

doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2019.03.089>

УДК 581.1

**Ю.В. Карпець¹, Ю.Є. Колупаєв^{1,2}, Т.О. Ястреб¹,
О.І. Горєлова¹, М.А. Шклярєвський¹, О.П. Дмитрієв³**

¹ Харківський національний аграрний університет ім. В.В. Докучаєва

² Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна

³ Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ

E-mail: plant_biology@ukr.net

Роль активних форм кисню та азоту в індукуванні теплостійкості проростків пшениці екзогенним сірководнем

Представлено членом-кореспондентом НАН України О.П. Дмитрієвим

Вивчено вплив донора сірководню (H_2S) гідросульфиду натрію ($NaHS$) на теплостійкість проростків пшениці і можливу участь H_2O_2 і NO як посередників у реалізації стрес-протекторних ефектів H_2S . Показано, що обробка проростків $NaHS$ підвищує їх виживаність після ушкоджувального прогріву. Протягом перших чотирьох годин від початку дії донора H_2S у коренях відзначено підвищення вмісту H_2O_2 та NO . Обробка проростків антиоксидантом диметилтіосечовиною (ДМТС), інгібітором НАДФН-оксидази імідазолом, а також антагоністами NO усувала стрес-протекторний ефект донора H_2S . При цьому антагоністи NO лише частково перешкоджали зростанню вмісту H_2O_2 в коренях за умов їх обробки $NaHS$, а ДМТС та імідазол практично повністю нівелювали спричинюване донором H_2S підвищення вмісту NO . Результати вказують на важливість попереднього накопичення H_2O_2 у зростанні вмісту NO під дією сірководню та участь обох сигнальних молекул у реалізації його стрес-протекторних ефектів.

Ключові слова: сірководень, оксид азоту, пероксид водню, сигнальні посередники, теплостійкість, *Triticum aestivum*.

Сірководень (H_2S), незважаючи на свою токсичність, нині визнаний однією з важливих малих молекул, здатних проникати крізь гідрофобні біомембрани, та задіяних у передачі клітинних сигналів [1]. З'являється все більше відомостей про його роль у сигнальних мережах не тільки тваринних, а й рослинних клітин. Проте уявлення про сигнальні функції сірководню у рослин сформувалися далеко не повністю [2]. Зокрема, відсутність класичного рецептора сірководню ускладнює розуміння його участі в клітинному сигналінгу [1].

Встановлено, що одним із механізмів дії сірководню як сигнальної молекули є сульфгідратация білків [3]. Також сірководень здатний прямо і опосередковано впливати на реалізацію сигнального потенціалу АФК і NO . В експериментах з рослинами люцерни показано зняття позитивного впливу донора сірководню гідросульфиду натрію ($NaHS$) на солестійкість рослин і експресію генів антиоксидантних ферментів обробкою скевенджером NO

© Ю.В. Карпець, Ю.Є. Колупаєв, Т.О. Ястреб, О.І. Горєлова, М.А. Шклярєвський, О.П. Дмитрієв, 2019

ISSN 1025-6415. Допов. Нац. акад. наук Укр. 2019. № 3

89

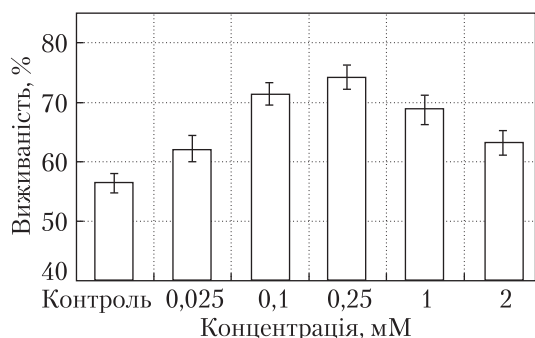


Рис. 1. Концентраційна залежність впливу донора сірководню NaHS на виживаність (%) проростків пшениці після ушкоджувального прогріву (45 °С, 10 хв)

2-феніл-4,4,5,5-тетраметилімідазолін-1-оксил-3-оксидом (2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (PTIO)) [4]. Після обробки проростків гороху NaHS їх стійкість до токсичної дії миш'яку підвищувалася, при цьому відзначалося збільшення вмісту NO [5]. Таким чином,

NO може бути посередником у трансдукції сигналу сірководню в генетичний апарат рослинної клітини. Водночас у разі індукування теплостійкості проростків кукурудзи донором NO нітропрусидом натрію (НПН) відзначали збільшення ендogenous вмісту H₂S [6]. При цьому інгібітори синтезу сірководню і його скевенджери нівелювали цей ефект. З іншого боку, зв'язок між сірководнем і оксидом азоту виявився не тільки позитивним, а й негативним [2]. Як оксид азоту, так і сірководень можуть безпосередньо взаємодіяти з АФК, що може призводити до модуляції їх сигналів. Зрештою, можлива зміна стану спільних мішеней NO, H₂S і АФК за рахунок реакцій S-нітрозилування, S-сульфгідратації й окиснення тіолів АФК [1].

