

УДК 581.1

## ВТОРИЧНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ ПРОРОСТКОВ *SECALE CEREALE* ПРИ ДЕЙСТВИИ ДОНОРА СЕРОВОДОРОДА И ХОЛОДОВОГО ЗАКАЛИВАНИЯ

© 2018 г. Е. И. Горелова<sup>1</sup>, Н. В. Швиденко<sup>1</sup>,  
Н. И. Рябчун<sup>2</sup>, Ю. Е. Колупаев<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева  
(Харьков, Украина)

<sup>2</sup>Институт растениеводства им. В. Я. Юрьева  
Национальной академии аграрных наук Украины  
(Харьков, Украина)

<sup>3</sup>Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина  
(Харьков, Украина)

Сероводород ( $H_2S$ ) ныне рассматривается как один из важных сигнальных посредников, задействованных в адаптации растений к стресс-факторам различной природы. Однако его участие в формировании устойчивости растений к низким температурам остается малоизученным. Исследовали раздельное и совместное влияние холодового закаливания (7 сут при температуре 2-4°C) и обработки донором сероводорода гидросульфидом натрия ( $NaHS$  – 0,1 мМ) на показатели вторичного метаболизма проростков озимой ржи (*Secale cereale* L.). Обработка донором  $H_2S$  повышала морозоустойчивость незакаленных проростков и усиливала положительное влияние закаливания. Под действием экзогенного сероводорода происходило повышение активности фенилаланинаммонийлиазы в незакаленных проростках и усиление эффекта ее увеличения, вызываемого холодовым закаливанием. При обработке гидросульфидом натрия также повышалось общее содержание фенольных соединений и флавоноидов, поглощающих в УФ-В, содержание антоцианов изменялось незначительно. Холодовое закаливание вызывало повышение содержания в проростках фенольных соединений, антоцианов и бесцветных флавоноидов. Обработка донором сероводорода усиливала вызываемое холодом увеличение общего содержания фенольных соединений и флавоноидов, поглощающих в УФ-В. После холодового закаливания происходило снижение содержания в проростках продукта пероксидного окисления липидов малонового диальдегида (МДА), обработка донором  $H_2S$  усиливала этот эффект. Также обработка проростков гидросульфидом натрия снижала накопление МДА в проростках после их 4-часового промораживания при –5°C. Предполагается, что одной из значимых составляющих положительного влияния экзогенного сероводорода на морозоустойчивость проростков ржи является активация вторичного метаболизма и накопление низкомолекулярных соединений, обладающих антиоксидантными свойствами.

**Ключевые слова:** *Secale cereale*, сероводород, фенилаланинаммонийлиаза, фенольные соединения, флавоноиды, пероксидное окисление липидов, морозоустойчивость

Сероводород ( $H_2S$ ) в настоящее время рассматривается в качестве одного из ключе-

вых сигнальных посредников, участвующих в процессах адаптации растений к действию стресс-факторов различной природы: экстремальным температурам, засухе, солевому стрессу, действию тяжелых металлов, УФ-В и пр. (Banerjee et al., 2018; Hancock, 2018). Однако влияние доноров сероводорода на устойчи-

Адрес для корреспонденции: Колупаев Юрий Евгеньевич, Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева, п/о Докучаевское-2, Харьков, 62483, Украина,  
e-mail: plant\_biology@ukr.net

вость растений к некоторым стресс-факторам, в частности к действию отрицательных температур, остается малоизученным (Shi et al., 2013; Колупаев и др., в печати).

Одной из причин повреждения растений при гипотермии является вторичный окислительный стресс, обусловленный повышением вязкости липидов мембран и, как следствие, нарушением функционирования электрон-транспортных цепей в митохондриях и хлоропластах (Пиотровский и др., 2011). В связи с этим важной составляющей защитных систем при действии холода считается антиоксидантная система (Janmohammadi et al., 2012), которая представлена комплексом ферментативных и низкомолекулярных компонентов, находящихся в функциональном взаимодействии друг с другом (Колупаев, 2016).

В ряде работ изучена роль эндогенного сероводорода и его функционального взаимодействия с активными формами кислорода (АФК) в активации ряда стресс-протекторных систем (Ma et al., 2016), в т. ч. антиоксидантной. Так, установлено, что  $H_2S$  во взаимодействии с АФК принимает участие в индуцируемой обезвоживанием активации экспрессии генов ферментов аскорбат-глутатионового цикла (Shan et al., 2018).

Большой объем сведений об индуцировании защитных систем получен при изучении действия на растения экзогенных доноров сероводорода. Во многих работах показано повышение донорами сероводорода активности антиоксидантных ферментов у растений, особенно на фоне действия стресс-факторов (Zhang et al., 2010; Cheng et al., 2013; Li et al., 2014). Наряду с этим выявлено усиление под влиянием сероводорода накопления полифункциональных низкомолекулярных протекторов: сахаров (Shi et al., 2013), пролина (Banerjee et al., 2018), бетаина (Li, Zhu, 2015).

