

Modeling of Drought in the Experiment and Assessment of its Effects on Plants

N.G. Osmolovskaya, J.S. Shumilina, T.V. Grishina, A.V. Didio,
E.M. Lukasheva, T.E. Bilova, A.A. Frolov

Saint-Petersburg State University, Russia

*E-Mail: natalia_osm@mail.ru

Received November 12, 2017

Drought is one of the most damaging types of abiotic stresses that causes significant annual yield losses, and poses a serious threat to sustainable agriculture. However, like other stressors, the drought triggers in plants a wide range of responses that are implemented at the molecular, cellular and organism level and aimed at reducing the damaging effects and formation of plant tolerance to water deficit. The study of plant adaptive responses to drought and interpretation of mechanisms to enhance drought tolerance requires adequate and reliable methods of experimentation and objective methods for assessment of research results. The review examined three types of current models that are used in experiments on the effect of drought on plants, namely, soil, water, and agar models. The main advantages and disadvantages of each model are discussed including models with drought conditions simulation by providing PEG in the root medium but the choice of optimal model should be determined depending on the specific problems solved by the experimenter. Currently, researchers have a wide range of methodological approaches and tools for objective assessment of changes in physiological and biochemical parameters of plants in response to the drought. Among the most common are methods associated with the assessment of such parameters as stomatal conductance, photosystem II efficiency using PAM fluorometry, accumulation of osmotically active substances. Special attention is given to methods of assessing the activity of the antioxidant systems in plants, primarily of ascorbate-glutathione cycle as one of the most efficient methods in screening species and varieties of plants on drought tolerance. It should be concluded that for the successful development of new strategies aimed at the improvement of drought resistance of plants the acquisition of knowledge is required with the use of current molecular biological methods based on the application of metabolomics and proteomic analyses of plants.

Key words: drought stress tolerance, PEG, model experiments, method of drought stress assessment

Растения в естественной среде постоянно подвергаются воздействию различных биотических и абиотических стрессов. Засуха является одним из наиболее повреждающих стрессовых факторов, приводящих к значительным ежегодным потерям урожая, и представляет серьезную угрозу для устойчивого земледелия (Farooq *et al.*, 2009; Anjum *et al.*, 2011). Территории засушливых регионов с годовой суммой осадков ниже 250 мм составляют более трети земной поверхности, при этом 12% суши относится к крайне аридным территориям (Chirkova, 2002). Полагают, что засуха наносит больший урон растениеводству, чем все остальные стрессовые факторы, вместе взятые (Lambers *et al.*, 2008) и в текущем столетии она может стать еще более распространенным явлением в связи с существующими прогнозами глобального потепления, согласно которым значительная часть территорий суши подвергнется усилению засухи (Zhao, Dai, 2015).

Продолжительное отсутствие осадков, совмещенное с усилением испарения воды и транспирации растений, ведет к почвенной засухе, что создает дефицит воды для нормального роста и развития растений и завершения ими жизненного цикла. Засуха оказывает угнетающее действие не только на водный обмен, но и на другие процессы растений, включая фотосинтез, дыхание и минеральное питание (Chirkova, 2002; Frolov *et al.*, 2017). Ее следствием является снижение скорости деления клеток, размеров листа, роста стебля, пролиферации корней, нарушение работы устьичного аппарата (Farooq *et al.* 2009; Anjum *et al.*, 2011), а также сверхпродукция активных форм кислорода (АФК) и развитие окислительного стресса (Kag, 2011), что, в конечном счете, ведет к торможению роста и снижению продуктивности растений, а при длительном воздействии засухи - к гибели наиболее чувствительных растений (Gill, Tuteja, 2010).

Вместе с тем засуха, подобно другим стрессорам, запускает широкий спектр ответных адаптивных механизмов растений, реализуемых на молекулярном, клеточном и организменном уровне и

направленных на снижение ее повреждающего действия и формирование устойчивости растений к водному дефициту (Chirkova, 2002; Duque *et al.*, 2013; Grover *et al.*, 2001; Anjum *et al.*, 2011). Особое внимание исследователей в связи с этим уделяется вопросам активирования синтеза низкомолекулярных осмолитов, стрессовых белков и антиоксидантов (Chirkova, 2002; Ibragimova *et al.*, 2010; Lipiec *et al.*, 2010; Bhargava, Sawant, 2013; Gill, Tuteja, 2010; Frolov *et al.*, 2017). Подчеркивается, что лучшая выживаемость растений может быть достигнута посредством избегания стресса или при участии механизмов стресс-устойчивости, сопряженных с существенными изменениями в протеоме и метаболоме растений (Verslues *et al.*, 2006; Frolov *et al.*, 2017). Расшифровка биохимических и молекулярных ответов растений на засуху и получение новых знаний о вызываемых ею изменениях в протеоме и метаболоме рассматривается как одна из важнейших задач на пути развития стратегий повышения засухоустойчивости растений и селекции и инженерии растений с желаемыми агрономическими характеристиками (Frolov *et al.*, 2017).

