціал листків, мембранна стабільність та фотосинтетична активність повністю відновились у стійкого сорту, тоді як у чутливого відновлення було неповним [2].

Важливим аспектом антиоксидантної відповіді пшениці на посуху є явище акліматизації – загартовування рослин при повторних стресах. Дослідження показали, що проростки пшениці стійкого сорту, які попередньо піддавались помірному водному дефіциту з наступним відновленням поливу, краще переносили подальший важкий посуховий стрес. Це відбувалось завдяки системному підвищенню активності СОД, АПХ, КАТ та компонентів аскорбат-глутатіонового циклу як у клітинах кореня, так і в мітохондріях, що обмежувало накопичення пероксиду водню та пошкодження мембран [6].

Синтетичні лінії демонстрували кращі показники врожайності та нижчий рівень накопичення малонового діальдегіду порівняно зі звичайними сортами пшениці, що свідчить про потужнішу антиоксидантну систему захисту. Виявлену широку мінливість антиоксидантних ознак у генофонді синтетичної пшениці пропонується використовувати у селекційних програмах для підвищення посухостійкості культури [31].

#### **1.4.2. Вплив засолення на антиоксидантні ферменти пшениці**

Засолення ґрунту є серйозною загрозою для виробництва пшениці і спричиняє одночасно осмотичний стрес та іонну токсичність, що призводить до перевиробництва АФК у клітинах. Дослідження стійкості 40 місцевих сортів пшениці показало, що засолення (150 мМ NaCl) значно підвищувало активність КАТ, ПОД, АПХ та СОД у всіх досліджених сортів. При цьому, максимальне зростання активності КАТ, АПХ та СОД спостерігалось у солестійких сортів S-24 і LU-26S, тоді як у чутливих сортів накопичувався вищий рівень малонового діальдегіду – маркера окислювального пошкодження [19].

Дослідження реакції 15 мутантних ліній пшениці, створених гамма-опроміненням, на засолення впродовж трьох вегетаційних сезонів показало, що активність усіх антиоксидантних ферментів зростала у відповідь на сольовий стрес у всіх досліджених генотипів. Було встановлено, що найбільше зростання активності СОД спостерігалось у мутантів M05, M09 та M16, тоді як активність ПОД виявила найбільший приріст серед усіх ферментів і зросла в окремих генотипів у 4,5 рази. [20].

Важливим аспектом антиоксидантної відповіді пшениці на засолення є різноспрямована реакція окремих ферментів. Дослідження впливу трьох рівнів засолення на два сорти пшениці показало, що активність КАТ та ПОД значно зростала в листках і коренях обох сортів пропорційно до концентрації солі – у найстресовіших умовах КАТ зростала до 97% порівняно з контролем. Водночас активність СОД, навпаки, різко знижувалась при в обох сортах, що вказує на диференційовану роль ферментів у формуванні сольової стійкості [39].

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 2.1 Об'єкт дослідження та його характеристика

Об'єктом дослідження слугували рослини пшениці звичайної (*Triticum aestivum* L.) – однорічної злакової культури родини тонконогових (*Poaceae*). Для досліджень використовували насіння сортів пшениці з контрастними рівнями посухостійкості. Перед пророщуванням насіння стерилізували – спочатку витримували у 70% етанолі впродовж 5 хвилин, а потім у 5% розчині гіпохлориту натрію впродовж 5 хвилин. Після стерилізації насіння пророщували у чашках Петрі на зволоженому фільтрувальному папері впродовж 10 діб при температурі 4°C у темряві. Отримані однорідні проростки пересаджували у пластикові горщики об'ємом 1,5 л, заповнені субстратом із суміші торфу, ґрунту та піску у співвідношенні 3:3:1. Рослини вирощували у контрольованих умовах кліматичної камери при температурі 18-20 °C та відносній вологості повітря 60-70%. Для кожного варіанту досліду використовували по три горщики – контрольний та стресовий.

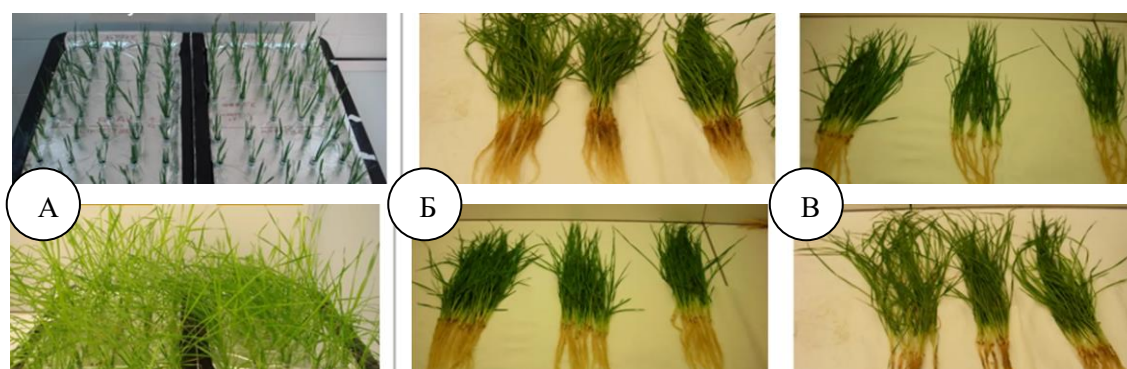
Для дослідження антиоксидантних реакцій на високотемпературний стрес використовували три сорти пшениці звичайної (*Triticum aestivum* L.) турецької селекції з контрастними рівнями посухостійкості, офіційно зареєстровані Міністерством сільського господарства та лісового господарства Туреччини.

Сорт *Gerek 79* є озимим хлібним сортом пшениці, виведеним у Науково-дослідному інституті перехідної зони (Ескішехір, Туреччина). Сорт широко адаптований до богарних умов вирощування і демонструє стабільну продуктивність за умов водного дефіциту. Сорт характеризується розвиненою кореневою системою та стабільною фотосинтетичною активністю за помірного водного дефіциту, що зумовлює його використання як стійкий до високотемпературного стресу генотип у багатосередовищних дослідженнях.

Сорт *Müfitbey* також є озимим терmostійким сортом турецької селекції, що відзначається стабільною фотосинтетичною активністю та ефективним охолодженням листкового апарату за стресових умов. Сорт класифікується як

чутливий до високотемпературного стресу з огляду на здатність підтримувати високий відносний вміст води та активність антиоксидантних ферментів навіть за умов тривалого водного дефіциту.

Сорт *Atay 85* є озимим сортом пшениці, який традиційно використовується як чутливий контроль у багатосередовищних дослідженнях посухостійкості. За умов високотемпературного стресу *Atay 85* демонстрував найбільш виражене зниження відносного вмісту води у листках, що свідчить про значні втрати води. Низька антиоксидантна ємність цього сорту за тривалого водного дефіциту робить його ідеальним об'єктом для порівняльних досліджень механізмів стресостійкості пшениці [47].