Раніше було встановлено значення кальціезалежного посилення генерації АФК в індукованні теплостійкості рослинних клітин донором сірководню [7].

Ми ставили за мету з'ясувати значення пероксиду водню і оксиду азоту та їх функціональної взаємодії в індукованні теплостійкості проростків пшениці донором сірководню.

Матеріали і методи. Насіння пшениці озимої м'якої (*Triticum aestivum* L.) сорту Досконала знезаражували 6 % H₂O₂ протягом 30 хв і пророщували в темряві при 20 °С впродовж 4 діб. Після цього в середовище інкубації проростків додавали донор сірководню NaHS у кінцевих концентраціях діапазону 0,025–2,00 мМ та інкубували на ньому проростки протягом доби.

Під час інкубації визначали вміст H₂O₂ та NO в коренях, а після її закінчення проростки піддавали ушкоджувальному прогріву у водяному ультратермостаті при 45 °С протягом 10 хв. Після цього їх переносили на очищену водопровідну воду та витримували протягом 3 діб при 20–22 °С і освітленні 6000 лк для оцінки виживаності.

Для дослідження впливу антиоксидантів і антагоністів NO на теплостійкість проростків та вміст H₂O₂ і NO у середовище інкубації проростків за 2 год до додавання у нього донора сірководню вносили диметилтіосечовину (ДМТС) у кінцевій концентрації 0,15 мМ, імідазол (0,01 мМ), РТІО (0,2 мМ), N^G-нітро-L-аргінін-метиловий ефір (L-NAME, 5 мМ), вольфрамат натрію (5 мМ). Концентрації цих сполук, що максимально модифікували ефекти донора сірководню, але при цьому не виявляли помітного токсичного впливу на проростки, вибирали за результатами попередніх дослідів.

Вміст H₂O₂ і NO у разі обробки проростків NaHS визначали в коренях, оскільки, як було показано раніше, вони більш чутливі до зовнішніх впливів порівняно з пагонами [8]. Вміст H₂O₂ визначали феротіоціанатним методом [9]. Кількість NO оцінювали з використанням реактиву Грісса [8].

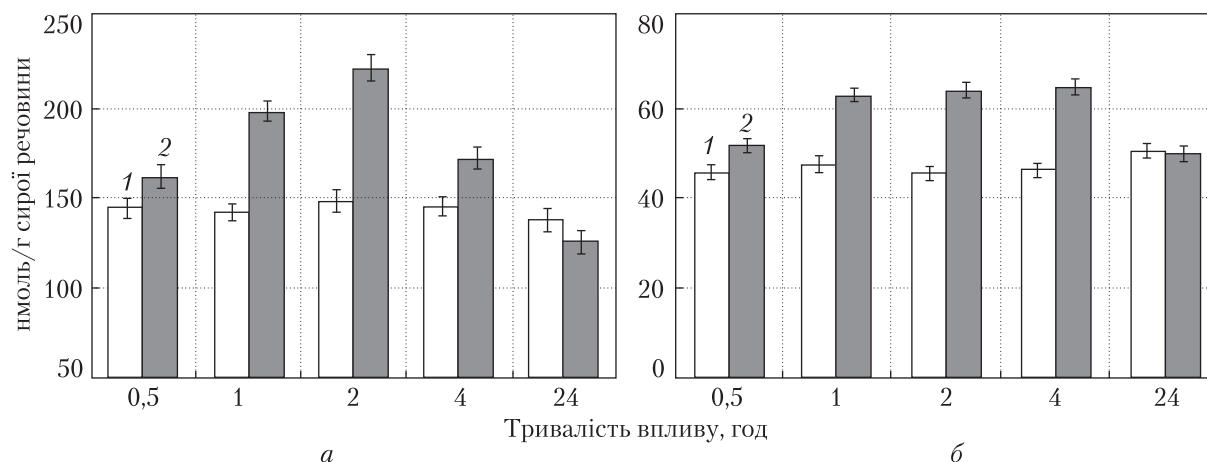


Рис. 2. Вміст перексиду водню (*a*) і оксиду азоту (*б*) у коренях проростків пшениці за умов дії донора сірководню: 1 – контроль; 2 – NaHS (0,25 мМ)

На рисунках наведені середні величини та їх стандартні похибки. Достовірність різниці результатів експериментів оцінювали з використанням *t*-критерію Стьюдента. Крім випадків, відзначених окремо, обговорюються результати, достовірні при $P \leq 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення. Інкубація проростків пшениці на розчинах NaHS у концентраціях 0,1; 0,25 і 0,5 мМ сприяла підвищенню їх виживаності після ушкоджувального прогріву. Вищі і нижчі концентрації менш істотно впливали на теплостійкість проростків (рис. 1). Для подальших експериментів використовували NaHS у концентрації 0,25 мМ, яка чинила найбільш помітний позитивний ефект.