MODELING TECHNIQUES OF DROUGHT IN THE EXPERIMENT

Для решения этих задач и изучения реакций растений на засуху необходимы адекватные методические подходы и надежные экспериментальные модели. На сегодняшний день существует достаточно широкий спектр таких подходов, основанных на нескольких базовых принципах. Применяемые в настоящее время экспериментальные модели засухи можно разделить на три основных типа: почвенные, гидропонные и агаровые модели. Каждая модель имеет свои преимущества и недостатки, поэтому выбор зачастую зависит от целей исследования и предпочтений экспериментатора.

Modeling of drought in soil culture

Почвенные модели с постепенным снижением или полным прекращением полива в настоящее время являются одним из наиболее простых

способов создания естественных условий засухи (Bartoli *et al.*, 1999). Подобные модели хорошо имитируют кратковременную засуху, довольно распространенную в практике сельского хозяйства вследствие часто меняющихся климатических условий (Vinocur, Altman, 2006). Несмотря на то, что эти модели являются весьма актуальными, изменения водного потенциала в таких системах непредсказуемы и на практике, к сожалению, их нельзя экспериментально определить каким-либо надежным образом. В идеале такой тип экспериментов должен учитывать структуру частиц почвы и их влагоемкость. С целью оптимизации данного метода была предложена модель, в которой растение выращивается в сосуде, закрытом фольгой, для предотвращения испарения влаги с поверхности почвы (Farooq *et al.*, 2009). При этом в каждый сосуд вставлялась трубочка для облегчения повторного полива растений. Это позволило создать условия постепенно развивающейся засухи, что наиболее приближено к естественным условиям и дает возможность применять стресс в течение более длительного времени, если это необходимо (Thompson *et al.*, 2004). Стабильность таких систем может быть еще больше повышена за счет автоматизации режима полива. Так, недавно Тодака с соавторами сообщили о создании автоматической ирригационной системы полива, основанной на контроле фактического содержания воды в почве с целью обеспечения необходимого количества воды для орошения (Todaka *et al.*, 2017). Используя данный подход, авторы создали модель засухи с определенными значениями водного потенциала: -9,8, -31,0 и -309,9 КПа. Но условия сильного обезвоживания не могли надежно контролироваться описанной выше системой, и поэтому имитировались путем помещения корней в воздушную среду на период до 8 часов, согласно методу, предложенному в работе (Ito *et al.*, 2006).

Водный потенциал листьев в некоторой степени связан с показателем доступности воды для растений, который, в свою очередь, зависит от водного потенциала, как почвы, так и корней (Zhou *et al.*, 2013). Хотя описанные стратегии являются надежными, повторные измерения водного

потенциала листьев и/или почвы трудоемки и требуют дополнительного сбора материала, что затруднительно при проведении долгосрочных экспериментов. Последний фактор может иметь решающее значение при наличии относительно небольшого количества растительного материала, например, в экспериментах с мутантами или трансгенными растениями, в частности, имеющими пониженную устьичную проводимость или меньшую площадь листа. Так, в случае с арабидопсисом, хорошим способом избежать этого осложнения явилось выращивание мутантов и растений дикого типа в одном сосуде с почвой, что позволило авторам определять водный потенциал для растения дикого типа и экстраполировать результат на мутантный тип (Verslues *et al.*, 2006). В таком случае корни обоих генотипов будут находиться в среде с одним и тем же водным потенциалом, даже если один из генотипов использует воду быстрее другого. Этот подход может быть совмещен с измерениями водного потенциала почвы в конце периода засухи для установления финального показателя засухи. Ключевым фактором в этих экспериментах является скорость высыхания почвы. Очень быстрое высыхание оставляет мало времени для реализации медленных ответов, таких как аккумуляция осмолитов или модификации клеточной стенки, и может привести к игнорированию ряда важных аспектов ответной реакции растений. Избежать этой ситуации поможет использование достаточно большого и глубокого сосуда для растений (Verslues *et al.*, 2006).

Modeling of drought in hydroponics and agar culture

Несмотря на все преимущества почвенной модели засухи и ее максимальную приближенность к естественным условиям, данный подход имеет общее внутреннее ограничение, ввиду отсутствия возможности регулярного контроля водного потенциала корнеобитаемой среды. Преодолеть это ограничение возможно за счет использования вместо почвенной гидропонной модели засухи. Одним из экспериментальных приемов создания ризосферой засухи в этой модели явилось понижение уровня

