

УЧАСТЬ СІРКОВОДНЮ У ФОРМУВАННІ ТЕПЛОСТІЙКОСТІ ПРОРОСТКІВ ПШЕНИЦІ ЗА ДІЇ ЗАГАРТУВАЛЬНОЇ ТЕМПЕРАТУРИ

К.М. ГАВВА¹, Ю.Є. КОЛУПАЄВ^{1,2,1}, М.А. ШКЛЯРЕВСЬКИЙ¹, О.І. КОКОРЕВ^{1,2}, О.П. ДМИТРІЄВ^{3,2}

¹ Харківський національний аграрний університет ім. В.В. Докучаєва, п/в Докучаєвське-2, Харків, 62483, Україна

² Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України, Харків, Московський пр-т, 142, Харків, 61060, Україна

³ Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, вул. Академіка Заболотного, 148, Київ, 03143, Україна

E-mail: plant_biology@ukr.net¹, dmitriev.ap@gmail.com²

Роль сірководню (H_2S) як сигнального посередника-газотрансмітера у терморезистентності рослинних клітин залишається малодослідженою. Вивчали участь ендogenous сірководню у формуванні теплостійкості проростків пшениці (*Triticum aestivum* L.), спричинюваному короткочасною дією високої температури. Після одноквилинного впливу температури $42\text{ }^\circ\text{C}$ у коренях проростків пшениці відзначалося транзиторне зростання вмісту сірководню з максимумом через 1,5 год після прогріву. При цьому через 24 год після дії високої температури вміст H_2S у коренях знижувався до рівня контролю. Спричинюваний дією загартувальної температури ефект зростання вмісту сірководню не проявлявся за обробки проростків його скавенджером гіпотаурином та інгібітором L-цистеїндесульфідрази пірватом натрію. Загартувальний прогрів проростків викликав швидке зростання в їх коренях активності супероксиддисмутази (СОД) і поступове збільшення активності каталази і гваяколпероксидази. Максимальний ефект підвищення активності цих антиоксидантних ферментів відзначався через 24 год після дії загартувальної температури. Обробка проростків гіпотаурином і пірватом натрію перед загартувальним прогрівом усувала ефект збільшення активності каталази і гваяколпероксидази, але майже не впливала на активність СОД. Ушкоджувальний прогрів проростків ($45\text{ }^\circ\text{C}$, 10 хв) спричиняв підвищення вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) в клітинах коренів і подальшу загибель значної частини проростків. Попередній загартувальний прогрів значно підвищував теплостійкість, зменшуючи інтенсивність ПОЛ і рівень загибелі проростків. При цьому їх обробка скавенджером сірководню гіпотаурином та інгібітором L-цистеїндесульфідрази пірватом натрію значною мірою нівелювала розвиток теплостійкості, спричинюваний загартувальним прогрівом. Зроблено висновок про роль сірководню як сигнального посередника у регуляції антиоксидантної системи і розвитку теплостійкості проростків за дії загартувальної температури.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., сірководень, загартування, теплостійкість, антиоксидантна система.

Вступ. Сірководень (H_2S) поряд з монооксидом азоту (NO) (Krasylenko et al, 2010; Singhal et al, 2021) і монооксидом вуглецю (CO) (He, He, 2016; Wang, Liao, 2016) належить до ключових молекул-газотрансмітерів, що беруть участь у трансдукції сигналів у тваринних і рослинних клітинах (Kolupaev et al, 2019b; Yao et al, 2019). Сірководень здатний розчинятися в ліпідах і проникати через клітинні мембрани, що є необхідною умовою для виконання ним сигнальних функцій (Aroca et al, 2021). Основним механізмом дії H_2S як сигнальної молекули є посттрансляційна модифікація білків, насамперед персульфидування їх сульфгідрильних груп (Aroca et al, 2017). Дані, отримані методами біоінформатики, вказують, що персульфидування може зазнавати до 5 % протеому рослинної клітини (Cuevasanata et al, 2015).

Нині сірководень розглядається як агент, що бере участь у регуляції багатьох функцій рослинного організму, зокрема, ростових процесів, дозрівання і старіння плодів та адаптації рослин до дії стресорів різної природи (Ziogas et al, 2018). Активація адаптивних реакцій рослин є одним з найбільш яскравих фізіологічних ефектів сірководню (Li et al, 2013, 2015; Shi et al, 2013, 2015). Встановлено, що з участю сірководню відбувається посилення функціонування антиоксидантної, осмопротекторної систем та активація синтезу стресових білків (Li et al, 2014; Bhuyan et al, 2020). Такі реакції важливі при адаптації рослин до дії стресових чинників різної природи.

Нині накопичені відомості щодо залучення сірководню у процеси адаптації рослин до зневоднення (Li et al, 2017; Kolupaev et al, 2019a), засолення (Dar et al, 2021), дії важких

© К.М. ГАВВА, Ю.Є. КОЛУПАЄВ, М.А. ШКЛЯРЕВСЬКИЙ, О.І. КОКОРЕВ, О.П. ДМИТРІЄВ, 2022

металів (Singh, Roychoudhury, 2021), гіпо- і гіпертермії (Shi, 2013; Kolupaev et al, 2017a; Ali et al, 2021). З'ясування участі сигнальних посередників в адаптації рослин до останнього чинника особливо актуальне, оскільки, згідно з прогнозними кліматичними моделями, до кінця 21 століття температура на планеті може збільшитися майже на 4 градуси, що може призвести до зниження глобальної врожайності основних сільськогосподарських культур на 3–8 % (Li et al, 2018).