Через 1 год після обробки NaHS відзначалося достовірне підвищення вмісту H₂O₂ у коренях (рис. 2, *a*). Максимальні значення спостерігалися через 2 год, після чого вміст H₂O₂ поступово знижувався, досягаючи до 24 год величин контролю.

Підвищення вмісту NO в коренях у разі обробки донором сірководню також було транзиторним. Виражений ефект спостерігався через 1–4 год від початку обробки (див. рис. 2, *б*). Через 24 год експозиції проростків вміст NO в коренях дослідного варіанта не відрізнявся від контролю.

Для з'ясування участі H₂O₂ та NO в процесах індукування екзогенним сірководнем теплостійкості проростків пшениці досліджували вплив скавенджера H₂O₂ ДМТС, інгібітора НАДФН-оксидази імідазолу та антагоністів NO на прояв протекторної дії NaHS.

ДМТС сама по собі підвищувала виживаність проростків пшениці після теплового стресу (рис. 3, *a*), що може бути пов'язано з її антиоксидантним ефектом і захистом біомолекул та мембранних структур від окиснювальних пошкоджень. При цьому, однак, обробка ДМТС зменшувала позитивний вплив донора сірководню на теплостійкість проростків. Позитивний вплив NaHS повністю усувався дією на проростки інгібітора НАДФН-оксидази імідазолу, який сам по собі не впливав на теплостійкість (див. рис. 3, *a*). Такі результати вказують на роль АФК, утворюваних за участі НАДФН-оксидази, у реалізації стрес-протекторної дії донора сірководню на проростки пшениці.

Обробка проростків скавенджером NO РТІО та інгібітором NO-синтази L-NAME сама по собі спричиняла підвищення їх теплостійкості (див. рис. 3, *б*). Подібний ефект був зафік-

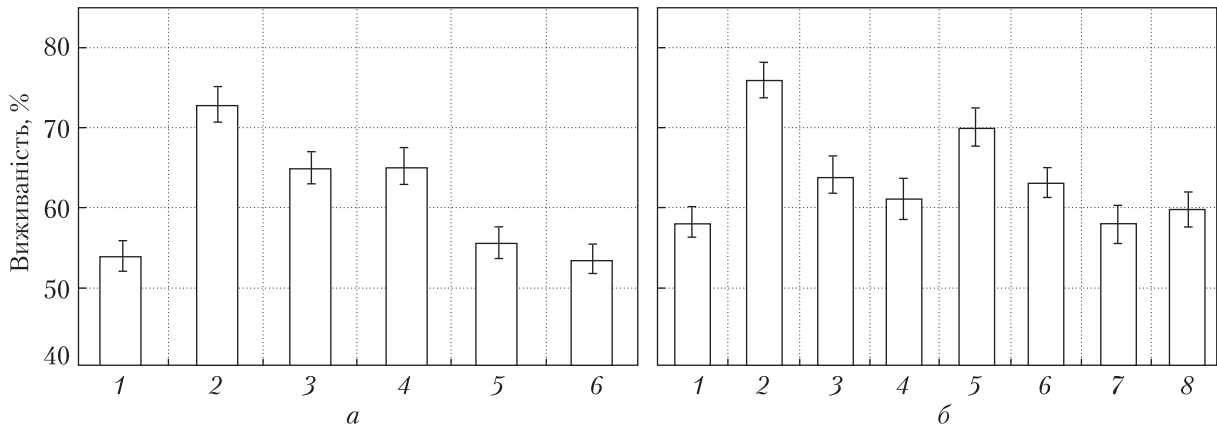


Рис. 3. Вживаність проростків пшениці (%) після ушкоджувального прогріву за умов дії донора сірководню і антагоністів АФК (а) та NO (б). а: 1 – контроль; 2 – NaHS (0,25 мМ); 3 – ДМТС (0,15 мМ); 4 – NaHS (0,25 мМ) + ДМТС (0,15 мМ); 5 – імідазол (0,01 мМ); 6 – NaHS (0,25 мМ) + імідазол (0,01 мМ); б: 1 – контроль; 2 – NaHS (0,25 мМ); 3 – РТІО (0,2 мМ); 4 – NaHS (0,25 мМ) + РТІО (0,2 мМ); 5 – L-NAME (5 мМ); 6 – NaHS (0,25 мМ) + L-NAME (5 мМ); 7 – Na₂WO₄ (5 мМ); 8 – NaHS (0,25 мМ) + Na₂WO₄ (5 мМ)