**Рис. 2.1.** Проростки пшениці звичайної (*Triticum aestivum* L.) за умов посухового стресу: А – контрольні рослини; Б – через 4 години після припинення поливу; В – через 8 годин після припинення поливу.

Високотемпературний стрес моделювали шляхом припинення поливу через три тижні після пересаджування проростків. Контрольні рослини поливали щодня у звичайному режимі. Для моніторингу водного режиму ґрунту щоденно вимірювали вологість ґрунту вологоміром ґрунту HS-30. Рослини збирали на 10-й день стресу, тканини заморожували та зберігали у морозильній камері до проведення аналізів.

## 2.2. Визначення відносного вмісту води

Відносний вміст води (BBV) у листках пшениці визначали методом Barrs and Weatherley (1962) у модифікації Григорюка як показник водного статусу рослин в умовах високотемпературного стресу. Для аналізу відбирали третій наймолодший листок кожної рослини на 10-й день дії стресу. Свіжі листки масою 0,5 г нарізали фрагментами завдовжки 1 см та зважували для визначення свіжої маси (СМ). Потім зразки занурювали у дистильовану воду і витримували впродовж 8 годин при температурі 4°C для насичення тканин водою, після чого визначали тургорну масу (ТМ). Насичені зразки висушували у сушильній шафі при температурі 80 °C впродовж 24 годин та зважували для визначення сухої маси (СуМ). Відносний вміст води розраховували за формулою:

$$BBV (\%) = (CM - CyM) / (TM - CyM) \times 100\%$$

де СМ – свіжа маса листка, г;

СуМ – суха маса листка, г;

ТМ – тургорна маса листка (після насичення водою), г.

Цей показник відображає ступінь водного дефіциту в тканинах рослини і є надійним критерієм для розмежування посухостійких та посухочутливих генотипів. Вищі значення BBV за умов водного дефіциту свідчать про кращу здатність рослини утримувати воду і підтримувати стабільний тургор клітин.

### 2.3. Визначення рівня ліпідної пероксидації

Інтенсивність окислювального пошкодження клітинних мембран оцінювали за вмістом малонового діальдегіду (МДА) – кінцевого продукту пероксидації ліпідів, що є загальновизнаним маркером оксидативного стресу. Визначення проводили за модифікованим методом Madhava Rao and Sresty (2000) на основі реакції МДА з тіобарбітуровою кислотою з утворенням забарвленого комплексу – тіобарбітурат-реактивних речовин (ТБКРР).

Наважку свіжих тканин масою 0,5 г гомогенізували у 5 мл 0,1% трихлороцтової кислоти (ТХО). Гомогенат центрифугували при 600 об/хв

впродовж 15 хвилин. До 1 мл супернатанта додавали 4 мл реактиву, що містив 0,5% тіобарбітурову кислоту у 20% ТХО. Суміш інкубували при температурі 95 °С впродовж 30 хвилин, після чого охолоджували на льоді та повторно центрифугували при 10 000 об/хв впродовж 10 хвилин. Оптичну густину супернатанта вимірювали спектрофотометрично при довжинах хвиль 532 нм та 600 нм. Концентрацію МДА розраховували з використанням коефіцієнта молярної екстинкції  $155 \text{ Мм}^{-1} \times \text{см}^{-1}$  за формулою:

$$C(\text{МДА}) = \frac{A_{532} - A_{600}}{155} \times \frac{10^3 \text{ мкмоль}}{\text{г}} \text{ СМ}$$

де  $A_{532}$  – оптична густина при довжині хвилі 532 нм;

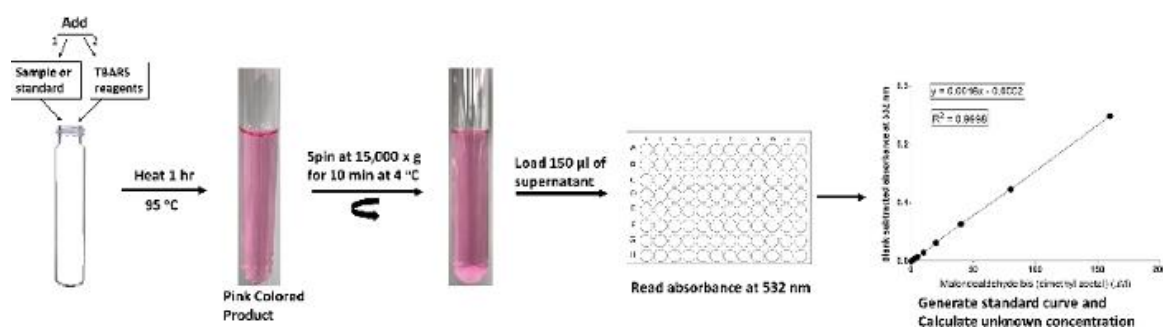
$A_{600}$  – оптична густина при довжині хвилі 600 нм;

155 – коефіцієнт молярної екстинкції МДА,  $\text{Мм}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ ;

$10^3$ - коефіцієнт перерахунку одиниць;

СМ – свіжа маса зразка, г.

Вищий рівень МДА свідчить про інтенсивніше окислення ліпідів мембран і відповідно – про вищий ступінь окисдативного пошкодження клітин за умов стресу.



**Рис.2.2.** Результат реакції тіобарбітурової кислоти з малоновим діальдегідом (TBARS-метод): рожеве забарвлення свідчить про наявність продуктів ліпідної пероксидації [3].

## 2.4. Отримання ферментних екстрактів та визначення вмісту білка

Для визначення активності антиоксидантних ферментів готували фрагменти з листкових та кореневих тканин рослин. Усі процедури екстракції проводили при температурі 4 °C для запобігання денатурації ферментів. Наважку свіжих тканин масою 0,5 г розтирали у рідкому азоті до однорідного порошку, після чого гомогенізували 1,5 мл екстракційного буфера, що містив 50 мМ Tris-HCl (pH 7,8), 0,1 мМ ЕДТА, 0,2% (мас/об) Тритон X-100, 1 мМ фенілметилсульфонілфторид (ФМСФ) та 2% (мас/об) полівінілпіролідон (ПВП). Для екстракції аскорбатпероксидази до гомогенізаційного буфера додатково вносили 5 мМ аскорбату з метою запобігання інактивації ферменту.

Гомогенат центрифугували при 14 000 об/хв впродовж 30 хвилин. Отриманий супернатант використовували для визначення вмісту білка та активності ферментів. Вміст розчинного білка визначали за методом Бредфорда (Bradford, 1976) з використанням сироваткового альбуміну як стандарту.