На різних рослинних об'єктах встановлений позитивний вплив донорів сірководню на стійкість до високих температур. Так, обробка суспензійної культури клітин тютюну NaHS пом'яксувала окиснювальні пошкодження, спричинювані нагріванням (Li et al, 2015). Ефект зменшення окиснювальних пошкоджень проростків кукурудзи за умов гіпертермії виявлений також під впливом повільно діючого донора сірководню GYY4137 (morpholin-4-ium 4 methoxyphenyl(morpholino) phosphinodithionate) (Li et al, 2013). Підвищення теплостійкості ізольованих колеоптилів пшениці під дією донора сірководню NaHS супроводжувалося збільшенням активності ключових антиоксидантних ферментів (Kolupaev et al, 2017a). Одним із механізмів прямого впливу сірководню на редокс-гомеостаз рослинних клітин за стресових умов може бути активація окремих захисних ферментів шляхом персульфидування (Agocha et al, 2020; Liu et al, 2021).

Вказані ефекти досліджувалися шляхом застосування екзогенних донорів сірководню (Li et al, 2013, 2015; Kolupaev et al, 2017a). Значно слабше вивчена роль ендogenous сірководню в адаптації рослин до високих температур. Ефекти підвищення вмісту сірководню в клітинах і органах зареєстровано за відносно тривалої (години, дні) дії помірно високих температур на рослини полуниці (Christou et al, 2014) і тютюну (Chen et al, 2016). Водночас не дослідженою залишається можлива роль H_2S як посередника у підвищенні теплостійкості рослин внаслідок короткочасного впливу ушкоджувальних температур. Феномен зростання теплостійкості рослинних об'єктів після хвилиних і навіть секундних впливів на них високих температур описано досить давно (Aleksandrov, Kislyuk, 1994). Його наявність до-

зволяє використовувати ефекти розвитку теплостійкості рослин після короткочасного нагріву як зручну модель для вивчення участі сигнальних посередників у формуванні терморезистентності (Kolupaev et al, 2013; Karpets et al, 2015).

Мета нашої роботи полягала у встановленні участі ендogenous сірководню у формуванні теплостійкості проростків пшениці під впливом короткочасного прогріву і регуляції їх ферментативної антиоксидантної системи.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження служили етіоловані проростки м'якої пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.) сорту Досконала, вирощені при 20–22 °С на воді, очищеній з використанням системи водопідготовки, що включає в себе фільтр механічного очищення, вугільний фільтр і напівпроникну зворотно-осмотичну мембрану з розміром комірок 1 нм. Тридобові проростки відповідних варіантів досліді на 24 год переносили на розчини скавенжера сірководню гіпотаурину (300 мкМ) (Iqbal et al, 2021) або інгібітору L-цистеїндесульфідрази пірувату натрію (300 мкМ) (Karpets et al, 2020). Концентрації цих сполук, які самі по собі незначно впливали на ріст проростків, їх теплостійкість, але при цьому помітно модифікували ефекти теплового загартування вибирали за результатами попередніх дослідів.

Після обробки досліджуваними сполуками проростки піддавали однохвилинному загартувальному прогріву у водяному ультратермостаті за температури $42,0 \pm 0,1$ °С (Kolupaev et al, 2013). Потім зразки відповідних варіантів витримували на розчинах гіпотаурину або пірувату натрію ще впродовж 3 год і далі інкубували на очищеній воді. Проростки, які не обробляли гіпотаурином або піруватом натрію, весь час інкубували на воді.

Як було встановлено раніше, максимальний розвиток теплостійкості внаслідок короткочасного впливу високої температури відзначався через 24 год (Kolupaev et al, 2013). Зважаючи на це, теплостійкість проростків оцінювали через 24 год після впливу на них загартувальної температури. Для цього зразки піддавали потенційно летальному прогріву у водяному ультратермостаті за температурі $45,0 \pm 0,1$ °С впродовж 10 хв. Через 3 доби після ушкод-

жувального прогріву визначали відносну кількість проростків, що вижили. Такими вважали проростки, що зберігали здатність до росту і не мали значних некрозів.

Для біохімічних аналізів використовували корені інтактних проростків, які чутливі до впливу гіпертермії та зручні для досліджень з використанням інгібіторного аналізу (Kolupaev et al, 2013).

Вміст сірководню в коренях визначали за реакцією з 5,5'-дітіобіс-2-нітробензойною кислотою, як описано у роботі Li і співавт. (2014) з незначними модифікаціями (Karpets et al, 2020).

Для визначення активності антиоксидантних ферментів наважки коренів гомогенізували за температури 2–4 °С в 0,15 М К,Na-фосфатному буфері (рН 7,6) з додаванням ЕДТА (0,1 мМ) та дитіотреїтолу (1 мМ) (Karpets et al, 2015). Для аналізу використовували супернатант після центрифугування гомогенату при 8000 g впродовж 10 хв при 4 °С. Активність цитозольної СОД (КФ 1.15.1.1) визначали при рН реакційної суміші 7,6, використовуючи метод, в основі якого здатність ферменту конкурувати з нітросинім тетразолієм за супероксидні аніони, що утворюються внаслідок аеробної взаємодії НАДН і феназинметосульфату. Активність каталази (КФ 1.11.1.6) аналізували при рН реакційної суміші 7,0 за кількістю пероксиду водню, розкладеного за одиницю часу. Активність гваяколпероксидази (КФ 1.11.1.7) визначали, використовуючи як донор водню гваякол, а як субстрат – пероксид водню. З допомогою К, Na-фосфатного буфера рН реакційної суміші доводили до 6,2.

Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), що реагують з 2-тіобарбітуровою кислотою (переважно малонової діальдегід – МДА), визначали за методикою, описаною у роботі Fazlieva і співавт. (2012). Оптичну густину продуктів реакції вимірювали при довжинах хвиль 532 нм (максимум світлопоглинання МДА) та 600 нм (для поправки на неспецифічне світлопоглинання).

Досліди проводили у 4 разовому біологічному повторенні та кожен з них відтворювали незалежно 2–3 рази. На рисунках наведено середні величини та їх стандартні похибки. Крім

окремо відзначених випадків обговорюються відмінності, вірогідні за $P \leq 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення. Однохвилинний вплив на проростки загартувальної температури (42 °С) спричинював зростання вмісту сірководню у тканинах коренів (рис. 1). Помітний ефект відзначався уже через 15 хв після прогріву, а через 1,5 год він був максимальним, після чого кількість H_2S в коренях знижувалася, через 24 год після прогріву цей показник не відрізнявся від контролю. Таким чином, зростання вмісту сірководню після загартувального прогріву проростків було транзиторним.

За попередньої обробки скавенджером сірководню гіпотаурином вміст ендogenous H_2S знижувався, а спричинюваний загартувальним прогрівом ефект його підвищення не проявлявся (рис. 2). Обробка коренів піруватом натрію – інгібітором L-цистеїндесульфгідрази (ключового ферменту синтезу H_2S) – також спричиняла зниження вмісту сірководню в коренях і повністю усувала його зростання після дії загартувальної температури (рис. 2).

Загартувальний прогрів спричиняє формування сигналу, що активує антиоксидантну та інші стрес-протекторні системи, завдяки чому відбувається розвиток теплостійкості рослинних об'єктів (Kolupaev et al, 2013; Karpets et al, 2015). Екзогенний сірководень також викликає посилення експресії генів і підвищення активності антиоксидантних ферментів у рослин (Christou et al, 2014; Kolupaev et al, 2017a; Ali et al, 2021). Зважаючи на це, досліджували динаміку активності ключових антиоксидантних ферментів у коренях проростків пшениці і вплив антагоністів сірководню на стан антиоксидантної системи.

Уже через 1,5 год після загартувального прогріву відзначалося підвищення активності СОД у коренях (таблиця). Ще більш помітно активність СОД відрізнялася від контролю через 24 год після дії загартування. Активність каталази через 1,5 і 3 год після однохвилинного загартування не відрізнялася від контролю, проте, через 24 год помітно перевищувала його (таблиця). Активність гваяколпероксидази у перші години після загартувального прогріву також змінювалася слабо, але істотно зростала

через добу після короткочасної дії високої температури (таблиця).

Обробка проростків скавенджером сірководню гіпотаурином спричиняла тенденцію до деякого зростання активності СОД у коренях (рис. 3, а), що може бути зумовлено побічними ефектами цієї сполуки. При цьому за умов загартування гіпотаурин не впливав на величину активності ферменту. Інгібітор L-цистеїндесульфгідрази піруват натрію сам по собі не впливав на активність СОД і не перешкоджав її зростанню, спричинюваному загартуванням (рис. 3, а).

Інакше діяли антагоністи сірководню на активність двох інших антиоксидантних ферментів — каталази і гваяколпероксидази — за умов загартування проростків. Обробка коренів гіпотаурином і піруватом натрію істотно не впливала на активність каталази (рис. 3, б). При цьому як скавенджер H_2S , так і інгібітор його синтезу майже повністю усували ефект підвищення активності каталази, який спостерігався після дії загартовувального прогріву. Так само як і у випадку з каталазою, гіпотаурин і піруват натрію самі по собі не впливали на активність гваяколпероксидази (рис. 3, в). Водночас ці антагоністи сірководню повністю нівелювали спричинюване загартовувальним прогрівом підвищення активності цього ферменту.

Короткочасне теплове загартування зменшувало накопичення продуктів ПОЛ в тканинах коренів, спричинюване дією ушкоджувального прогріву (рис. 4, а). Обробка проростків гіпотаурином і піруватом натрію не впливала на інтенсивність ПОЛ у варіантах без загартування проростків. Водночас скавенджер сірководню гіпотаурин практично повністю усував ефект зменшення інтенсивності ПОЛ в коренях, спричинюваний дією загартування. Під впливом інгібітору L-цистеїндесульфгідрази відзначалося часткове усунення мембранопротекторного впливу теплового загартування на корені проростків (рис. 4, а).

Інтегральним показником теплостійкості проростків є їх виживаність після дії ушкоджувального прогріву. Попереднє загартування проростків значно підвищувало їх виживаність (рис. 4, б). Антагоністи сірководню гіпотаурин і піруват натрію самі по собі істотно не впливали на теплостійкість проростків пше-

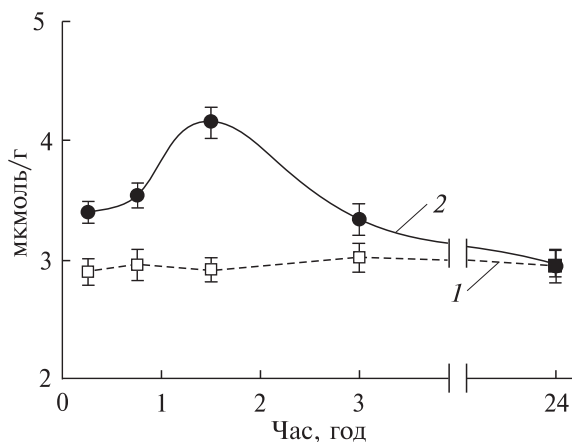


Рис. 1. Динаміка вмісту сірководню в коренях проростків пшениці після дії загартовувальної температури. 1 — контроль; 2 — загартування (42 °C, 1 хв)