сований і обговорений нами раніше [10]. Є підстави припускати, що не тільки збільшення вмісту NO в тканинах, а й зниження його кількості під дією відповідних антагоністів може призводити до зміни окиснювально-відновного гомеостазу і формування сигналу, що модифікує теплостійкість проростків [10]. Проте не можна повністю виключити і побічних ефектів РТІО та L-NAME, не пов'язаних зі змінами гомеостазу NO.

Вольфрамат натрію сам по собі істотно не впливав на теплостійкість проростків пшениці. Водночас як скавенджер NO РТІО, так і інгібітори ферментів, що його утворюють, особливо інгібітор нітратредуктази вольфрамат, помітно зменшували позитивний вплив донора сірководню на теплостійкість проростків пшениці (див. рис. 3, б). Отже, в цілому отримані результати вказують на участь як H₂O₂, так і NO в індукованому донором сірководню розвитку теплостійкості проростків пшениці.

Для з'ясування причинно-наслідкових зв'язків між змінами вмісту H₂O₂ і NO в коренях проростків пшениці за умов дії NaHS оцінювали вплив на кількість H₂O₂ скавенджера NO РТІО, інгібітора ферменту, подібного до NO-синтази тварин, L-NAME, та інгібітора нітратредуктази, вольфрамату натрію. Аналізи проводили через 2 год від початку обробки донором сірководню.

Скавенджер H₂O₂ ДМТС знижував його вміст у коренях і нівелював ефект підвищення кількості H₂O₂, спричинюваний донором сірководню (рис. 4, а). Інгібітор НАДФН-оксидази також зменшував вміст АФК у коренях і пригнічував зростання вмісту H₂O₂, зумовлене обробкою донором сірководню. Це вказує на роль НАДФН-оксидази як джерела АФК за умов дії сірководню на проростки.

Антагоністи NO самі по собі достовірно не впливали на вміст H₂O₂ у коренях проростків пшениці (див. рис. 4, а). Водночас виявилось, що обробка РТІО лише частково перешкоджала зростанню вмісту H₂O₂ в коренях за умов дії на них NaHS. У присутності L-NAME вміст H₂O₂ у коренях проростків, оброблених донором сірководню, майже не відрізнявся