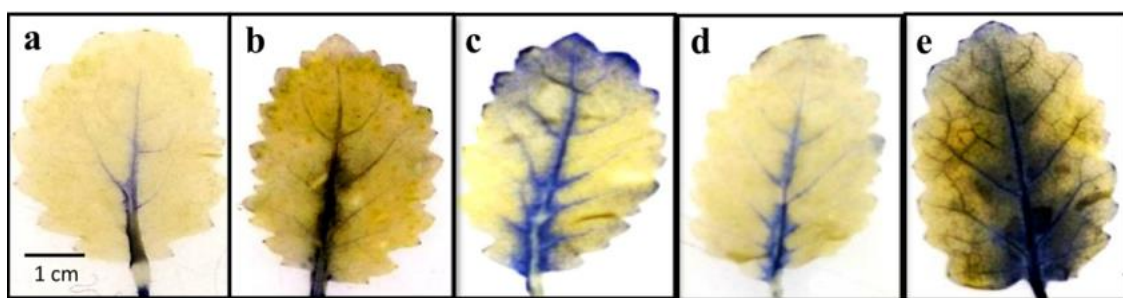
**Рис 2.3.** Спектрофотометр Shimadzu UV, що використовувався для вимірювання оптичної густини у ході визначення активності антиоксидантних ферментів [38].

## **2.5. Визначення активності антиоксидантних ферментів**

### 2.5.1. Супероксиддисмутаза (СОД; КФ 1.15.1.1)

Активність СОД визначали за комбінованим методом Beauchamp and Fridovich (1971), що ґрунтується на здатності ферменту інгібувати фотохімічне відновлення нітросинього тетразолію (НСТ) супероксидними аніон-радикалами. Реакційна суміш об'ємом 3 мл містила 50 мМ фосфатного буферу (рН 7,8), 13 мМ метіоніну, 75 мкМ НСТ, 0,1 мМ ЕДТА, 2 мкМ рибофлавіну та 0,1 мл ферментного екстракту. Реакцію ініціювали освітленням у суміші лампою потужністю 15 Вт впродовж 15 хвилин. Контрольні проби витримували у темряві. Оптичну густину вимірювали при довжині хвилі 560 нм.

За одиницю активності СОД приймали кількість ферменту, необхідну для інгібування фотовідновлення НСТ на 50% порівняно з контролем (без ферменту). Активність виражали в одиницях на міліграм білка (Од/мг білка).



**Рис 2.4.** НСТ-фарбування листків *Brassica juncea* для візуалізації супероксид-аніон радикалів: а – контроль; б-д – різні варіанти стресових обробок; темно-синє забарвлення відповідає зонам накопичення формагану [23].

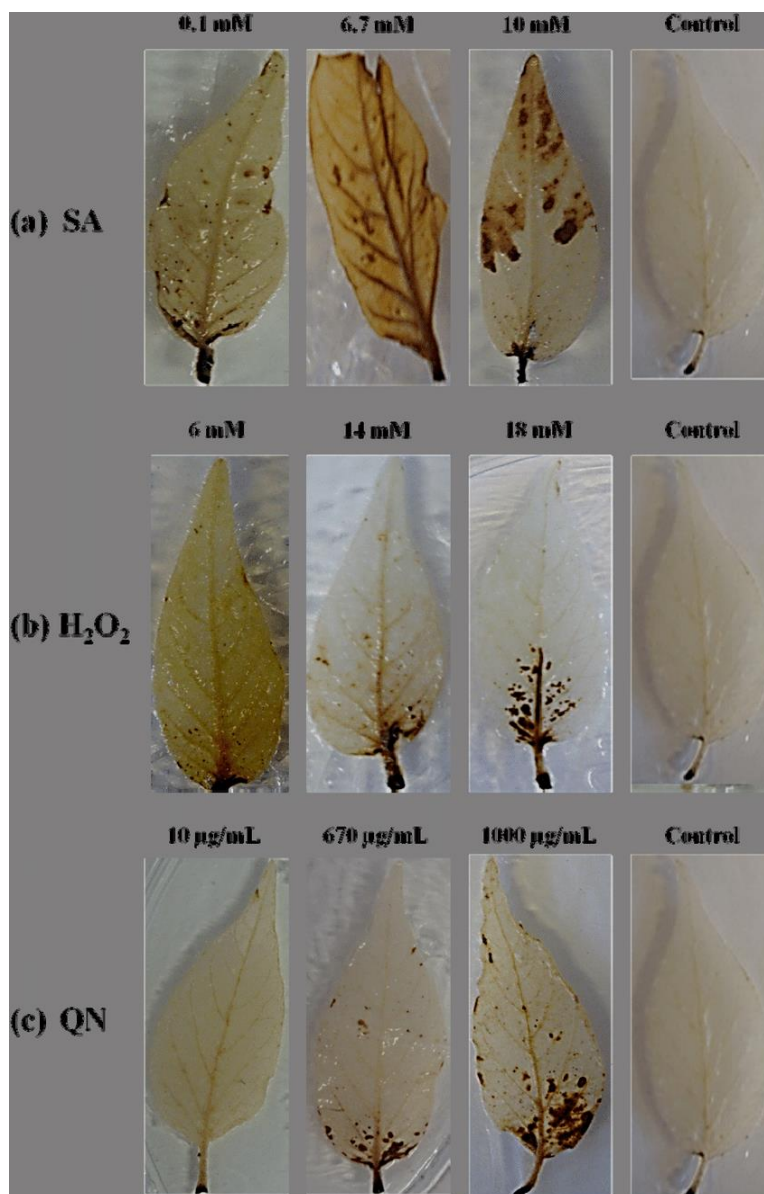
### 2.5.2. Каталаза (КАТ; КФ 1.11.1.6)

Активність КАТ визначали за методом Bergmeyer (1970), що ґрунтується на здатності ферменту розкладати пероксид водню. Принцип методу полягає у реєстрації зниження оптичної густини розчину  $\text{H}_2\text{O}_2$  при довжині хвилі 240 нм, де пероксид водню поглинає світло.

Реакційна суміш об'ємом 3 мл містила 50 мМ фосфатного буферу (рН 7,0), 15 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  та 0,1 мл ферментного екстракту. Реакцію ініціювали додаванням

екстракту та реєстрували зниження оптичної густини при 240 нм впродовж 3 хвилин при температурі 25 °С.

За одиницю активності КАТ приймали кількість ферменту, що забезпечує розкладання 1 мкмоль  $\text{H}_2\text{O}_2$  за хвилину. Активність виражали в одиницях на міліграм білка (Од/мг білка).



**Рис 2.5.** Візуалізація накопичення пероксиду водню ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) методом DAB-фарбування у листках рослин за різних концентрацій: а – саліцилова кислота; б –  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; в – хінон; Control – контроль [12].

### 2.5.3 Пероксидаза (ПОД; КФ 1.11.1.7)

Активність ПОД визначали за методом Herzog and Fahimi (1973), що базується на здатності ферменту каталізувати окиснення гваяколу в присутності

пероксиду водню з утворенням забарвленого продукту – тетрагваяколу. Реакцію реєстрували за збільшенням оптичної густини при довжині хвилі 465 нм.

Реакційна суміш об'ємом 3 мл містила 50 мМ фосфатного буферу (pH 7,0), 20 мМ гваяколу, 40 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  та 0,1 мл ферментного екстракту. Реакцію ініціювали додаванням ферментного екстракту і реєстрували зростання оптичної густини при 465 нм впродовж 3 хвилин при температурі 25 °С.