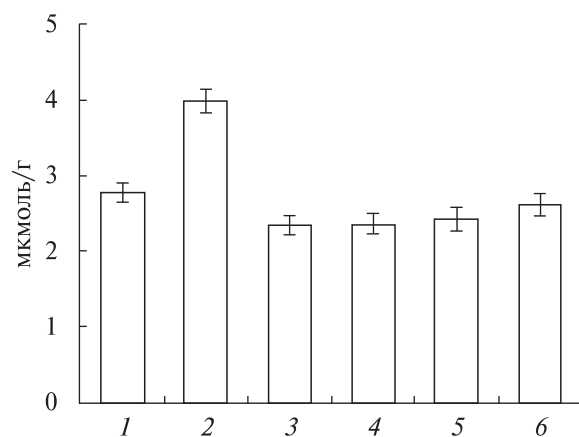


Рис. 2. Модифікація вмісту сірководню у коренях пшениці дією гіпотаурину і пірувату. 1 — контроль; 2 — загартування (42 °C, 1 хв); 3 — гіпотаурин (300 мкМ); 4 — загартування (42 °C, 1 хв) + гіпотаурин (300 мкМ); 5 — піруват натрію (300 мкМ); 6 — загартування (42 °C, 1 хв) + піруват натрію (300 мкМ). Примітка. Вміст сірководню визначали через 1,5 год після загартування проростків. Загальний час інкубації на розчинах гіпотаурину або пірувату натрію становив 27 год (24 год перед загартуванням і 3 год після нього)

ниці, водночас вони помітно зменшували захисну дію попереднього теплового загартування, хоча й не усували її повністю (рис. 4, б).

Загалом отримані результати свідчать про залучення сірководню у реалізацію впливу загартовувальної температури на теплостійкість проростків пшениці. На це вказує транзиторне

зростання вмісту сірководню у тканинах коренів через певний час після дії на них загартувальної температури (рис. 1). Такий ефект не виявлявся за попередньої їх інкубації на середовищі з додаванням інгібітору L-цистеїндисульфгідрази пірувату натрію (рис. 2), що свідчить про основну роль цього ферменту в синтезі H_2S за дії загартувальної температури.

Одним з механізмів захисної дії загартувального прогріву може бути активація антиоксидантної системи. Цілком ймовірно, що до формування сигналу, який спричиняє активацію антиоксидантної системи, причетний сірководень. На це вказує усунення спричинюваного тепловим загартуванням зростання активності каталази і гваяколпероксидази в присутності гіпотаурину або пірувату натрію (рис. 4). Водночас слід відзначити відсутність впливу гіпотаурину і пірувату натрію на активність СОД за умов загартування. Варто зауважити, що активність СОД в тканинах коренів під впливом теплового загартування зростала у часі раніше, ніж активність інших антиоксидантних ферментів – каталази і гваяколпероксидази (таблиця). Як було показано раніше, СОД, як фермент, що перетворює супероксидний аніон-радикал на пероксид водню (стабільну АФК, що виконує сигнальні функції), ймовірно, причетна до формування редокс-сигналів, які забезпечують активацію інших антиоксидантних ферментів (Kolupaev et al,

2013). Не виключено, що активність СОД, як ферменту, що посідає особливе місце в системі редокс-регуляції і редокс-сигналіngu клітин, може змінюватися без участі певних компонентів сигнальної мережі, зокрема, H_2S .

Отримані нами результати дозволяють говорити лише про участь сірководню в регуляції активності каталази і гваяколпероксидази (неспецифічної фенолпероксидази). Механізми такої регуляції можуть бути з'ясовані в спеціальних дослідженнях. Одним з механізмів впливу сірководню на активність антиоксидантних ферментів може бути безпосереднє персульфидування їх тиольних груп, тобто перетворення останніх на персульфідні групи (–SSH) (Filipovic et al, 2018). Наприклад, встановлено, що персульфидування Cys32 в молекулі аскорбатпероксидази (APX1) підвищує її активність (Shivaraj et al, 2020). Щоправда, є відомості про зниження активності каталази внаслідок персульфидування (Corgas et al, 2019). Ймовірно, за умов *in vivo* механізми впливу сірководню на редокс-гомеостаз можуть бути дуже складними. Зокрема, відомо, що вплив H_2S на редокс-гомеостаз може бути пов'язаний зі зміною редокс-стану пероксиредоксинів, які у свою чергу є важливими учасниками клітинної редокс-регуляції (Gruhlke, 2019).

Чимало ефектів сірководню, ймовірно, реалізується за рахунок його функціональної взаємодії з іншими посередниками, насамперед,

Динаміка активності антиоксидантних ферментів у коренях проростків пшениці після 1-хвилинного загартування при 42 °C

Варіант	Час після загартування, год		
	1,5	3	24
<i>СОД, умов. од./ (г сирової речовини · хв)</i>			
Контроль	17,3 ± 0,51	16,9 ± 0,33	17,6 ± 0,40
Загартування (42 °C, 1 хв)	21,6 ± 0,38	22,6 ± 0,61	24,4 ± 0,33
<i>Каталаза, мкмоль H_2O_2/ (г сирової речовини · хв)</i>			
Контроль	699 ± 13	693 ± 14	707 ± 17
Загартування (42 °C, 1 хв)	712 ± 16	702 ± 12	909 ± 14
<i>Пероксидаза, умов. од./ (г сирової речовини · хв)</i>			
Контроль	2,26 ± 0,06	2,31 ± 0,09	2,40 ± 0,08
Загартування (42 °C, 1 хв)	2,37 ± 0,06	2,59 ± 0,07	3,09 ± 0,11