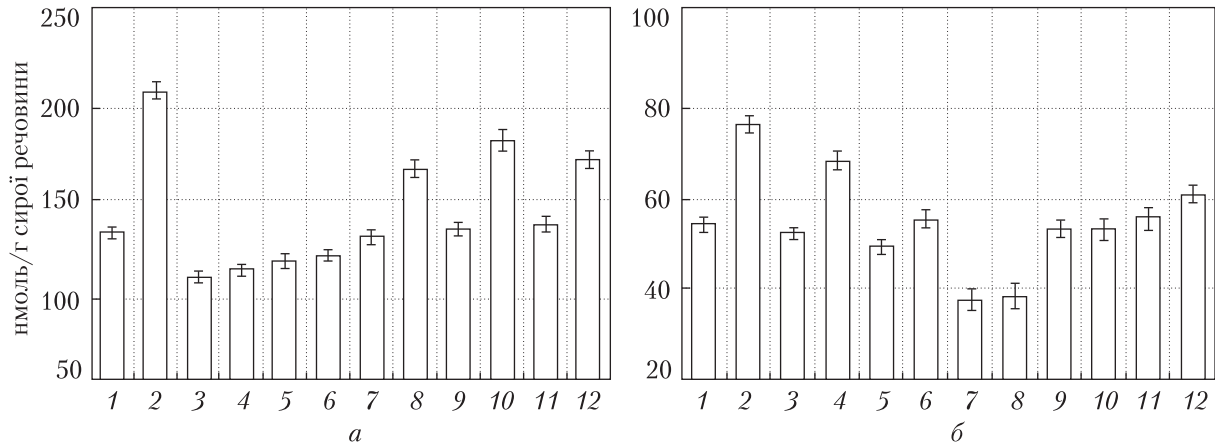


Рис. 4. Вміст пероксиду водню (а) і оксиду азоту (б) у коренях проростків пшениці за умов дії NaHS, антиоксидантів і антагоністів NO. а: 1 – контроль; 2 – NaHS (0,25 мМ); 3 – ДМТС (0,15 мМ); 4 – NaHS (0,25 мМ) + ДМТС (0,15 мМ); 5 – імідазол (0,01 мМ); 6 – NaHS (0,25 мМ) + імідазол (0,01 мМ); 7 – РТІО (0,2 мМ); 8 – NaHS (0,25 мМ) + РТІО (0,2 мМ); 9 – L-NAME (5 мМ); 10 – NaHS (0,25 мМ) + L-NAME (5 мМ); 11 – Na₂WO₄ (5 мМ); 12 – NaHS (0,25 мМ) + Na₂WO₄ (5 мМ); б: 1 – контроль; 2 – NaHS (0,25 мМ); 3 – L-NAME (5 мМ); 4 – NaHS (0,25 мМ) + L-NAME (5 мМ); 5 – Na₂WO₄ (5 мМ); 6 – NaHS (0,25 мМ) + Na₂WO₄ (5 мМ); 7 – L-NAME (5 мМ) + Na₂WO₄ (5 мМ); 8 – NaHS (0,25 мМ) + L-NAME (5 мМ) + Na₂WO₄ (5 мМ); 9 – ДМТС (0,15 мМ); 10 – NaHS (0,25 мМ) + ДМТС (0,15 мМ); 11 – імідазол (0,01 мМ); 12 – NaHS (0,25 мМ) + імідазол (0,01 мМ)

від величин, що спостерігалися без обробки цим інгібітором. Під впливом інгібітора нітратредуктази вольфрамату натрію відзначалося деяке зниження вмісту H₂O₂ у варіанті з обробкою донором сірководню, але цей ефект не був достовірним при $P \leq 0,05$.

Після обробки проростків інгібітором NO-синтази L-NAME вміст NO у коренях слабо знижувався, дещо помітніший ефект спостерігався під дією вольфрамату натрію (див. рис. 4, б). За умов обробки проростків обома інгібіторами одночасно відзначалося істотне зниження вмісту NO в коренях, що може вказувати на внесок двох шляхів утворення NO в клітинах коренів. У разі поєднання з донором сірководню вольфрамат натрію більшою мірою пригнічував утворення NO порівняно з L-NAME (див. рис. 4, б). Це вказує на більший внесок нітратредуктази в утворення NO за умов дії на корені пшениці донора сірководню. Проте практично повне нівелювання спричинюваного донором сірководню підвищення вмісту NO в коренях відзначалося за умов одночасної дії двох інгібіторів ферментів синтезу NO.

Обробка проростків антиоксидантом ДМТС сама по собі зумовлювала тенденцію до незначного зниження вмісту NO в коренях проростків пшениці. При цьому вона повністю усувала підвищення вмісту NO, спричинюване дією NaHS (див. рис. 4, б). Під впливом імідазолу вміст NO істотно не змінювався, проте після обробки інгібітором НАДФН-оксидази пригнічувалося зростання вмісту NO за умов дії на проростки NaHS (див. рис. 4, б). Ці результати вказують на роль попереднього накопичення H₂O₂ в зростанні вмісту NO за умов дії на проростки донора сірководню.

Як відомо, у рослин існує кілька окиснювальних і відновних шляхів утворення NO, проте практично жоден з них поки що не є остаточно доведеним [11]. За відновним шляхом

NO може утворюватися за участі нітратредуктази та нітрит-NO-редуктази. Ще недавно як один з основних механізмів утворення NO за окиснювальним шляхом пов'язували з активністю ферменту, подібного до NO-синтази тварин [11]. Проте молекулярно-генетичні докази існування цього ферменту у вищих рослин досі не знайдені. Зважаючи на це, нині більш імовірним вважається утворення NO окиснювальним шляхом з поліамінів та гідроксиламіну [12]. Примітно, що поліаміноксидази можуть пригнічуватися L-NAME [13], через що не можна вважати інгібування утворення NO L-NAME доказом участі ферменту, подібного до NO-синтази тварин, у синтезі NO під дією тих чи інших чинників.

В умовах наших експериментів L-NAME лише частково знімав ефект посилення синтезу NO, спричинюваний дією сірководню (див. рис. 4, б). Більш помітне зниження вмісту NO в коренях відбувалося під впливом інгібітора нітратредуктази вольфрамату натрію. Це дає підстави припускати участь нітратредуктази в індукованому сірководнем утворенні NO. Проте для більш однозначних висновків необхідне безпосереднє визначення активності нітратредуктази в коренях. Зауважимо, що раніше була показана наявність активності нітратредуктази в коренях етіольованих проростків пшениці за відсутності екзогенних нітратів [14]. Ймовірно, окиснення нітратредуктазою ендогенних нітратів може бути достатнім для підвищення вмісту NO в коренях пшениці під впливом тих чи інших чинників.