К важным низкомолекулярным протекторам с антиоксидантными свойствами относятся флавоноиды (Khlestkina, 2013). Однако влияние сероводорода на их содержание остается малоизученным. Выявлено некоторое увеличение содержания бесцветных флавоноидов (поглощающих УФ) и антоцианов у растений ячменя при индуцировании их устойчивости к действию УФ-В обработкой донором сероводорода (Li et al., 2016). В наших экспериментах показано существенное (почти двукратное) повышение количества антоцианов под влиянием 0,3 мМ гидросульфида натрия (NaHS) в листьях

растений пшеницы в обычных условиях и при почвенной засухе (Колупаев и др., 2019). Также в условиях засухи под влиянием донора сероводорода отмечалось повышение в листьях содержания флавоноидов, поглощающих в области УФ-В (Колупаев и др., 2019). В плодах бананов при низкотемпературном хранении под влиянием донора сероводорода NaHS выявлено повышение общего содержания фенольных соединений и активности фенилаланинаммоний-лиазы (ФАЛ, КФ 4.3.1.5) (Luo et al., 2015). ФАЛ, превращающая L-фенилаланин в транс-коричную кислоту, являющуюся предшественником большинства вторичных метаболитов, считается стартовым ферментом в процессах синтеза флавоноидов (Khlestkina, 2013).

Растения ржи отличаются от других злаков, в том числе пшеницы, наличием определенного уровня конститутивной морозоустойчивости – способности выживать при умеренном действии отрицательных температур без предварительного закалывания низкими положительными температурами (Колупаев и др., 2015). Антиоксидантная и осмопротекторная системы вида *Secale cereale* (L.) также имеют определенные отличия от других злаков, проявляющиеся в высоком содержании пролина и разнообразных вторичных метаболитов, обладающих высокой антиоксидантной активностью (Колупаев и др., 2016). Однако влияние сероводорода на показатели вторичного метаболизма растений ржи при холодовой адаптации до сих пор не исследованы.

Целью работы было изучение влияния донора  $H_2S$  гидросульфида натрия на активность ФАЛ, содержание вторичных метаболитов в проростках ржи в обычных условиях и при холодном закалывании и связи этих показателей с изменениями базовой и индуцированной морозоустойчивости.

## МЕТОДИКА

В работе использовали этилированные проростки озимой ржи сорта Память Худоерко. Семена в течение 40 мин обеззараживали в 6% растворе пероксида водорода и проращивали в темноте при температуре 20-22°C.

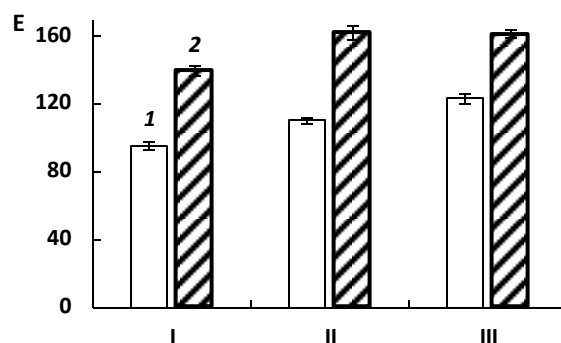
В серии экспериментов по исследованию влияния донора сероводорода на вторичный метаболизм проростков без закалывания гидросульфид натрия в концентрации 0,1 мМ (Колупаев и др., в печати) добавляли в среду в начале проращивания семян и на третьи сутки. Через 4 суток этилированные проростки использовали для биохимических анализов.

В экспериментах по изучению влияния донора сероводорода на развитие морозоустойчивости ржи при закаливании 3-суточные этиолированные проростки обрабатывали 0,1 мМ NaHS и помещали на 7 суток в холодильную камеру (без освещения) с температурой 2-4°C. Через 3 сут закаливания проростки соответствующих вариантов повторно обрабатывали растворами гидросульфида натрия. Контрольные проростки в процессе закаливания инкубировали на очищенной водопроводной воде. Оптимальный режим закаливания был установлен ранее (Колупаев и др., 2015). Для сравнения использовали 4-дневные этиолированные проростки, не подвергавшиеся закаливанию (см. выше). Поскольку при низкой температуре развитие проростков замедлялось, 10-дневные закаленные растения были такими же, как 4-дневные контрольные, выращенные при 20-22°C.

Закаленные образцы подвергали промораживанию в отсутствие света при температурах -5° или -9°C в течение 4 ч, снижая температуру со скоростью 1°C/ч.