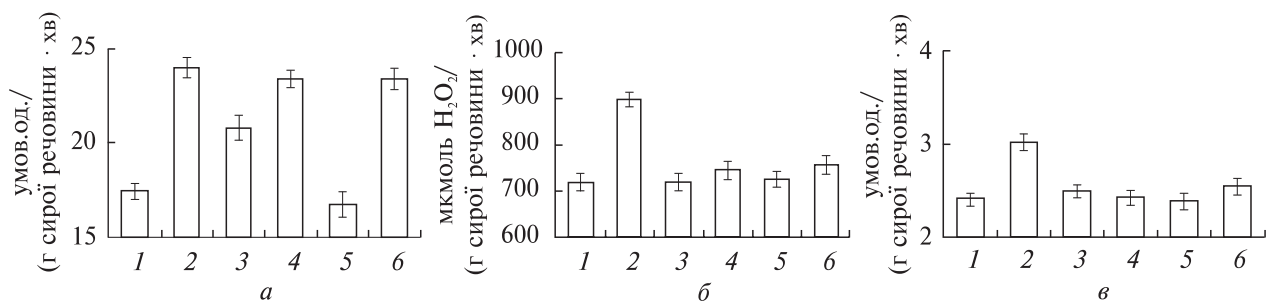


Рис. 3. Вплив загартування та антагоністів сірководню на активність СОД (а), каталази (б) і гваяколпероксидази (в). 1 – контроль; 2 – загартування (42 °С, 1 хв); 3 – гіпотіурин (300 мкМ); 4 – загартування (42 °С, 1 хв) + гіпотіурин (300 мкМ); 5 – піруват натрію (300 мкМ); 6 – загартування (42 °С, 1 хв) + піруват натрію (300 мкМ). Примітка. Активність ферментів визначали через 24 год після загартування проростків. Загальний час інкубації на розчинах гіпотіурину або пірувату натрію становив 27 год (24 год перед загартуванням і 3 год після нього)

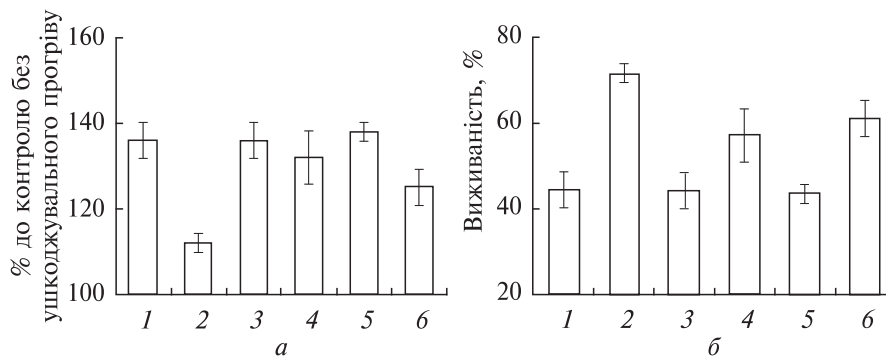


Рис. 4. Вміст МДА у коренях проростків (а) та їх вживаність після ушкоджувального прогріву (45 °С, 10 хв) (б). 1 – контроль; 2 – загартування (42 °С, 1 хв); 3 – гіпотіурин (300 мкМ); 4 – загартування (42 °С, 1 хв) + гіпотіурин (300 мкМ); 5 – піруват натрію (300 мкМ); 6 – загартування (42 °С, 1 хв) + піруват натрію (300 мкМ). Примітка. Вміст МДА визначали через 24 год, а вживаність проростків через 72 год після ушкоджувального прогріву. Загальний час інкубації на розчинах гіпотіурину або пірувату натрію становив 27 год (24 год перед загартуванням і 3 год після нього)

АФК. Напевно H_2S як посередник у сигнальних ланцюгах може бути розташований як до, так і після пероксиду водню. Так, пероксид водню може індукувати синтез сірководню у клітинах рослин. Обробка насіння ятрофи (*Jatropha curcas* L.) пероксидом водню викликала підвищення в проростках активності L-цистеїндесульфгідрази та вмісту сірководню (Li et al, 2012). У рослин арабідопсису також відбувалося посилення експресії L/D-цистеїндесульфгідраз у відповідь на обробку пероксидом водню (Shi et al, 2015). Водночас інгібіторними методами показано, що екзогенний сірководень у клітинах колеоптилів пшениці викликає залежне від НАДФН-оксидази посилення генерації клітинною поверхнею супероксид-

ного аніон-радикала та подальше його перетворення на пероксид водню за допомогою супероксиддисмутази (Kolupaev et al, 2017b). Іншими словами, сірководень може спричинити формування АФК-сигналів.

Сірководень також функціонально пов'язаний з оксидом азоту як сигнальним посередником. Взаємодія між H_2S і NO може бути зумовлена наявністю у них спільних сайтів зв'язування з білковими мішенями, насамперед тіолових груп. Сірководень здатний змінювати стан цих груп шляхом персульфидування, а оксид азоту – шляхом S-нітрузування (Hancock, Neill, 2019; Singh et al, 2020). Також можливе транс-персульфидування або транс-нітрузування тіолових груп (Corpas, Palma,

2020). Ще одним механізмом взаємодії між сірководнем і оксидом азоту є їх вплив на синтез одне одного. У ряді робіт повідомляється про те, що фізіологічні ефекти сірководню можуть бути опосередковані оксидом азоту та навпаки (див., наприклад, огляд: Karpets et al, 2021). Варто зауважити, що на модельному об'єкті, який використовувався нами у даній роботі – коренях інтактних проростків, що піддавалися короткочасному тепловому загартуванню, встановлено, що розвитку теплостійкості передують ефекти функціональної взаємодії АФК і оксиду азоту (Karpets et al, 2015). Напевно поряд з пероксидом водню і NO компонентом сигнальних ланцюгів, задіяних у передачі сигналу гіпертермії в генетичний апарат, а також в безпосередній пост-трансляційній модифікації певних білків, є сірководень. Проте, клітинні механізми його участі у формуванні індукованої теплостійкості рослин ще належить з'ясувати.