Відомо, що між NO і H_2O_2 відбувається тісна функціональна взаємодія. За умов індукування стрес-протекторних реакцій рослин вони діють кооперативно [8, 15]. В умовах наших експериментів під впливом донора сірководню в коренях пшениці підвищувався вміст як NO, так і H_2O_2 . Причому зміна їх вмісту мала схожу динаміку: кількість обох посередників зростала у перші 1–4 год від початку обробки проростків донором сірководню (див. рис. 2). Водночас результати інгібіторного аналізу вказують на те, що H_2O_2 , ймовірно, розташований вище від NO у сигнальному шляху. Адже антиоксидант та інгібітор НАДФН-оксидази пригнічували спричинюване сірководнем посилення утворення NO повністю, тоді як антагоністи NO слабо впливали на вміст H_2O_2 у коренях (див. рис. 4).

Таким чином, вперше встановлений АФК-залежний синтез NO, переважно за відновним шляхом, який є складовою механізму індукування теплостійкості проростків пшениці за допомогою екзогенного сірководню.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Hancock J.T. Hydrogen sulfide and environmental stresses. *Environ. Exp. Bot.* 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.08.034>
2. Hancock J.T., Whiteman M. Hydrogen sulfide and cell signaling: Team player or referee? *Plant Physiol. Biochem.* 2014. **78**. P. 37–42. doi: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.02.012>
3. Aroca A., Gotor C., Luis C. Romero hydrogen sulfide signaling in plants: emerging roles of protein persulfidation. *Front. Plant Sci.* 2018. **9**. 1369. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01369>
4. Wang Y., Li L., Cui W., Xu S., Shen W., Wang R. Hydrogen sulfide enhances alfalfa (*Medicago sativa*) tolerance against salinity during seed germination by nitric oxide pathway. *Plant Soil.* 2012. **351**, № 1–2. P. 107–119. doi: <https://doi.org/10.1007/s11104-011-0936-2>
5. Singh V.P., Singh S., Kumar J., Prasad S.M. Hydrogen sulfide alleviates toxic effects of arsenate in pea seedlings through up-regulation of the ascorbate-glutathione cycle: possible involvement of nitric oxide. *J. Plant Physiol.* 2015. **181**. P. 20–29. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.03.015>

6. Li Z.G., Yang S.Z., Long W.B., Yang G.X., Shen Z.Z. Hydrogen sulphide may be a novel downstream signal molecule in nitric oxide-induced heat tolerance of maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Plant Cell Environ.* 2013. **36**, № 8. P. 1564–1572. doi: <https://doi.org/10.1111/pce.12092>
7. Kolupaev Yu.E., Firsova, E.N., Yastreb T.O., Lugovaya A.A. The participation of calcium ions and reactive oxygen species in the induction of antioxidant enzymes and heat resistance in plant cells by hydrogen sulfide donor. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2017. **53**, № 5. P. 573–579. doi: <https://doi.org/10.1134/S0003683817050088>
8. Karpets Yu.V., Kolupaev Yu.E., Vayner A.A. Functional interaction between nitric oxide and hydrogen peroxide during formation of wheat seedling induced heat resistance. *Russ. J. Plant Physiol.* 2015. **62**, № 1. P. 65–70. doi: <https://doi.org/10.1134/S1021443714060090>
9. Sagisaka S. The occurrence of peroxide in a perennial plant, *Populus gelrica*. *Plant Physiol.* 1976. **57**, № 2. P. 308–309.
10. Karpets Yu.V., Kolupaev Yu.E., Yastreb T.O., Oboznyi A.I. Effects of NO-status modification, heat hardening, and hydrogen peroxide on the activity of antioxidant enzymes in wheat seedlings. *Russ. J. Plant Physiol.* 2015. **62**, № 3. P. 292–298. doi: <https://doi.org/10.1134/S1021443715030097>
11. Saddhe A.A., Malvankar M.R., Karle S.B., Kumar K. Reactive nitrogen species: paradigms of cellular signaling and regulation of salt stress in plants. *Environ. Exp. Bot.* 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.11.010>
12. da-Silva C.J., Modolo L.V. Hydrogen sulfide: a new endogenous player in an old mechanism of plant tolerance to high salinity. *Acta Bot. Bras.* 2018. **32**, № 1. P. 150–160. doi: <https://doi.org/10.1590/0102-33062017abb0229>
13. Flores T., Todd C.D., Tovar-Mendez A., Dhanoa P.K., Correa-Aragunde N., Hoyos M.E., Brownfield D.M., Mullen R.T., Lamattina L., Polacco J.C. Arginase-negative mutants of *Arabidopsis* exhibit increased nitric oxide signaling in root development. *Plant Physiol.* 2008. **147**. P. 1936–1946. doi: <https://doi.org/10.1104/pp.108.121459>
14. Karpets Yu.V., Kolupaev Yu.E., Lugovaya A.A., Shvidenko N.V., Yastreb T.O. Effects of nitrate and L-arginine on content of nitric oxide and activities of antioxidant enzymes in roots of wheat seedlings and their heat resistance. *Russ. J. Plant Physiol.* 2018. **65**, № 6. P. 908–915. doi: <https://doi.org/10.1134/S1021443718050096>
15. Xu M.J., Dong J.F., Zhang X.B. Signal interaction between nitric oxide and hydrogen peroxide in heat shock induced hypericin production of *Hypericum perforatum* suspension cells. *Sci. China. Ser. C: Life Sci.* 2008. **51**. P. 676–686. doi: <https://doi.org/10.1007/s11427-008-0095-8>