Активность ФАЛ определяли по образованию *транс*-коричной кислоты из L-фенилаланина по методике Zucker (1965) с модификациями (Олениченко и др., 2008). Побеги проростков гомогенизировали в 0,1 М боратном буфере (pH 8,8), содержащем 0,5 мМ ЭДТА и 3 мМ дитиотреитол при температуре около 4°C, после чего экстрагировали в течение 30 мин при такой же температуре. Гомогенат центрифугировали при 8000 g в течение 20 мин при 4°C. Супернатант использовали для определения ферментативной активности. Реакционную смесь, состоящую из 0,5 мл супернатанта, 1,5 мл боратного буфера (pH 8,8) и 2 мл 50 мМ L-фенилаланина, инкубировали в термостате в течение 1 ч при 37°C. По окончании инкубации сразу определяли оптическую плотность при 290 нм. Оптическим контролем служила идентичная смесь с ферментной вытяжкой, инактивированной кипячением.

Общее содержание фенольных соединений определяли с помощью реактива Фолина (Запрометов, 1971). Навеску растительного материала (200 мг) растирали в 6 мл 70% этанола, оставляли для экстракции на 20 мин при комнатной температуре, после чего фильтровали. В пробирку вносили 0,5 мл фильтрата, 7 мл дистиллированной воды и 0,5 мл реактива Фолина, перемешивали и через 3 мин добавляли 1 мл 10% карбоната натрия, затем доводили водой до 10 мл. Через 1 ч измеряли оптическую плот-



**Рис. 1. Активность ФАЛ (Е, усл. ед./г сухой массы • мин) в проростках ржи при холодом закаливании и действии донора сероводорода.**

I – без закаливания, II и III – через 4 и 7 сут закаливания при 2-4°C; 1 – контроль, 2 – NaHS (0,1 мМ).

ность раствора при 725 нм относительно набора реактивов без растительного материала. В качестве стандарта использовали хлорогеновую кислоту.

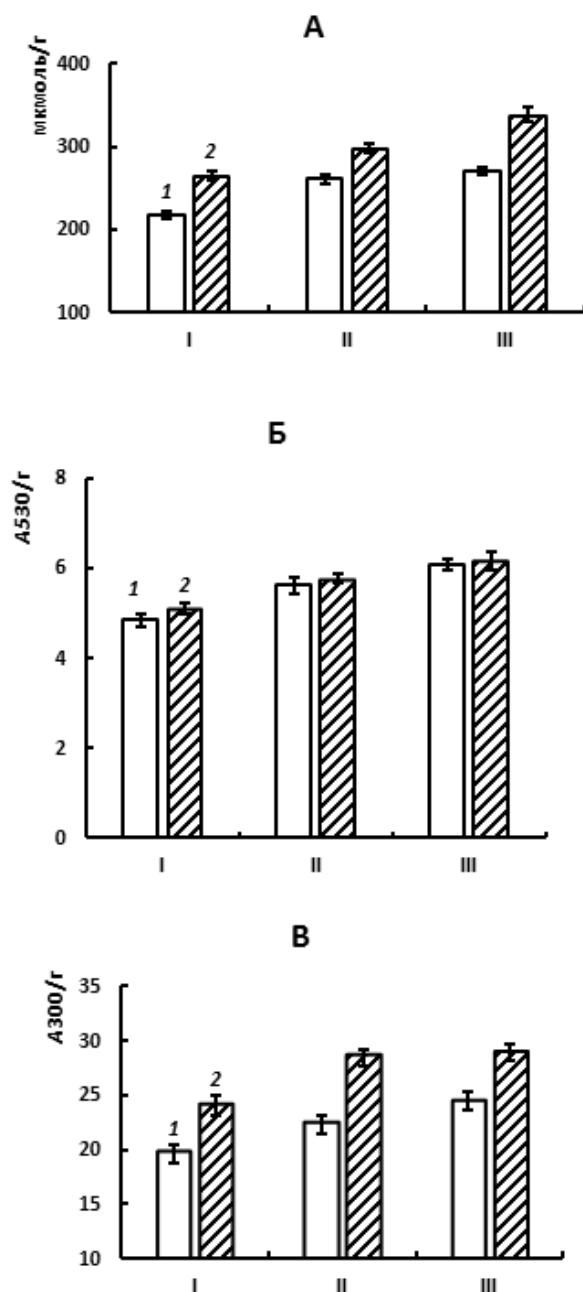
Для определения содержания антоцианов навески побегов (50 мг) гомогенизировали в 10 мл 1% раствора HCl в 80% этаноле. После центрифугирования гомогената при 8000 g в течение 15 мин определяли оптическую плотность супернатанта при длинах волн 300 и 530 нм (Navaux, Kloppstech, 2001).