питательного раствора в сосудах с растениями, при котором часть корней оказывается в воздушной среде (Koyama *et al.*, 2012). Результатом данного приема, испытанного на растениях салата, стало отмеченное авторами улучшение питательной ценности растений за счет снижения содержания нитратов и повышения содержания сахаров в их листьях. Более широкое применение нашел прием снижения водного потенциала корнеобитаемой среды путем внесения в питательный раствор осмотически активных веществ (осмолитов). Это позволяет осуществлять эффективный контроль за величиной водного потенциала, что существенно для обеспечения высокой точности, воспроизводимости и сравнительной оценки различных экспериментов (Sunaina *et al.*, 2016). Однако выбор осмолита требует особого рассмотрения. Так, снижение водного потенциала, или осмотический стресс, может быть достигнуто путем добавления в питательный раствор таких низкомолекулярных осмотически активных соединений как сахароспирты (например, маннитол) или хлорид натрия (Hohl, Schopfer, 1991). Однако их использование имеет побочный негативный эффект, так как они не только легко проникают через клеточные стенки и мембраны внутрь клеток, вызывая плазмолиз, но и могут быть вовлечены в процессы метаболизма растений, то есть непосредственно повлиять на результаты эксперимента (Munns, 2002). Кроме того, в ряде случаев было отмечено, что растворы таких осмолитов, как маннитол и мелибиоза, могут оказать на растения токсическое действие (Verslues *et al.*, 1998). В этом контексте предпочтительным представляется использование нетоксичных полимерных осмолитов, не способных к проникновению через клеточные мембраны (Hassan *et al.*, 2004). Поэтому в настоящее время большинство моделей засухи опираются на использование в качестве непроникающего осмотического агента полиэтиленгликоля (ПЭГ) со средним молекулярным весом 6000 (Hohl, Schopfer, 1991), что ведет к снижению водного потенциала среды и блокированию поглощения воды корнями растений (Chutia, Borah, 2012). Такой подход позволяет обеспечить стабильное снижение уровня

водного потенциала в течение любых желаемых периодов времени (Bressan *et al.*, 1981). В связи с возможностью в этом случае проведения так называемых «восстановительных экспериментов» путем перевода растений на ПЭГ-свободную среду, эта модель засухи стала одной из наиболее широко используемых в современных молекулярно-биологических исследованиях (Rao, Jabeen, 2013).

Однако, модели водной засухи, основанные на использовании ПЭГ в питательных растворах, также имеют некоторые ограничения (Bressan *et al.*, 1981), в том числе, из-за повышения вязкости раствора и снижения диффузии кислорода к корням, что может вызвать гипоксию и требует дополнительной аэрации раствора (Verslues *et al.*, 1998). С другой стороны, некоторые авторы отмечают, что ПЭГ с молекулярным весом от 4000 до 8000 может поглощаться и аккумулироваться в корнях и листьях растений, особенно при физическом повреждении корней (Jacomini *et al.*, 1988), что оказывает дополнительный эффект на гидравлические характеристики листьев. При этом побочный эффект использования ПЭГ в водной культуре может зависеть от вида растений, концентрации ПЭГ, времени экспозиции и степени повреждения корней (Blum, 2017). В этом контексте, модель засухи, основанная на использовании агаризованной питательной среды, может считаться перспективной альтернативой гидропонной модели. Так, она была успешно применена для создания водного дефицита в физиологических экспериментах с проростками *A. thaliana* (van der Weele *et al.*, 2000; Verslues *et al.*, 2006). Определенные трудности, связанные с введением высокомолекулярного компонента ПЭГ 8000 в агаризованную среду, были преодолены путем предварительного растворения ПЭГ в питательном растворе того же состава, что и состав культуральной среды. Становление равновесного водного потенциала в объеме среды достигалось по истечении 24 часов после внесения ПЭГ и его диффузии в агаровой среде (van der Weele *et al.*, 2000).

Чаще всего в качестве осмотически активного вещества в моделях с агаровой средой используют ПЭГ в такой концентрации, чтобы водный потенциал

среды не превышал значения $-1,2$ МПа (Verslues et al., 1998). В этой связи следует отметить, что большинство активно вегетирующих растений завядают при водном дефиците $-1,5$ МПа и гибнут при -15 МПа (Chirkova, 2002). Например, влияние водного стресса на прорастание семян и рост проростков рапса успешно исследовали с использованием агаровой модели засухи при 10% содержании ПЭГ 6000 в среде (Yang et al., 1998). Модель осмотического стресса на основе применения ПЭГ 8000 позволяет создавать более широкий диапазон значений водного потенциала от $-0,47$ МПа до $-3,02$ МПа (He et al., 2015). Примечательно, что использование агаровой модели засухи с ПЭГ 8000 показало большую чувствительность взрослых растениях *A. thaliana* к снижению водного потенциала (Frolov et al., 2017) по сравнению с проростками (Verslues et al., 2006). Так, 7-суточное экспонирование 6-недельных растений на агаризованной питательной среде с водным потенциалом ниже $-0,6$ МПа приводило к снижению выживаемости растений, а также к существенным изменениям их первичного метаболома и протеома (Frolov et al., 2017), что подтверждало данные (Verslues, Bray, 2004). В контексте востребованности новых подходов к повышению засухоустойчивости растений и разработке адекватных и воспроизводимых экспериментальных моделей, агаровая модель с инфузией ПЭГ обладает двумя принципиальными преимуществами. В отличие от почвенной, она обеспечивает стабильность и воспроизводимость снижения водного потенциала, а в отличие от водной модели она ближе к агрономической засухе, т.к. основана на использовании твердого субстрата и предотвращает склеивание корневых волосков, имеющее место в водной модели (Frolov et al., 2017).