За одиницю активності ПОД приймали кількість ферменту, що забезпечує розкладання 1 мкмоль  $\text{H}_2\text{O}_2$  за хвилину. Активність виражали в одиницях на міліграм білка (Од/мг білка).

#### **2.5.4. Аскорбатпероксидаза (АПХ; КФ 1.11.1.11)**

Активність АПХ визначали за методом Nakano and Asada (1981), що ґрунтується на здатності ферменту окиснювати аскорбат у присутності пероксиду водню. Принцип методу полягає у реєстрації зниження оптичної густини розчину аскорбату при довжині хвилі 290 нм, де аскорбінова кислота поглинає світло. Для запобігання інактивації АПХ до гомогенізаційного буферу при отриманні екстракту додавали 5 мМ аскорбату.

Реакційна суміш об'ємом 3 мл містила 50 мМ фосфатного буферу (pH 7,0), 0,5 мМ аскорбату, 0,1 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  та 0,1 мл ферментного екстракту. Реакцію ініціювали додаванням  $\text{H}_2\text{O}_2$  та реєстрували зниження оптичної густини при 290 нм впродовж 3 хвилин при температурі 25 °С. Для розрахунку використовували коефіцієнт молярної екстинкції аскорбату  $2,8 \text{ Мм}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ .

За одиницю активності АПХ приймали кількість ферменту, що забезпечує окиснення 1 мкмоль аскорбату за хвилину. Активність виражали в одиницях на міліграм білка (Од/мг білка).

### **2.6. Статистична обробка даних**

Статистичну обробку результатів проводили з використанням однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) або t-критерію Стьюдента залежно від характеру порівнянь. У випадках виявлення статистично значущих

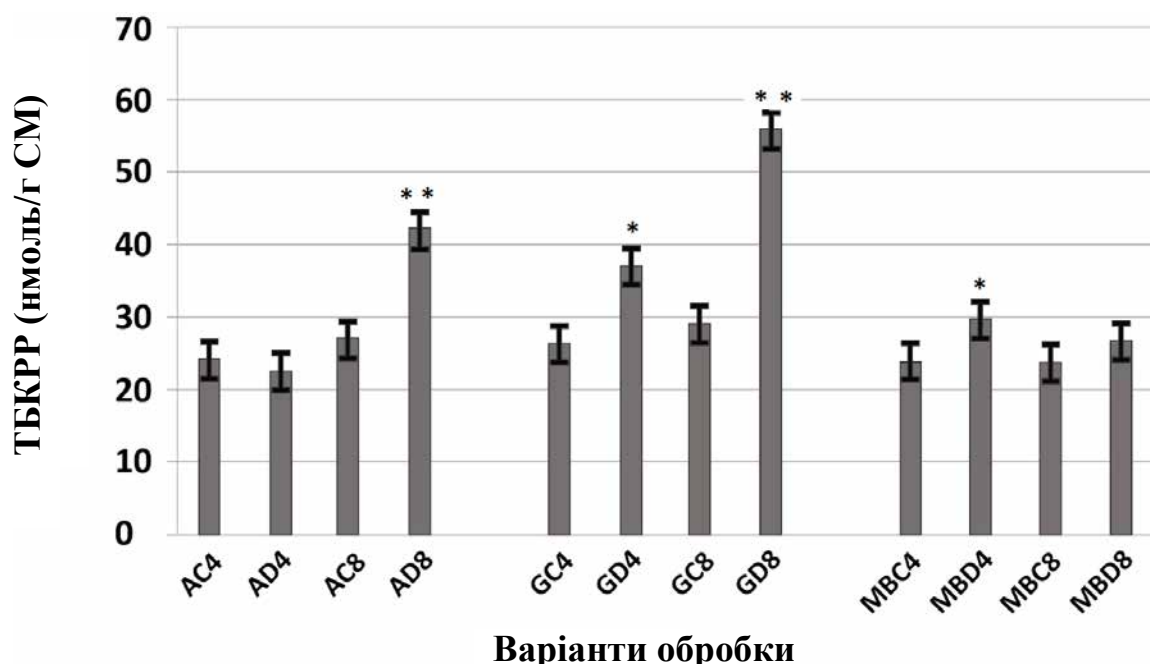
відмінностей між групами застосовували критерій Тьюкі (Tukey's HSD) для попарних порівнянь. Рівень статистичної значущості встановлювали при  $p < 0,05$  (різниця вважалась значущою) та  $p < 0,01$  (різниця вважалась високо значущою); результати при  $p \geq 0,05$  вважали статистично незначущими.

Усі дані представлено як середнє арифметичне трьох біологічних повторностей  $\pm$  стандартне відхилення ( $M \pm SD$ ). Статистичний аналіз виконували у програмному забезпеченні GraphPad Prism (v. 10.5.0). Графіки активності ферментів будували у Microsoft Excel [10].

### РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 3.1. Визначення вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів за умов посухи

Для оцінки інтенсивності окислювального пошкодження клітинних мембран визначали вміст тіобарбітурат-реактивних речовин (ТБКРР) у листках трьох сортів пшениці звичайної за умов високотемпературного стресу різної тривалості.



**Рис. 3.1.** Вміст тіобарбітурат-реактивних речовин (ТБКРР) у листках рослин пшениці звичайної трьох сортів (*Atay 85*, *Gerek 79*, *Müfitbey*) за умов високотемпературного стресу різної тривалості: С – контроль, D – стрес; 4 та 8 – тривалість стресу в годинах; \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$

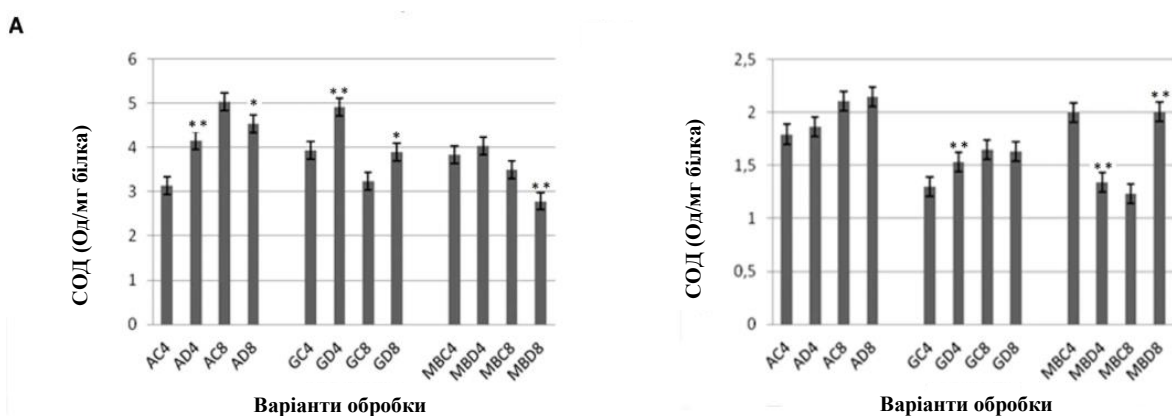
Дані, наведені на рис. 3.1, показують, що високотемпературний стрес спричиняв зростання вмісту ТБКРР у всіх досліджуваних генотипів, проте характер та інтенсивність цих змін суттєво відрізнялись між сортами. Найвищий рівень накопичення продуктів пероксидації ліпідів зафіксовано у сорту *Gerek 79* через 8 годин стресу (GD8) – близько 55 нмоль/г СМ, що було достовірно вищим порівняно з контролем (GC8). Сорт *Atay 85* також демонстрував значне зростання