Отже, отримані результати дозволяють констатувати участь ендogenous сірководню у формуванні теплостійкості проростків пшениці після короткочасного впливу на них загартувальної температури. Однією із складових такого впливу є модифікація з участю H_2S активності антиоксидантних ферментів, задіяних у захисті клітин коренів від окиснювальних ушкоджень, спричинюваних дією високої температури. При цьому однак варто зауважити, що ймовірно окремі процеси адаптації проростків до гіпертермії можуть відбуватися і без участі сірководню, оскільки спричинюваний загартуванням розвиток теплостійкості і резистентності до окиснювальних пошкоджень хоча й істотно пригнічувався, але не усувався повністю антагоністами сірководню (рис. 4).

Дотримання етичних стандартів. Ця стаття не містить будь-яких досліджень з використанням людей і тварин як об'єктів.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Це дослідження не отримувало будь-якого конкретного гранту від фінансуючих установ у державному, комерційному або некомерційному секторах.

PARTICIPATION OF HYDROGEN SULFIDE IN FORMATION OF HEAT RESISTANCE OF WHEAT

SEEDLINGS UNDER THE ACTION OF HARDENING TEMPERATURE

E.N. Havva, Yu.E. Kolupaev, M.A. Shkliarevskiy, A.I. Kokorev, A.P. Dmitriev

Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University, Kharkiv, Dokuchaevske-2, 62483, Ukraine
Yur'ev Institute of Plant Breeding
National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Moskovskiy Ave., 142, Kharkiv, 61060, Ukraine
Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine, st. Akademika Zabolotnogo, 148, Kyiv, 03143 Ukraine
E-mail: plant_biology@ukr.net, dmitriev.ap@gmail.com