ASSESSMENT OF DROUGHT EFFECTS ON PLANTS IN THE EXPERIMENT

Начавшаяся засуха влияет на различные реакции растений и проявляется на морфологическом, физиологическом и биохимическом уровнях. В исследованиях, посвященных изучению поведения растений в условиях засухи, важным является как

анализ ответных реакций растений на воздействие водного стресса, так и расшифровка механизмов, способствующих повышению засухоустойчивости растений. Одним из первых стрессовых симптомов при засухе является обезвоживание растений, которое характеризуется снижением водного потенциала и потерей тургора листьев (Jaleel et al., 2009). Степень потери воды растением можно надежно охарактеризовать на основе оценки относительного содержания воды в листе. Простейшим способом определения данного параметра является гравиметрический метод, позволяющий установить соотношение сухого и свежего веса листьев (Silva et al., 2007). Хотя на сегодняшний день этот показатель можно регистрировать в автоматическом режиме путем измерения отражения листьев в инфракрасной части спектра (Hunt et al., 1987), гравиметрический подход обеспечивает более воспроизводимые данные.

Еще одним ранним симптомом стрессового действия засухи является закрытие устьиц, препятствующее транспирационной потере воды в условиях наступления обезвоживания (Sobeih et al., 2004). Экспериментально данный параметр может быть охарактеризован путем оценки потока газа через поверхность листа, то есть проводимости устьиц, например, путем измерения электропроводности водной пленки на поверхности листа (Burkhardt et al., 1999). Устьичная проводимость обычно измеряется в $\text{ммоль}/\text{м}^2/\text{с}$ и является мерой скорости выхода водяного пара через устьица листа. Технически такие эксперименты опираются на порометрические измерения и регистрацию времени, необходимого для повышения влажности воздуха в изолированной камере с листом (Monteith et al., 1988).

Поскольку закрытие устьиц нарушает снабжение клеток мезофилла углекислым газом, то засуха, в конечном итоге, подавляет усвоение углерода и световые реакции фотосинтеза (Farooq et al., 2009). В результате в листьях может снизиться уровень хлорофилла, начаться деструкция фотосинтетического аппарата, что приведет к окислительному повреждению липидов хлоропластов, пигментов и белков (Tambussi et al.,

2000). Эти эффекты обычно проявляются при снижении активности фотосистемы II (ФС II) на фоне деградации хлорофиллов, что может быть количественно оценено с помощью метода ПАМ флуориметрии, основанного на импульсной амплитудной модуляции, который позволяет дать экспериментальную оценку эффективности работы ФС II (Klughammer, Schreiber, 2008). Основными регистрируемыми параметрами являются значение минимальной флуоресценции хлорофилла *a* (Ф0) после периода адаптации листьев к темноте и значение максимальной флуоресценции (ФМ) после подачи светового импульса. На их основе рассчитывают показатель максимальной фотохимической активности ФС II: $(ФМ-Ф0)/ФМ=ФВ/ФМ$, являющийся надежным маркером фотоингибирования ФС II (Motohashi, Myouga, 2015). Регистрация флуоресценции хлорофиллов осуществляется *in vivo* и не требует пробоподготовки исследуемых объектов (La Rocca, 2014). В ряде случаев, однако, засуха не вызывала регистрируемых изменений активности ФС II, например, в полевом эксперименте у растений картофеля, что было объяснено фотохимическим механизмом гашения избытка световой энергии через усиление фотодыхания (Jefferies, 1994).

С другой стороны, как было показано для *A. thaliana*, снижение соотношения ФВ/ФМ не всегда является следствием засухи и может свидетельствовать о начале старения листьев (Wingler *et al.*, 2004). В экспериментах, выполненных на растениях *B. napus*, культивируемых в течение 3 недель на азрируемой питательной среде с водным потенциалом -0,6 МПа (18% ПЭГ), было проведено сравнительное исследование засухоустойчивости 2-х сортов рапса, основанное на оценке ряда физиолого-биохимических показателей, включая квантовый выход ФС II (Kausar *et al.*, 2007). В то время как засуха провоцировала заметное снижение ростовых и фотосинтетических параметров, включая активность ФС II и содержание хлорофилла *a* у обоих опытных сортов, большую засухоустойчивость показал сорт с более высоким содержанием в листьях хлорофилла *a* и каротиноидов и одновременно с более высоким показателем ФВ/ФМ,