вмісту ТБКРР через 8 годин посухи (AD8) – до 42 нмоль/г СМ, що підтверджується позначкою подвійної значущості (\*\*). Натомість сорт *Müfitbey* відзначався відносно стабільними та нижчими показниками впродовж усього досліджу, що свідчить про його вищу стійкість до окислювального пошкодження мембран.

Таким чином, отримані результати вказують на генотипову специфічність антиоксидантного захисту пшениці за високотемпературного стресу, посухостійкі генотипи здатні ефективніше обмежувати пероксидацію ліпідів навіть за тривалої дії водного дефіциту.

### 3.2. Визначення активності супероксиддисмутази

Активність СОД є першою ланкою ферментативного захисту рослин від окислювального стресу, оскільки саме цей фермент каталізує перетворення супероксидних радикалів на менш токсичний пероксид водню.



**Рис. 3.2.** Активність СОД у коренях (ліворуч) та листках (праворуч) рослин пшениці звичайної трьох сортів за умов високотемпературного стресу: С – контроль, D – стрес; 4 та 8 – тривалість стресу в годинах; \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$

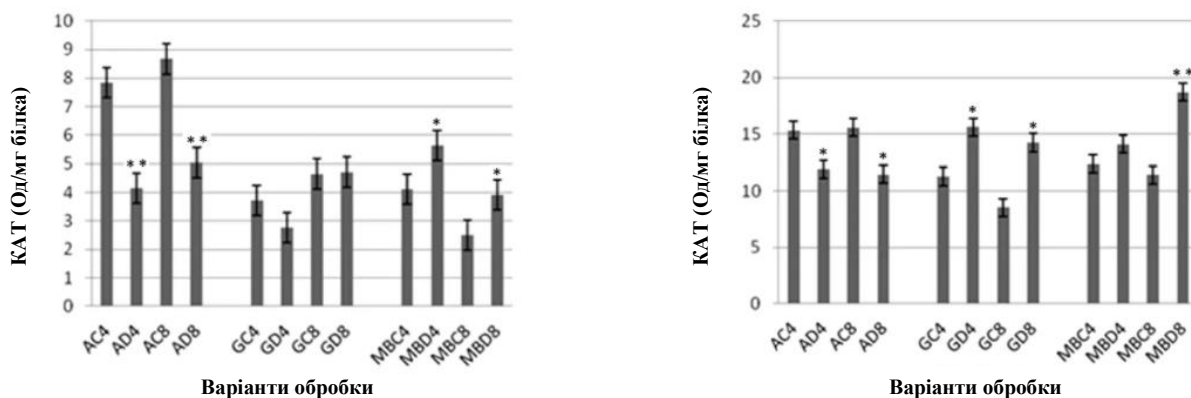
Було встановлено (рис. 3.2), що активність СОД у коренях зазнавала виражених генотипово-специфічних змін під впливом високотемпературного стресу. У сорту *Atay 85* спостерігалось достовірне зростання активності

ферменту через 4 години стресу (AD4), тоді як через 8 годин активність знижувалась нижче рівня контролю (AD8). Сорт *Gerek 79* демонстрував підвищення активності СОД на початковому етапі стресу з подальшим зниженням за тривалої дії водного дефіциту. Сорт *Müfitbey* відзначався відносно стабільними показниками активності СОД у коренях впродовж усього досліджу. У листках активність СОД у листках загалом була нижчою, ніж у коренях, проте у високотемпературночутливого сорту *Atay 85* спостерігалось достовірне зниження активності ферменту за тривалого стресу (AD8), що може свідчити про виснаження антиоксидантного захисту.

### 3.3. Визначення активності каталази

Каталаза є головним знешкоджувачем пероксиду водню, що утворюється внаслідок дії СОД, запобігаючи накопиченню токсичних концентрацій  $H_2O_2$  у клітинах рослин.

В



**Рис. 3.3.** Активність КАТ у коренях (ліворуч) та листках (праворуч) рослин пшениці звичайної трьох сортів за умов високотемпературного стресу: С – контроль, D – стрес; 4 та 8 – тривалість стресу в годинах; \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$

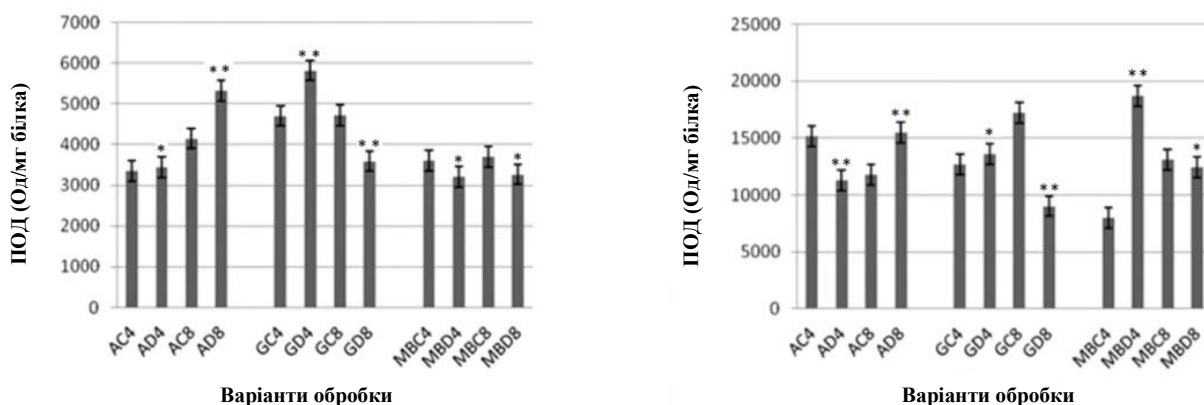
На діаграмі, наведеній на рис. 3.3 показано, що активність КАТ у коренях характеризувалась чіткою генотиповою специфічністю. Так, у сорту *Atay 85* активність ферменту була найвищою серед усіх генотипів у контрольних умовах,

однак за тривалої дії посухи (AD8) спостерігалось її достовірне зниження. Сорт *Gerek 79* демонстрував поступове зменшення активності КАТ у коренях зі збільшенням тривалості стресу. Натомість у сорту *Müfitbey* активність КАТ у коренях залишалась відносно стабільною і навіть зростала через 8 годин стресу, що свідчить про ефективне підтримання пероксидного балансу. У листках активність КАТ загалом була вищою, ніж у коренях – особливо у *Müfitbey* за тривалого стресу (MBD8), де зафіксовано достовірне зростання активності ферменту, що може вказувати на активацію антиоксидантного захисту в надземних органах термостійкого генотипу.