The role of hydrogen sulfide (H_2S) as a signaling mediator-gasotransmitter in the thermoresistance of plant cells remains poorly understood. The participation of endogenous hydrogen sulfide in heat resistance formation of wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.) caused by short-term exposure to high temperatures was studied. After a one-minute exposure to a temperature of 42 °C in wheat seedlings roots, a transient increase in hydrogen sulfide with a maximum of 1.5 h after heating was observed. At the same time, 24 h after exposure to high temperature, the H_2S content in roots decreased to the level of control. The effect of increasing the content of hydrogen sulfide caused by the action of the hardening temperature did not manifest under the treatment of seedlings with scavenger hypotaurine and the inhibitor of L-cysteine desulhydrase sodium pyruvate. The hardening heating of seedlings caused a rapid increase in the activity of superoxide dismutase (SOD) in roots and a gradual increase in the activity of catalase and guaiacol peroxidase. The maximum effect of changing the activity of these antioxidant enzymes was observed 24 h after exposure to hardening temperature. Treatment of seedlings with hypotaurine and sodium pyruvate before hardening heating eliminated the effect of increasing the activity of catalase and guaiacol peroxidase, but almost did not affect the activity of SOD. Damaging heating (45°C, 10 min) of seedlings caused an increase in the content of lipid peroxidation products (LPO) in root cells and the subsequent death of a significant part of seedlings. The preliminary hardening heating significantly increased the heat resistance, decreasing the LPO intensity and the level of seedling death. At the same time, their treatment with the hydrogen sulfide scavenger hypotaurine and the L-cysteine desulhydrase inhibitor sodium pyruvate largely neutralized the development of heat resistance caused by hardening heating. A conclusion was made about the role of hydrogen sulfide as a signaling mediator in the regulation of the antioxidant system and the development of seedlings' heat resistance under the action of a hardening temperature.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Aleksandrov VYa, Kislyuk IM. (1994) Cell response to heat shock Physiological aspect. *Tsitologiya* 36(1):5–59.
- Ali S, Anjum MA, Nawaz A, Naz S, Sardar H, Hasa MU. (2021) Hydrogen sulfide regulates temperature stress in plants. In: Singh S, Singh VP, Tripathi DK (eds), *Hydrogen Sulfide in Plant Biology* Elsevier Inc, pp. 1–24. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85862-5.00003-8>
- Aroca A, Benito JM, Gotor C, Romero LC. (2017) Persulfidation proteome reveals the regulation of protein function by hydrogen sulfide in diverse biological processes in *Arabidopsis* *J Exp Bot* 68(17):4915–4927. doi: <https://doi.org/10.1093/jxb/erx294>
- Aroca A, Gotor C, Bassham DC, Romero LC. (2020) Hydrogen sulfide: from a toxic molecule to a key molecule of cell life *Antioxidants* (Basel) 9(7):621. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00159-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00159-0) 10.3390/antiox9070621
- Aroca A, Zhang J, Xie Y, Romero LC, Gotor C. (2021) Hydrogen sulfide signaling in plant adaptations to adverse conditions: molecular mechanisms *J Exp Bot* 72(16):5893–5904. doi: <https://doi.org/10.1093/jxb/erab239>
- Bhuyan MHMB, Hasanuzzaman M, Parvin K, Mohsin SM, Mahmud JA, Nahar K, Fujita M. (2020) Nitric oxide and hydrogen sulfide: two intimate collaborators regulating plant defense against abiotic stress *Plant Growth Regul* 90:409–424. doi: <https://doi.org/10.1007/s10725-020-00594-4>
- Chen X, Chen Q, Zhang X, Li R, Jia Y, Ef AA, Jia A, Hu L, Hu X. (2016) Hydrogen sulfide mediates nicotine biosynthesis in tobacco (*Nicotiana tabacum*) under high temperature conditions *Plant Physiol Biochem* 104:174–179. doi: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.02.033>
- Christou A, Filippou P, Manganaris G, Fotopoulos V. (2014) Sodium hydrosulfide induces systemic thermotolerance to strawberry plants through transcriptional regulation of heat shock proteins and aquaporin *BMC Plant Biol*. 14:42. doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-42>
- Corpas FJ, Barroso JB, González-Gordo S, Muñoz-Vargas MA, Palma JM. (2019) Hydrogen sulfide (H₂S): a novel component in *Arabidopsis* peroxisomes which triggers catalase inhibition *J Integr Plant Biol* 61:871–883. doi: <https://doi.org/10.1111/jipb.12779>
- Corpas FJ, Palma JM. (2020) H₂S signaling in plants and applications in agriculture *J Adv Res* 24:131–137. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.03.011>
- Cuevasanata E, Lange M, Bonanata J, Coitino EL, Ferrer-Sueta G, Filipovic MR, Alvarez B. (2015) Reaction of hydrogen sulphide with disulfide and sulfenic acid to form the strongly nucleophilic persulfide *J Biol Chem* 290(45):26866–26880. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.672816>
- Dar OI, Singh K, Aslam J, Sharma S, Kaur A, Bhardwaj R, Sharma A. (2021) Regulation of salinity stress by hydrogen sulfide in plants. In: Singh S, Singh VP, Tripathi DK (eds), *Hydrogen Sulfide in Plant Biology* Elsevier Inc, pp. 213–227. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85862-5.00001-4>
- Fazlieva ER, Kiseleva IS, Zhuikova TV. (2012) Antioxidant activity in the leaves of *Melilotus albus* and *Trifolium medium* from man-made disturbed habitats in the Middle Urals under the influence of copper *Russ J Plant Physiol* 59(3):333–338. doi: <https://doi.org/10.1134/S1021443712030065>
- Filipovic MR, Zivanovic J, Alvarez B, Banerjee R. (2018) Chemical biology of H₂S signaling through persulfidation *Chem Rev* 118(3):1253–1337. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00205>
- Gruhlke MC. (2019) Reactive sulfur species a new player in plant physiology? In: Hasanuzzaman M, Fotopoulos V, Nahar K, Fujita M (eds), *Reactive Oxygen, Nitrogen and Sulfur Species in Plants: Production, Metabolism, Signaling and Defense Mechanisms*, vol 2. John Wiley & Sons Ltd, pp. 715–728. doi: <https://doi.org/10.1002/9781119468677.ch31>
- Hancock JT, Neill SJ. (2019) Nitric oxide: its generation and interactions with other reactive signaling compounds. *Plants* 8:41. doi: <https://doi.org/10.3390/plants8020041>
- He H, He L. (2014) The role of carbon monoxide signaling in the responses of plants to abiotic stresses *Nitric Oxide*; 42:40–43. doi: <https://doi.org/10.1016/j.niox.2014.08.011>
- Iqbal N, Fatma M, Gautam H, Umar S, Sofo A, D'ippolito I, Khan NA. (2021) The crosstalk of melatonin and hydrogen sulfide determines photosynthetic performance by regulation of carbohydrate metabolism in wheat under heat stress *Plants* 10:1778. doi: <https://doi.org/10.3390/plants10091778>
- Karpets YuV, Kolupaev YuE, Shkliarevskiy MA. (2021) Functional interaction of hydrogen sulfide with nitric oxide, calcium, and reactive oxygen species under abiotic stress in plants. In: Khan MN, Siddiqui MH, Alamri S, Corpas FJ. (eds) *Hydrogen Sulfide and Plant Acclimation to Abiotic Stresses*. Plant in Challenging Environments, vol 1. Springer, Cham, pp. 31–57. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-030-73678-1_3
- Karpets YuV, Kolupaev YuE, Yastreb TO, Oboznyi AI. (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(3):292–298. doi: <https://doi.org/10.1134/S1021443715030097>
- Karpets YuV, Shkliarevskiy MA, Horielova EI, Kolupaev YuE. (2020) Participation of hydrogen sulfide in induction of antioxidant system in roots of wheat plantlets and their heat resistance by salicylic acid Appl Biochem Microbiol 56(4):467–472. doi: <https://doi.org/10.1134/S0003683820040079>
- Kolupaev YuE, Firsova EN, Yastreb TO, Lugovaya AA. (2017a) 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(5):573–579. doi: <https://doi.org/10.1134/S0003683817050088>
- Kolupaev YuE, Firsova EN, Yastreb TO. (2017b) Induction of plant cells heat resistance by hydrogen sulfide donor is mediated by H₂O₂ generation with participation of NADPH oxidase and superoxide dismutase Ukr Biochem J 89(4):34–42. doi: <https://doi.org/10.15407/ubj89.04.034>
- Kolupaev YuE, Firsova EN, Yastreb TO, Ryabchun NI, Kirichenko VV. (2019a) Effect of hydrogen sulfide donor on antioxidant state of wheat plants and their resistance to soil drought Russ J Plant Physiol 66(1):59–66. doi: <https://doi.org/10.1134/S1021443719010084>
- Kolupaev YuE, Karpets YuV, Beschasiy SP, Dmitriev AP. (2019b) Gasotransmitters and their role in adaptive reactions of plant cells Cytol Genet 53(5):392–406. doi: <https://doi.org/10.3103/S0095452719050098>
- Kolupaev YE, Oboznyi AI, Shvidenko NV. (2013) Role of hydrogen peroxide in generation of a signal inducing heat tolerance of wheat seedlings Russ J Plant Physiol 60(2):227–234. doi: <https://doi.org/10.1134/S102144371302012X>
- Krasylenko YA, Yemets AI, Blume YB. (2010) Functional role of nitric oxide in plants. Russ J Plant Physiol 57(4):451–461. doi: <https://doi.org/10.1134/S1021443710040011>
- Li B, Gao K, Ren H, Tang W. (2018) Molecular mechanisms governing plant responses to high temperatures J Integr Plant Biol 60:757–779. doi: <https://doi.org/10.1111/jipb.12701>
- Li H, Li M, Wei X, Zhang X, Xue R, Zhao Y, Zhao H (2017) Transcriptome analysis of drought-responsive genes regulated by hydrogen sulfide in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. Mol Genet Genom 292(5):1091–1110. doi: <https://doi.org/10.1007/s00438-017-1330-4>
- Li ZG, Gong M, Liu P. (2012) Hydrogen sulfide is a mediator in H₂O₂-induced seed germination in *Jatropha curcas* Acta Physiol Plant 34(6):2207–2213. doi: <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1021-z>
- Li ZG, Long WB, Yang SZ, Wang YC, Tang JH, Chen T. (2015) Involvement of sulfhydryl compounds and antioxidant enzymes in H₂S-induced heat tolerance in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) suspension-cultured cells In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant 51:428–437. doi: <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9705-x>
- Li ZG, Luo LJ, Zhu LP (2014) Involvement of trehalose in hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide-induced the acquisition of heat tolerance in maize (*Zea mays* L.) seedlings. Botanical Studies 55:20. doi: <https://doi.org/10.1186/1999-3110-55-20>
- Li ZG, Yang SZ, Long WB, Yang GX, Shen ZZ. (2013) Hydrogen sulfide may be a novel downstream signal molecule in nitric oxide-induced heat tolerance of maize (*Zea mays* L.) seedlings Plant Cell Environ 36(8):1564–1572. doi: <https://doi.org/10.1111/pce.12092>
- Liu H, Wang J, Liu J, Liu T, Xue S. (2021) Hydrogen sulfide (H₂S) signaling in plant development and stress responses. aBIOTECH 2:32–63. doi: <https://doi.org/10.1007/s42994-021-00035-4>
- Shi H, Ye T, Chan Z. (2013) Exogenous application of hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide enhanced multiple abiotic stress tolerance in bermudagrass (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.) Plant Physiol Biochem 71:226–234. doi: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.07.021>
- Shi H, Ye T, Han N, Bian H, Liu X, Chan Z. (2015) Hydrogen sulfide regulates abiotic stress tolerance and biotic stress resistance in *Arabidopsis* J Integr Plant Biol 57(7):628–640. doi: <https://doi.org/10.1111/jipb.12302>
- Shivaraj SM, Vats S, Bhat JA, Dhakte P, Goyal V, Khatri P, Kumawat S, Singh A, Prasad M, Sonah H, Sharma TR, Deshmukh R. (2020) Nitric oxide and hydrogen sulfide crosstalk during heavy metal stress in plants Physiol Plant; 168(2):437–455. doi: <https://doi.org/10.1111/ppl.13028>
- Singh A, Roychoudhury A. (2021) Hydrogen sulfide and redox homeostasis for alleviation of heavy metal stress. In: Khan MN, Siddiqui MH, Alamri S, Corpas FJ. (eds), Hydrogen Sulfide and Plant Acclimation to Abiotic Stresses, Plant in Challenging Environments, vol 1. Springer, Cham, pp. 59–72. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-030-73678-1_4
- Singh S, Kumar V, Kapoor D, Kumar S, Singh S, Dhanjal DS, Datta S, Samuel J, Dey P, Wang S, Prasad R, Singh J. (2020) Revealing on hydrogen sulfide and nitric oxide signals co-ordination for plant growth under stress conditions Physiol Plant