что авторы связали, в частности, с лучшей антиоксидантной защитой фотосинтетического аппарата. Поскольку положительной корреляции засухоустойчивости с осмотическими адаптациями в листьях рапса обнаружено не было, был сделан вывод, что квантовый выход фотосинтеза и содержание хлорофилла *a* могут быть эффективными селекционными критериями при оценке устойчивости сортов рапса к условиям засухи (Kausar *et al.*, 2007). Другие исследователи, однако, отмечают, что аккумуляция таких осмотически активных совместимых метаболитов как глицинбетаин, пролин и другие аминокислоты, а также органические кислоты, сахара и сахароспирты является одним из важных механизмов поддержания водного статуса и физиологической активности клеток растений, особенно в условиях временной засухи (Chirkova, 2002; Farooq *et al.*, 2009; Ibragimova *et al.*, 2010). Оценка роли этих соединений в адаптации растений к засухе и повышении их засухоустойчивости в настоящее время успешно исследуется с применением, в том числе, методов метаболомного анализа, позволяющего провести быстрое и высокоточное определение широкого спектра метаболитов в одной пробе (Jorge *et al.*, 2016). Примечательно, что одновременное воздействие засухи и питательного (азотного) стресса сопровождалось менее выраженным завяданием у растений рапса, возможно из-за меньших размеров листа и частичного закрытия устьиц (Albert *et al.*, 2012). При этом отмечался значительный рост аккумуляции пролина, прежде всего, в молодых листьях рапса, где он составлял до 25-85% общего пула аминокислот, причем аккумуляция пролина была выше у нитрат-обеспеченных растений, где он участвовал в перераспределении азота к развивающимся листьям.

Механизм закрытия устьиц при засухе, как известно, регулируется абсцизовой кислотой (АБК) и представляет АБК-зависимый сигнальный путь (Seki *et al.*, 2007), косвенно также влияющий на содержание CO₂ и скорость фотосинтеза в листьях (Daszkowska-Golec, Szarejko, 2013). Вторым важным посредником реакции растений на засуху является

окислительный стресс, вызываемый генерацией активных форм кислорода (АФК) (Daszkowska-Golec, Szarejko, 2013), которые могут реагировать с белками, липидами и ДНК, вызывая окислительные повреждения и нарушая нормальное функционирование клеток (Farooq et al., 2009). АФК охотно атакуют двойные связи полиненасыщенных жирных кислот с образованием гидроперекисей липидов (Moore, Roberts, 1998) и различных дикарбониллов на последующих этапах этих цепных радикальных реакций (Davey et al., 2005). В целом продукция АФК линейно коррелирует со степенью стресса, что ведет к усилению перекисного окисления мембранных липидов, деградации нуклеиновых кислот и структурных и функциональных белков (Farooq et al., 2009). Надежным маркером окислительного повреждения липидов является малондальдегид (МДА), концентрация которого в листьях возрастает в ответ на стресс, что экспериментально оценивают методом, основанном на реакции МДА с тиобарбитуровой кислотой (Davey et al., 2005). Одной из наиболее стабильных форм АФК является пероксид водорода, поэтому его определение также часто используют для оценки степени окислительного стресса (Rhee et al., 2010).

Количество АФК в клетках растений, подвергнутых воздействию стрессоров, может снижаться при участии ряда антиоксидантных ферментов, которые рассматривают как наиболее эффективный механизм противодействия окислительному стрессу, при этом основную роль в устранении H_2O_2 играет аскорбат-глутатионовый цикл (Farooq et al., 2009; Foyer, Noctor, 2011), в котором участвуют 4 фермента – аскорбатпероксидаза, дегидроаскорбатпероксидаза, монодегидроаскорбатпероксидаза и глутатион-редуктаза (Fazeli et al., 2007). Аскорбатпероксидаза является ключевым антиоксидантным ферментом растений для устранения H_2O_2 в клетках, использующим в качестве донора электронов аскорбиновую кислоту (Smirnoff, 1996). Формирующийся дегидроаскорбат может регенерироваться монодегидроаскорбатредуктазой при участии НАДФН в качестве восстановителя (Noctor, Foyer, 1998). Образующийся

монодегидроаскорбат токсичен и легко удаляется дегидроаскорбатредуктазой (Del Rio et al., 2005) одновременно с окислением глутатиона (GSH) в дисульфид глутатиона (GSSG), который может быть регенерирован в GSH при участии глутатионредуктазы (Meuer, 2008). Глутатионредуктаза играет центральную роль в поддержании пула восстановленного глутатиона, необходимого при стрессе (Pastori et al., 2000). Соотношение восстановленных и окисленных форм аскорбата и глутатиона имеет решающее значение для поддержания благоприятного состояния окислительно-восстановительных реакций в живой клетке, и, как полагают, является информативным показателем способности растений адаптироваться к экологическому стрессу, включая засуху (Meuer, 2008). Поэтому определение активности антиоксидантных ферментов можно считать одним из эффективных методов при скрининге разных видов и сортов растений на засухоустойчивость. Кроме того, ферменты аскорбат-глутатионового цикла в последнее время рассматриваются как мишени при получении трансгенных стрессоустойчивых растений (Kang et al., 2013).