### 3.4. Визначення активності пероксидази

Пероксидаза бере участь у знешкодженні пероксиду водню шляхом окиснення різноманітних органічних субстратів, відіграючи важливу роль у захисті клітинних структур від окислювального пошкодження за умов стресу.

с



**Рис. 3.4.** Активність ПОД у коренях (ліворуч) та листках (праворуч) рослин пшениці звичайної трьох сортів за умов високотемпературного стресу: С – контроль, D – стрес; 4 та 8 – тривалість стресу в годинах; \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$

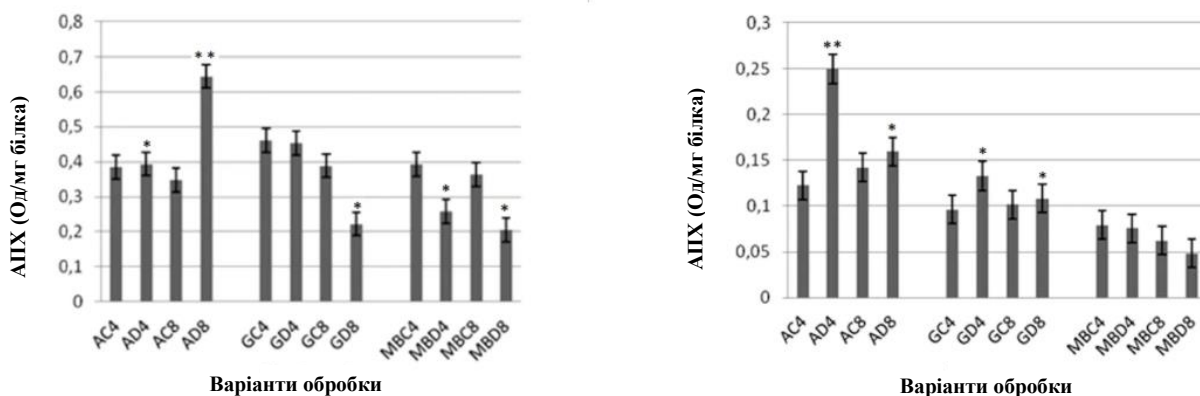
Так, було встановлено (рис. 3.4), що активність ПОД у коренях усіх трьох генотипів суттєво зростала під впливом високотемпературного стресу. Найвищі показники активності ферменту зафіксовано у сорту *Gerek 79* через 4 години стресу (GD4) – близько 5800 Од/мг білка, що було достовірно вищим порівняно

з контролем. У сорту *Atay 85* спостерігалось значне підвищення активності ПОД через 8 годин стресу (AD8). Натомість сорт *Müfitbey* демонстрував помірніше зростання активності ферменту у коренях. У листках активність ПОД була значно вищою порівняно з коренями, особливо у сорту *Müfitbey* через 4 години стресу (MBD4), де зафіксовано найвищі показники серед усіх варіантів досліджу (близько 19000 Од/мг білка). Отримані результати свідчать про активне залучення пероксидазної системи захисту у відповідь на посуховий стрес у всіх досліджуваних генотипів.

### 3.5. Визначення активності аскорбатпероксидази

Аскорбатпероксидаза є ключовим ферментом аскорбат-глутатіонового циклу і відрізняється значно вищою спорідненістю до перексиду водню порівняно з каталазою, що робить її особливо важливою для захисту хлоропластів та інших клітинних компартментів від окислювального пошкодження.

D



**Рис. 3.5.** Активність АПХ у коренях (ліворуч) та листках (праворуч) рослин пшениці звичайної трьох сортів за умов високотемпературного стресу: С – контроль, D – стрес; 4 та 8 – тривалість стресу в годинах; \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$

Оцінюючи дані, наведені на рис. 3.5, було встановлено, що активність АПХ

у коренях зазнавала виражених змін під впливом посухового стресу. Найсуттєвіше зростання активності ферменту зафіксовано у сорту *Atay 85* через 8 годин стресу (AD8) – до 0,65 Од/мг білка, що було достовірно вищим порівняно з контролем. Сорт *Gerek 79* демонстрував помірне підвищення активності АПХ у коренях на початковому етапі стресу з подальшим зниженням за тривалого водного дефіциту. У сорту *Müfitbey* активність АПХ у коренях була нижчою порівняно з іншими генотипами і достовірно знижувалась через 8 годин стресу. У листках найвищу активність АПХ зафіксовано у посухочутливого сорту *Atay 85* через 4 години стресу (AD4) – близько 0,25 Од/мг білка. Загалом отримані результати свідчать про те, що посухостійкі генотипи підтримують збалансовану активність АПХ впродовж усього стресового періоду, тоді як у чутливих сортів спостерігається нестабільна відповідь ферменту.

## ВИСНОВКИ

1. За умов високотемпературного стресу у листках трьох досліджуваних сортів пшениці звичайної (*T. aestivum*) спостерігалось достовірне зростання вмісту тіобарбітурат-реактивних речовин (ТБКРР), що свідчить про розвиток окислювального пошкодження клітинних мембран. Найвищий рівень ліпідної пероксидації зафіксовано у сорту *Gerek 79* через 8 годин стресу – близько 55 нмоль/г СМ.

2. Встановлено, що посухостійкий сорт *Müfitbey* демонстрував найзбалансованішу відповідь антиоксидантної системи – стабільну активність СОД у поєднанні з достовірним зростанням активності КАТ та ПОД у листках, що забезпечувало ефективне обмеження пероксидації ліпідів мембран за тривалої дії водного дефіциту.

3. Натомість посухочутливий сорт *Atay 85* характеризувався нестабільною антиоксидантною відповіддю, а саме зниженням активності СОД та АПХ у листках через 8 годин стресу на фоні значного зростання ТБКРР, що свідчить про виснаження захисних механізмів за тривалого водного дефіциту.

4. Виявлено генотипову специфічність у відповіді антиоксидантних ферментів на посуховий стрес. Активність ПОД у коренях сорту *Gerek 79* через 4 години стресу досягала 5800 Од/мг білка, тоді як у *Müfitbey* найвищу активність ПОД зафіксовано у листках – близько 19000 Од/мг білка через 4 години стресу.

5. Здатність підтримувати скоординовану та стабільну активність антиоксидантних ферментів – СОД, КАТ, ПОД та АПХ – за умов тривалого посухового стресу є ключовою ознакою посухостійких генотипів пшениці звичайної.