Надійшло до редакції 17.01.2019

REFERENCES

1. Hancock, J. T. (2018). Hydrogen sulfide and environmental stresses. *Environ. Exp. Bot.* doi: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.08.034>
2. Hancock, J. T. & Whiteman, M. (2014). Hydrogen sulfide and cell signaling: Team player or referee? *Plant Physiol. Biochem.*, 78, pp. 37-42. doi: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.02.012>
3. Aroca, A., Gotor, C. & Luis, C. (2018). Romero hydrogen sulfide signaling in plants: emerging roles of protein persulfidation. *Front. Plant Sci.*, 9, 1369. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01369>
4. Wang, Y., Li, L., Cui, W., Xu, S., Shen, W. & Wang, R. (2012). Hydrogen sulfide enhances alfalfa (*Medicago sativa*) tolerance against salinity during seed germination by nitric oxide pathway. *Plant Soil.*, 351, No. 1-2, pp. 107-119. doi: <https://doi.org/10.1007/s11104-011-0936-2>
5. Singh, V. P., Singh, S., Kumar, J. & Prasad, S. M. (2015). Hydrogen sulfide alleviates toxic effects of arsenate in pea seedlings through up-regulation of the ascorbate-glutathione cycle: possible involvement of nitric oxide. *J. Plant Physiol.*, 181, pp. 20-29. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.03.015>
6. Li, Z. G., Yang, S. Z., Long, W. B., Yang, G. X. & Shen, Z. Z. (2013). Hydrogen sulphide may be a novel downstream signal molecule in nitric oxide-induced heat tolerance of maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Plant Cell Environ.*, 36, No. 8. pp. 1564-1572. doi: <https://doi.org/10.1111/pce.12092>
7. Kolupaev, Yu. E., Firsova, E. N., Yastreb, T. O. & Lugovaya, A. A. (2017). The participation of calcium ions and reactive oxygen species in the induction of antioxidant enzymes and heat resistance in plant cells by hydrogen sulfide donor. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 53, No. 5, pp. 573-579. doi: <https://doi.org/10.1134/S0003683817050088>

8. Karpets, Yu. V., Kolupaev, Yu. E. & Vayner, A. A. (2015). Functional interaction between nitric oxide and hydrogen peroxide during formation of wheat seedling induced heat resistance. *Russ. J. Plant Physiol.*, 62, No. 1, pp. 65-70. doi: <https://doi.org/10.1134/S1021443714060090>
9. Sagisaka, S. (1976). The occurrence of peroxide in a perennial plant, *Populus gebrica*. *Plant Physiol.*, 57, No. 2, pp. 308-309.
10. Karpets, Yu. V., Kolupaev, Yu. E., Yastreba, T. O. & Oboznyi, A. I. (2015). Effects of NO-status modification, heat hardening, and hydrogen peroxide on the activity of antioxidant enzymes in wheat seedlings. *Russ. J. Plant Physiol.*, 62, No. 3, pp. 292-298. doi: <https://doi.org/10.1134/S1021443715030097>
11. Saddhe, A. A., Malvankar, M. R., Karle, S. B. & Kumar, K. (2018). Reactive nitrogen species: paradigms of cellular signaling and regulation of salt stress in plants. *Environ. Exp. Bot.*, doi: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.11.010>
12. da-Silva, C. J. & Modolo, L. V. (2018). Hydrogen sulfide: a new endogenous player in an old mechanism of plant tolerance to high salinity. *Acta Bot. Bras.*, 32, No. 1, pp. 150-160. doi: <https://doi.org/10.1590/0102-33062017abb0229>
13. Flores, T., Todd, C. D., Tovar-Mendez, A., Dhanoa, P. K., Correa-Aragunde, N., Hoyos, M. E., Brownfield, D. M., Mullen, R. T., Lamattina, L. & Polacco, J. C. (2008). Arginase-negative mutants of *Arabidopsis* exhibit increased nitric oxide signaling in root development. *Plant Physiol.*, 147, pp. 1936-1946. doi: <https://doi.org/10.1104/pp.108.121459>
14. Karpets, Yu. V., Kolupaev, Yu. E., Lugovaya, A. A., Shvidenko, N. V. & Yastreba, T. O. (2018). Effects of nitrate and L-arginine on content of nitric oxide and activities of antioxidant enzymes in roots of wheat seedlings and their heat resistance. *Russ. J. Plant Physiol.*, 65, No. 6, pp. 908-915. doi: <https://doi.org/10.1134/S1021443718050096>
15. Xu, M. J., Dong, J. F. & Zhang, X. B. (2008). Signal interaction between nitric oxide and hydrogen peroxide in heat shock induced hypericin production of *Hypericum perforatum* suspension cells. *Sci. China. Ser. C: Life Sci.*, 51, pp. 676-686. doi: <https://doi.org/10.1007/s11427-008-0095-8>