CONCLUSION

Таким образом, современный уровень организации исследований по изучению влияния засухи на различные функциональные показатели растений позволяет выбрать наиболее оптимальную модель постановки опытов в зависимости от конкретных задач, решаемых экспериментатором. Для установления ответных реакций растений на воздействие засухи и получения адекватной информации об их засухоустойчивости предлагается ряд методических подходов с использованием широкого спектра аналитических методов. Прогресс в развитии новых стратегий повышения засухоустойчивости растений связывают с применением молекулярно-биологических подходов к изучению стрессоустойчивости и получением новых знаний, базирующихся на использовании методов метаболомного и протеомного анализа растений.

ACKNOWLEDGEMENT

Работа выполнена в СПбГУ за счет финансовой поддержки гранта Российского научного фонда (проект № 17-16-01042).

REFERENCES

- Albert B., Avice J., Leport L., Bouchereau A. (2012) Nitrogen availability impacts oilseed rape (*Brassica napus* L.) plant water status and proline production efficiency under water-limited conditions. *Planta*, **236**, 659–676.
- Anjum S.A., Xie X., Wang L., Saleem M.F., Man C., Lei W. (2011). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research*, **6**, 2026–2032.
- Bartoli C.G., Simontacchi M., Tambussi E., Beltrano J., Montaldi E., Puntarulo S. (1999) Drought and watering-dependent oxidative stress: effect on antioxidant content in *Triticum aestivum* L. leaves. *J. Exp. Bot.*, **50(332)**, 375–383.
- Bhargava S., Sawant K. (2013) Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. *Plant Breeding*, **132**, 21–32.
- Blum A. (2017) Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production. *Plant, Cell & Environment*, **40**, 4–10.
- Bressan R.A., Hasegawa P.M., Handa A.K. (1981) Resistance of cultured higher plant cells to polyethylene glycol-induced water stress. *Plant Sci. Lett.*, **21**, 23–30.
- Burkhardt J., Kaiser H., Goldbach H., Kappen L. (1999) Measurements of electrical leaf surface conductance reveal recondensation of transpired water vapour on leaf surfaces. *Plant, Cell & Environ.*, **22**, 189–196.
- Chirkova T.V. (2002) *Physiologicheskie osnovy ustojchivosti rastenii*. Izd-vo S.-Peterb. Univ.: SPb, 1–244 (in Russian).
- Chutia J., Borah S.P. (2012) Water stress effects on leaf growth and chlorophyll content but not the grain yield in traditional rice (*Oryza sativa* Linn.) genotypes of Assam, India: II. Protein and proline status in seedlings under PEG induced water stress. *Am J. Plant Sci.*, **3(7)**, 971–980.
- Daszkowska-Golec A., Szarejko I. (2013) Open or close the gate – stomata action under the control of phytohormones in drought stress conditions. *Front. Plant Sci.*, **4**:138, doi: 10.3389/fpls.2013.00138
- Davey M.W., Stals E., Panis B., Keulemans J., Swennen R.L. (2005) High-throughput determination of malondialdehyde in plant tissues. *Anal. Biochem.*, **347(2)**, 201–207.
- Del Rio D., Stewart A.J., Pellegrini N. (2005) A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, **15 (4)**, 316–328.
- Duque A.S., de Almeida A.M., da Silva A.B., da Silva J.M., Farinha A.P., Santos D., Fevereiro P., de Sousa Araújo S. (2013). Abiotic stress responses in plants: unraveling the complexity of genes and networks to survive. In: Vahdati K., Leslie C. (eds.) *Abiotic stress-plant responses and applications in agriculture*, INTECH-Open Access Publisher, Croatia, 49–101.
- Grover A., Sahi C., Sanan N., Grover A. (1999) Taming abiotic stresses in plants through genetic engineering: current strategies and perspective. *Plant Sci.*, **143**, 101–111.
- Farooq M., Wahid A., Kobayashi N., Fujita D., Basra S.M.A. (2009) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agron. Sustain. Dev.*, **29(1)**, 185–212.
- Fazeli F., Ghorbanli M., Niknam V. (2007) Effect of drought on biomass, protein content, lipid peroxidation and antioxidant enzymes in two sesame cultivars. *Biol. Plant.*, **51**, 98–103.
- Foyer C.H., Noctor G. (2011) Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiol.*, **155(1)**, 2–18.
- Frolov A., Bilova T., Paudel G., Berger R., Balcke G.U., Birkemeyer C., Wessjohann L.A. (2017) Early responses of mature *Arabidopsis thaliana* plants to reduced water potential in the agar-based polyethylene glycol infusion drought model. *J. Plant*