Отже, показано, що ферментативна система відіграє вирішальну роль у формуванні стійкості рослин пшениці до дії абіотичних стресорів. Генотипова специфічність антиоксидантних реакцій може слугувати біохімічним маркером при доборі посухостійких сортів у селекційних програмах.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Чинники, які впливають на якість зерна пшениці. Головне управління Держпродспоживслужби в Чернігівській області. <https://dpssc.gov.ua/fitosanitariia-kontrol-u-sferi-nasinnnytstva-ta-rozsadnytstva/aktualna-informatsiia/2661/chynnyky-iaki-vplyvaiut-na-iakist-zerna-pshenytsi.html> (дата звернення: 24.04.2026)
2. Abid, M., Ali, S., Qi, L.K. *et al.* Physiological and biochemical changes during drought and recovery periods at tillering and jointing stages in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Sci Rep* 8, 4615 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21441-7>
3. Aguilar Diaz De Leon, J., Borges, C. R. Evaluation of Oxidative Stress in Biological Samples Using the Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay. *J. Vis. Exp.* (159), e61122, doi:10.3791/61122 (2020).
4. Akter S., Khan M.S., Smith E.N., Flashman E. Measuring ROS and redox markers in plant cells. *RSC Chemical Biology*. 2021. Vol. 2, № 5. P. 1384–1401. DOI: 10.1039/D1CB00071C
5. Ammar M.K., Hanafi R.S., Choucry M.A. *et al.* Structural, functional, nutritional composition and analytical profiling of *Triticum aestivum* L. *Applied Biological Chemistry*. 2023. Vol. 66. Article 48. DOI: 10.1186/s13765-023-00804-3
6. Amoah, J.N., Seo, Y.W. Effect of progressive drought stress on physio-biochemical responses and gene expression patterns in wheat. *3 Biotech* 11, 440 (2021). <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02991-6>
7. Batool, R., Umer, M.J., Hussain, B., Anees, M., Wang, Z. (2022). Molecular Mechanisms of Superoxide Dismutase (SODs)-Mediated Defense in Controlling Oxidative Stress in Plants. In: Aftab, T., Hakeem, K.R. (eds) *Antioxidant Defense in Plants*. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-16-7981-0\\_8](https://doi.org/10.1007/978-981-16-7981-0_8)
8. Cannea, F.B.; Padiglia, A. Antioxidant Defense Systems in Plants: Mechanisms, Regulation, and Biotechnological Strategies for Enhanced Oxidative Stress Tolerance. *Life* 2025, 15, 1293. <https://doi.org/10.3390/life15081293>

9. Caverzan A, Casassola A, Brammer SP. Antioxidant responses of wheat plants under stress. *Genet Mol Biol*. 2016 Mar;39(1):1-6. doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2015-0109. PMID: 27007891; PMCID: PMC4807390.
10. Cevher-Keskin B, Yıldızhan Y, Sekmen AH, Fayetorbay R, Sezerman OU, Özer B, Onarıcı S, Türkan İ and Tör M (2025) Deciphering drought-response in wheat (*Triticum aestivum*): physiological, biochemical, and transcriptomic insights into tolerant and sensitive cultivars under dehydration shock. *Front. Plant Sci*. 16:1649378. doi: 10.3389/fpls.2025.1649378
11. Chaki, M.; Begara-Morales, J.C.; Barroso, J.B. Oxidative Stress in Plants. *Antioxidants* 2020, 9, 481. <https://doi.org/10.3390/antiox9060481>
12. Daudi A., O'Brien J.A. Detection of Hydrogen Peroxide by DAB Staining in *Arabidopsis* Leaves. *Bio-protocol*. 2012. Vol. 2, № 18. Article e263. URL: <https://bio-protocol.org/en/bpdetail?id=263> (дата звернення: 24.04.2026).
13. Ding, M., S.Fiaz, K.Wan, H.Chang, R.Pan, and T.Admas. 2025. “Transcriptomic Meta-Analysis Reveals Hub Genes Integrating Multiple Abiotic Stress Responses in Wheat.” *Food Science & Nutrition* 13, no. 9: e70909. <https://doi.org/10.1002/fsn3.70909>.
14. Dorion S, Ouellet JC, Rivoal J. Glutathione Metabolism in Plants under Stress: Beyond Reactive Oxygen Species Detoxification. *Metabolites*. 2021 Sep 19;11(9):641. doi: 10.3390/metabo11090641. PMID: 34564457; PMCID: PMC8464934.
15. Dutta D., Karmakar S., Hossain A. et al. Wheat and abiotic stress challenges: An overview. *Abiotic Stresses in Wheat*. Elsevier, 2023. P. 1–13. DOI: 10.1016/B978-0-323-95368-9.00006-0
16. Gill S.S., Anjum N.A., Hasanuzzaman M. et al. Glutathione and glutathione reductase: A boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2013. Vol. 70. P. 204–212. DOI: 10.1016/j.plaphy.2013.05.032

17. Hasanuzzaman M, Fujita M. Plant Oxidative Stress: Biology, Physiology and Mitigation. *Plants (Basel)*. 2022 Apr 28;11(9):1185. doi: 10.3390/plants11091185. PMID: 35567186; PMCID: PMC9104056.
18. Huang Z., Li Y., Gou Y. et al. Superoxide dismutase gene family in cassava revealed their involvement in environmental stress via genome-wide analysis. *iScience*. 2023. Vol. 26, № 10. Article 107801. DOI: 10.1016/j.isci.2023.107801
19. Hussain, N., Sohail, Y., Shakeel, N. *et al.* Role of mineral nutrients, antioxidants, osmotic adjustment and PSII stability in salt tolerance of contrasting wheat genotypes. *Sci Rep* 12, 12677 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16922-9>
20. Karimzadeh, H., Borzouei, A., Naserian, B. *et al.* Investigating the response mechanisms of bread wheat mutants to salt stress. *Sci Rep* 13, 18605 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-45009-2>
21. Khalid A, Hameed A, Tahir MF. Wheat quality: A review on chemical composition, nutritional attributes, grain anatomy, types, classification, and function of seed storage proteins in bread making quality. *Front Nutr*. 2023 Feb 24;10:1053196. doi: 10.3389/fnut.2023.1053196. PMID: 36908903; PMCID: PMC9998918.
22. Khoso MA, Hussain A, Ritonga FN, Ali Q, Channa MM, Alshegaihi RM, Meng Q, Ali M, Zaman W, Brohi RD, Liu F, Manghwar H. WRKY transcription factors (TFs): Molecular switches to regulate drought, temperature, and salinity stresses in plants. *Front Plant Sci*. 2022 Nov 8;13:1039329. doi: 10.3389/fpls.2022.1039329. PMID: 36426143; PMCID: PMC9679293.
23. Kumar D., Yusuf M.A., Singh P., Sardar M., Sarin N.B. Histochemical Detection of Superoxide and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Accumulation in *Brassica juncea* Seedlings. *Bio-protocol*. 2014. Vol. 4, № 8. 1108. URL: <https://bio-protocol.org/en/bpdetail?id=1108> (дата звернення: 24.04.2026).
24. Li M, Kim C. Chloroplast ROS and stress signaling. *Plant Commun*. 2021 Nov 9;3(1):100264. doi: 10.1016/j.xplc.2021.100264. PMID: 35059631; PMCID: PMC8760138.