Received 17.01.2019

Ю.В. Карпец¹, Ю.Е. Колупаев^{1,2}, Т.О. Ястреб¹,
О.И. Горелова¹, М.А. Шкляревский¹, А.П. Дмитриев³

¹ Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева

² Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

³ Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев

E-mail: plant_biology@ukr.net

РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И АЗОТА ПРИ ИНДУЦИРОВАНИИ ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТИ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ ЭКЗОГЕННЫМ СЕРОВОДОРОДОМ

Исучено влияние донора сероводорода (H_2S) гидросульфида натрия ($NaHS$) на теплоустойчивость проростков пшеницы и возможное участие H_2O_2 и NO в качестве посредников в реализации стресс-протекторных эффектов H_2S . Показано, что обработка проростков $NaHS$ повышает их выживаемость после повреждающего прогрева. В течение первых четырех часов после начала действия донора H_2S в корнях отмечено повышение содержания H_2O_2 и NO . Обработка проростков антиоксидантом диметилтиомочевинной (ДМТМ), ингибитором НАДФН-оксидазы имидазолом, а также антагонистами NO устраняла стресс-протекторный эффект донора H_2S . При этом антагонисты NO лишь частично препятствовали повышению содержания H_2O_2 в корнях при обработке $NaHS$, а ДМТМ и имидазол практически полностью нивелировали вызываемое донором H_2S повышение содержания NO . Результаты указывают на важность предварительного накопления H_2O_2 в увеличении содержания NO при действии сероводорода и участие обоих посредников в реализации его стресс-протекторных эффектов.

Ключевые слова: сероводород, оксид азота, пероксид водорода, сигнальные посредники, теплоустойчивость, *Triticum aestivum*.

Yu.V. Karpets¹, Yu.E. Kolupaev^{1,2}, T.O. Yastreba¹,
O.I. Horielova¹, M.A. Shkliarevskiy¹, O.P. Dmitriev³

¹ Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University

² Karazin Kharkiv National University

³ Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of the NAS of Ukraine, Kiev

E-mail: plant_biology@ukr.net

ROLE OF REACTIVE OXYGEN AND NITROGEN SPECIES
IN THE INDUCTION OF HEAT RESISTANCE OF WHEAT PLANTLETS
BY EXOGENOUS HYDROGEN SULFIDE

The influence of sodium hydrosulfide (NaHS) as a donor of hydrogen sulfide (H₂S) on the heat resistance of wheat plantlets and the possible participation of H₂O₂ and NO as mediators in the realization of stress protective effects of H₂S have been studied. The treatment of plantlets with NaHS increases their survival after the damaging heating. During the first four hours after the beginning of the influence of the H₂S donor, an increase in the content of H₂O₂ and NO in roots is registered. The treatments of plantlets with antioxidant dimethyl thiourea (DMTU), NADPH oxidase inhibitor imidazole, and antagonists of nitric oxide remove the stress protective effect of the H₂S donor. At the same time, antagonists of NO only partially inhibit an increase in the content of H₂O₂ in roots at the NaHS treatment, and DMTU and imidazole almost completely level an increase in the NO content caused by the H₂S donor. The results indicate the importance of the preliminary accumulation of H₂O₂ for an increase of the NO content at the influence of hydrogen sulfide and the participation of both mediators in the realization of its stress protective effects.

Keywords: *hydrogen sulfide, nitric oxide, hydrogen peroxide, signal mediators, heat resistance, Triticum aestivum.*