- Physiol.*, **208**, 70–83.
- Gill S.S., Tuteja N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, **48(12)**, 909–930.
- Hassan N.S., Shaaban L.D., Hashem E.S.A., Seleem E.E. (2004) In vitro selection for water stress tolerant callus line of *Helianthus annuus* L. cv. Myak. *Int. J. Agric. Biol.*, **6**, 13–18.
- He Y., Wu J., Lv B., Li J., Gao Z., Xu W., Baluka F., Shi W., Shaw P.C., Zhang J. (2015) Involvement of 14-3-3 protein GRF9 in root growth and response under polyethylene glycol-induced water stress. *J. Exp. Bot.*, **66(8)**, 2271–2281.
- Hohl M., Schopfer P. (1991) Water relations of growing maize coleoptiles: comparison between mannitol and polyethylene glycol 6000 as external osmotica for adjusting turgor pressure. *Plant Physiol.*, **95(3)**, 716–722.
- Hunt E.R., Rock B.N., Nobel P.S. (1987) Measurement of leaf relative water content by infrared reflectance. *Remote Sens. Environ.*, **22(3)**, 429–435.
- Ibragimova S.S., Gorelova V.V., Kochetov A.V., Shumnyj V.K. (2010) Rolj razlichnykh metabolitov v formirovanii stressoustoichivosti rastenij. *Vestnik NGU, Ser. Biologiya, Klinicheskaya medicina*, **8(3)**, 98–103 (in Russian).
- Ito Y., Katsura K., Maruyama K., Taji T., Kobayashi M., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2006) Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. *Plant Cell Physiol.*, **47(1)**, 141–153.
- Jacomini E., Bertani A., Mapelli S. (1988) Accumulation of polyethylene glycol 6000 and its effects on water content and carbohydrate level in water-stressed tomato plants. *Can. J. Bot.*, **66(5)**, 970–973.
- Jaleel C.A., Manivannan P., Wahid A., Farooq M., Somasundaram R., Panneerselvam R. (2009) Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *Int. J. Agric. Biol.*, **11**, 100–105.
- Jefferies R.A. (1994) Drought and chlorophyll fluorescence in field-grown potato (*Solanum tuberosum*). *Physiol. Plant.*, **90(1)**, 93–97.
- Jorge T.F., Rodrigues J.A., Caldana C., Schmidt R., van Dongen J.T., Thomas-Oates J., António C. (2016) Mass spectrometry-based plant metabolomics: Metabolite responses to abiotic stress. *Mass Spectrometry Reviews*, **35(5)**, 620–649.
- Kang G.Z., Li G.Z., Liu G.Q., Xu W., Peng X.Q., Wang C.Y., Zhu Y.J., Guo, T. (2013) Exogenous salicylic acid enhances wheat drought tolerance by influence on the expression of genes related to ascorbate-glutathione cycle. *Biol. Plant.*, **57(4)**, 718–724.
- Kar R.K. (2011) Plant responses to water stress. Role of reactive oxygen species. *Plant Signaling & Behavior*, **6(11)**, 1741–1745.
- Kausar R., Athar H.U.R., Ashraf M. (2006) Chlorophyll fluorescence: a potential indicator for rapid assessment of water stress tolerance in canola (*Brassica napus* L.). *Pak. J. Bot.*, **38(5)**, 1501–1509.
- Klughammer C., Schreiber U. (2008) Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the Saturation Pulse method. *PAM Appl. Notes*, **1(1)**, 27–35.
- Koyama R., Itoh H., Kimura S., Morioka A., Uno Y. (2012) Augmentation of antioxidant constituents by drought stress to roots in leafy vegetables. *HortTechnology*, **22(1)**, 121–125.
- Lambers H., Chapin F.S., Pons T.L. (2008) *Plant Physiological Ecology*. Second Edition. Springer Science Business Media, LLC. 604 pp.
- La Rocca N., Pupillo P., Puppi G., Rascio N. (2014) *Erythronium dens-canis* L. (Liliaceae): An unusual case of change of leaf mottling. *Plant Physiol.*, **74**, 108–187.
- Lipiec J., Doussan C., Nosalewicz A., Kondracka K. (2013) Effect of drought and heat stresses on plant growth and yield: a review. *Int. Agrophys.*, **27**, 463–477.
- Meyer A.J. (2008) The integration of glutathione homeostasis and redox signaling. *J. Plant Physiol.*, **165(13)**, 1390–1403.
- Monteith J.L., Campbell G.S., Potter E.A. (1998) Theory