25. Li S. Novel insight into functions of ascorbate peroxidase in higher plants: More than a simple antioxidant enzyme. *Redox Biology*. 2023. Vol. 64. Article 102789. DOI: 10.1016/j.redox.2023.102789
26. Li Y., Zhang Y., Li X. et al. Class III peroxidase: An essential enzyme for enhancing plant physiological and developmental process by maintaining the ROS level: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2024.081406
27. Madhu, Kaur, A., Tyagi, S. *et al.* Exploration of glutathione reductase for abiotic stress response in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Rep* 41, 639–654 (2022). <https://doi.org/10.1007/s00299-021-02717-1>
28. Mao H., Jiang C., Tang C. et al. Wheat adaptation to environmental stresses under climate change: Molecular basis and genetic improvement. *Molecular Plant*. 2023. Vol. 16, № 10. P. 1564–1589. DOI: 10.1016/j.molp.2023.09.001
29. Mishra N, Jiang C, Chen L, Paul A, Chatterjee A and Shen G (2023) Achieving abiotic stress tolerance in plants through antioxidative defense mechanisms. *Front. Plant Sci.* 14:1110622. doi: 10.3389/fpls.2023.1110622
30. Mittler, R., Zandalinas, S.I., Fichman, Y. *et al.* Reactive oxygen species signalling in plant stress responses. *Nat Rev Mol Cell Biol* 23, 663–679 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00499-2>
31. Mokhtari, N., Majidi, M.M. & Mirlohi, A. Physiological and antioxidant responses of synthetic hexaploid wheat germplasm under drought. *BMC Plant Biol* **24**, 747 (2024). <https://doi.org/10.1186/s12870-024-05445-2>
32. Pan, L., Luo, Y., Wang, J. *et al.* Evolution and functional diversification of catalase genes in the green lineage. *BMC Genomics* 23, 411 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08621-6>
33. Pandey S, Fartyal D, Agarwal A, Shukla T, James D, Kaul T, Negi YK, Arora S and Reddy MK (2017) Abiotic Stress Tolerance in Plants: Myriad Roles of Ascorbate Peroxidase. *Front. Plant Sci.* 8:581. doi: 10.3389/fpls.2017.00581
34. Rajput, V.D.; Harish; Singh, R.K.; Verma, K.K.; Sharma, L.; Quiroz-Figueroa, F.R.; Meena, M.; Gour, V.S.; Minkina, T.; Sushkova, S.; et al. Recent

Developments in Enzymatic Antioxidant Defence Mechanism in Plants with Special Reference to Abiotic Stress. *Biology* 2021, 10, 267.

<https://doi.org/10.3390/biology10040267>

35. Rao, M.J.; Duan, M.; Zhou, C.; Jiao, J.; Cheng, P.; Yang, L.; Wei, W.; Shen, Q.; Ji, P.; Yang, Y.; et al. Antioxidant Defense System in Plants: Reactive Oxygen Species Production, Signaling, and Scavenging During Abiotic Stress-Induced Oxidative Damage. *Horticulturae* 2025, 11, 477.

<https://doi.org/10.3390/horticulturae11050477>

36. Sahu PK, Jayalakshmi K, Tilgam J, Gupta A, Nagaraju Y, Kumar A, Hamid S, Singh HV, Minkina T, Rajput VD and Rajawat MVS (2022) ROS generated from biotic stress: Effects on plants and alleviation by endophytic microbes. *Front. Plant Sci.* 13:1042936. doi: 10.3389/fpls.2022.1042936

37. Sanyal RP, Prashar V, Jawali N, Sunkar R, Misra HS and Saini A (2022) Molecular and Biochemical Analysis of Duplicated Cytosolic CuZn Superoxide Dismutases of Rice and in silico Analysis in Plants. *Front. Plant Sci.* 13:864330. doi: 10.3389/fpls.2022.864330

38. Shimadzu UV-1800 UV-Vis Spectrophotometer. American Laboratory Trading. URL: <https://americanlaboratorytrading.com/lab-equipment-products/shimadzu-uv-1800-uv-vis-spectrophotometer-13060/> (дата звернення: 24.04.2026).

39. Singh, P.; Kumar, V.; Sharma, J.; Saini, S.; Sharma, P.; Kumar, S.; Sinhmar, Y.; Kumar, D.; Sharma, A. Silicon Supplementation Alleviates the Salinity Stress in Wheat Plants by Enhancing the Plant Water Status, Photosynthetic Pigments, Proline Content and Antioxidant Enzyme Activities. *Plants* 2022, 11, 2525.

<https://doi.org/10.3390/plants11192525>

40. Sun Y, Xie X, Jiang CJ. Antioxidant Agriculture for Stress-Resilient Crop Production: Field Practice. *Antioxidants* (Basel). 2024 Jan 27;13(2):164. doi: 10.3390/antiox13020164. PMID: 38397762; PMCID: PMC10885882.

41. Triticum aestivum L. Useful Tropical Plants. URL: <https://tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Triticum+aestivum> (дата звернення: 24.04.2026).
42. What is a Grain? Learn All About These Tiny Powerhouses. SeedGuides. URL: <https://seedguides.com/what-is-a-grain/> (дата звернення: 24.04.2026)
43. Wu, L.; Jiang, Q.; Zhang, Y.; Du, M.; Ma, L.; Ma, Y. Peroxidase Activity in Tomato Leaf Cells under Salt Stress Based on Micro-Hyperspectral Imaging Technique. *Horticulturae* 2022, 8, 813. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8090813>
44. Yoshimura K., Takahiro Ishikawa, Physiological function and regulation of ascorbate peroxidase isoforms, *Journal of Experimental Botany*, Volume 75, Issue 9, 3 May 2024, Pages 2700–2715, <https://doi.org/10.1093/jxb/erae061>
45. Zandi, P.; Schnug, E. Reactive Oxygen Species, Antioxidant Responses and Implications from a Microbial Modulation Perspective. *Biology* 2022, 11, 155. <https://doi.org/10.3390/biology11020155>
46. Zhang, Y.; Zheng, L.; Yun, L.; Ji, L.; Li, G.; Ji, M.; Shi, Y.; Zheng, X. Catalase (CAT) Gene Family in Wheat (*Triticum aestivum* L.): Evolution, Expression Pattern and Function Analysis. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 542. <https://doi.org/10.3390/ijms23010542>
47. Cevher-Keskin B, Yıldızhan Y, Sekmen AH, Fayetorbay R, Sezerman OU, Özer B, Onarıcı S, Türkan İ and Tör M (2025) Deciphering drought-response in wheat (*Triticum aestivum*): physiological, biochemical, and transcriptomic insights into tolerant and sensitive cultivars under dehydration shock. *Front. Plant Sci.* 16:1649378. doi: 10.3389/fpls.2025.1649378