- 168(2):301–317. doi: <https://doi.org/10.1111/ppl.13002>
- Singhal RK, Jatav HS, Aftab T, Pandey S, Mishra UN, Chauhan J, Chand S, Indu, Saha D, Dadarwal BK, Chandra K, Khan MA, Rajput VD, Minkina T, Narayana ES, Sharma MK, Ahmed S. (2021) Roles of nitric oxide in conferring multiple abiotic stress tolerance in plants and crosstalk with other plant growth regulators J Plant Growth Regul doi: <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10446-8>
- Wang M, Liao W. (2016) Carbon monoxide as a signaling molecule in plants Front Plant Sci 7:572. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00572>
- Yao Y, Yang Y, Li C, Huang D, Zhang J, Wang C, Li W, Wang N, Deng Y, Liao W. (2019) Research progress on the functions of gasotransmitters in plant responses to abiotic stresses Plants (Basel) 8(12):605. doi: <https://doi.org/10.3390/plants8120605>
- Ziogas V, Molassiotis A, Fotopoulos V, Tanou G. (2018) Hydrogen sulfide: A potent tool in postharvest fruit biology and possible mechanism of action Front Plant Sci 9:1375. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01375>

Надійшла в редакцію 11.11.21
Після доопрацювання 16.12.21
Прийнята до друку 18.05.22