- and performance of a dynamic diffusion porometer. *Agric. For. Meteorology*, **44(1)**, 27–38.
- Moore K., Roberts L.J. (1998) Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic. Res.*, **28(6)**, 659–671.
- Motohashi R., Myouga F. (2015). Chlorophyll fluorescence measurements in *Arabidopsis* plants using a pulse-amplitude-modulated (PAM) fluorometer. *Bio-protocol* 5(9): e1464. DOI: 10.21769/BioProtoc.1464.
- Munns R. (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell & Environment*, **25(2)**, 239–250.
- Noctor G., Foyer C.H. (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **49(1)**, 249–279.
- Pastori G., Foyer C.H., Mullineaux P. (2000) Low temperature-induced changes in the distribution of H₂O₂ and antioxidants between the bundle sheath and mesophyll cells of maize leaves. *J. Exp. Bot.*, **51**, 107–113.
- Rao S., Jabeen F.T.Z. (2013) In vitro selection and characterization of polyethylene glycol (PEG) tolerant callus lines and regeneration of plantlets from the selected callus lines in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Physiol. Mol. Biol. Plants*, **19(2)**, 261–268.
- Rhee S., Chang T.-S., Jeong W., Kang D. (2010) Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cell. *Mol. Cells*, **29(6)**, 539–549.
- Schreiber U. (2004) Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: An overview. In: Papageorgiou G.C. and Govindjee (eds), *Advances in Photosynthesis and Respiration. V.19: Chlorophyll a Fluorescence: A signature of Photosynthesis*. Springer: Dordrecht, The Netherlands, 279–319.
- Seki M., Umezawa T., Urano K., Shinozaki K. (2007) Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **10(3)**, 296–302.
- Silva M.D.A., Jifon J.L., Da Silva J.A.G., Sharma V. (2007) Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. *Brazilian J. Plant Physiol.*, **19(3)**, 193–201.
- Singh D.P., Singh P., Kumar A., Sharma H.C. (1985) Transpirational cooling as a screening technique for drought tolerance in oil seed brassicas. *Ann. Bot.*, **56(6)**, 815–820.
- Smirnoff N. (1996) Botanical briefing: the function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Ann. Bot.*, **78(6)**, 661–669.
- Sobeih W.Y., Dodd I.C., Bacon M.A., Grierson D., Davies W.J. (2004) Long-distance signals regulating stomatal conductance and leaf growth in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants subjected to partial root-zone drying. *J. Exp. Bot.*, **55(407)**, 2353–2363.
- Sunaina N.A., Singh N.B. (2016) PEG imposed water deficit and physiological alterations in hydroponic cabbage. *Iranian Journal of Plant Physiology*, **6(2)**, 1651–1658.
- Tambussi E.A., Bartoli C.G., Beltrano J., Guamet J.J., Araus J.L. (2000) Oxidative damage to thylakoid proteins in water-stressed leaves of wheat (*Triticum aestivum*). *Physiol. Plant.*, **108(4)**, 398–404.
- Thompson A.J., Thorne E.T., Burbidge A, Jackson A.C., Shsrp R.E., Taylor I.B. (2004) Complementation of notabilis, an abscisic acid-deficient mutant of tomato: importance of sequence context and utility of partial complementation. *Plant, Cell & Environ.*, **27(4)**, 459–471.
- Todaka D., Zhao Y., Yoshida T., Kudo M., Kidokoro S., Mizoi J., Kodaira K.-S., Takebayashi Y., Kojima M., Sakakibara H., Toyooka K., Sato M., Fernie A.R., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2017) Temporal and spatial changes in gene expression, metabolite accumulation and phytohormone content in rice seedlings grown under drought stress conditions. *Plant J.*, **90(1)**, 61–78.
- Van der Weele C.M., Spollen W.G., Sharp R.E., Baskin T.I. (2000) Growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. *J. Exp. Bot.*, **51(350)**, 1555–1562.
- Verslues P.E., Agarwal M., Katiyar-Agarwal S., Zhu J., Zhu J.-K. (2006) Methods and concepts in

- quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J.*, **45(4)**, 523–539.
- Verslues P.E., Bray, E.A. (2004) LWR1 and LWR2 are required for osmoregulation and osmotic adjustment in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **136(1)**, 2831–2842.
- Verslues P.E., Ober E.S., Sharp R.E. (1998) Root growth and oxygen relations at low water potentials. Impact of oxygen availability in polyethylene glycol solutions. *Plant Physiol.*, **116(4)**, 1403–1412.
- Vinocur B., Altman A. (2006) Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: Achievements and limitations. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **16(2)**, 123–132.
- Wingler A., Mares M., Pourtau N. (2004) Spatial patterns and metabolic regulation of photosynthetic parameters during leaf senescence. *New Phytol.*, **61(3)**, 781–789.
- Yang C.J., Zhang X.K., Zou C.S., Cheng Y., Zhen P.Y., Li G.Y. (1998) Effects of drought simulated by PEG-6000 on germination and seedling growth of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Chinese J. Oil Crop Sci.*, **29**, 425–430.
- Zhao T., Dai A. (2015) The magnitude and causes of global drought changes in the twenty-first century under a low–moderate emissions scenario. *Journal of climate*, **28**, 4490–4512.
- Zhou S.R., Duursma A., Medlyn B.E., Kelly J.W.G., Prentice I.C. (2013) How should we model plant responses to drought? An analysis of stomatal and non-stomatal responses to water stress. *Agric. Forest Meteorology*, **182**, 204–214.