Интенсивность ПОЛ в тканях проростков определяли по количеству продуктов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (в основном МДА), как описано ранее (Колупаев и др., 2015).

Повторность независимых опытов 3-кратная при 3-кратной биологической повторности в каждом из них. На рисунках приведены средние величины и их стандартные ошибки. Кроме оговоренных случаев, обсуждаются различия, достоверные при  $P \leq 0,05$ .

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

В экспериментах, проведенных нами ранее, было установлено, что предобработка проростков ржи 0,1 мМ NaHS в отсутствие закаливания повышала их выживание после промораживания при -5°C до 55% при соответствующем показателе в контроле около 40% (Колупаев и др., в печати). Закаливание существенно повышало морозоустойчивость проростков. В



**Рис. 2.** Содержание фенольных соединений (мкмоль хлорогеновой кислоты/г сухой массы, А), антоцианов ( $A_{530}$ /г сухой массы, Б) и флавоноидов ( $A_{300}$ /г сухой массы, В) в проростках ржи при холодном закаливании и действии донора сероводорода.

I – без закаливания, II и III – через 4 и 7 сут закаливания при 2-4°C; 1 – контроль, 2 – NaHS (0,1 мМ).

контроле выживание после промораживания при -9°C составило 59%, а в варианте с обработкой 0,1 мМ NaHS – 76% (Колупаев и др., в печати).

Обработка проростков донором сероводорода вызывала повышение в них активности ФАЛ почти в 1,5 раза (рис. 1). В процессе зака-

ливания происходило небольшое, но достоверное повышение активности фермента. При этом обработка проростков NaHS вызывала дополнительное увеличение активности ФАЛ (рис. 1).

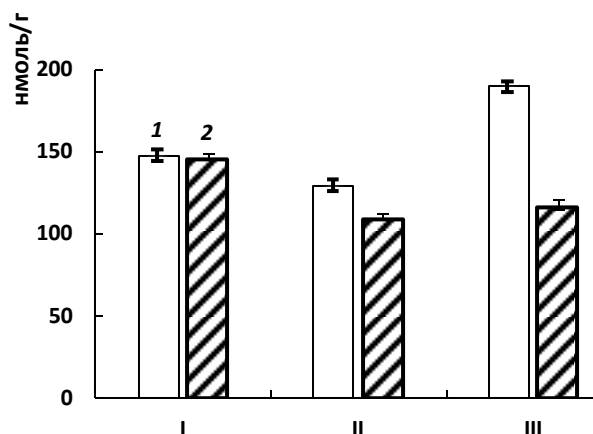
Под влиянием донора сероводорода в проростках ржи, которые инкубировались при обычной температуре, общее содержание фенольных соединений повышалось приблизительно на 22% (рис. 2А). В ходе закаливания также происходило небольшое, но достоверное уже через 4 суток повышение количества фенольных соединений. При обработке проростков гидросульфидом натрия в процессе закаливания происходило заметное увеличение общего содержания фенолов, этот показатель превышал значения контроля (без закаливания и обработки NaHS) почти в 1,6 раза (рис. 2А).

Обработка незакаленных проростков донором  $H_2S$  не оказывала влияния на содержание в них антоцианов (рис. 2Б). При закаливании происходило некоторое увеличение их количества, более заметное на 7-е сутки. В то же время обработка проростков в процессе закаливания донором сероводорода не вызывала заметного дополнительного увеличения в них содержания антоцианов.

Под влиянием обработки гидросульфидом натрия в проростках достоверно увеличивалось содержание бесцветных флавоноидов, поглощающих в области УФ-В (рис. 2В). В процессе холодного закаливания оно также возрастало, более заметно на 7-е сутки. В варианте с обработкой донором сероводорода содержание флавоноидов при закаливании существенно увеличивалось уже на 4-е сутки. В момент окончания закаливания этот показатель превышал значения контроля примерно в 1,5 раза.

Содержание продукта ПОЛ МДА в проростках ржи при обработке донором сероводорода при обычной температуре не изменялось (рис. 3). Под влиянием закаливания количество МДА в проростках несколько снижалось, при этом в варианте с действием NaHS оно было ниже, чем в контроле. Промораживание проростков при -5°C вызывало существенное повышение содержания продукта ПОЛ в контроле, а обработка донором сероводорода снимала этот эффект (рис. 3).

Таким образом, под влиянием обработки донором сероводорода в проростках ржи смягчались проявления окислительных повреждений, вызываемых криострессом. Также под влиянием донора  $H_2S$  происходило повышение



**Рис. 3. Содержание МДА (нмоль/г сухой массы) в проростках ржи при холодовом закаливании и действии донора сероводорода.**

I – без закаливания, II – после закаливания (7 сут при 2-4°C), III – после промораживания закаленных проростков (4 ч при -5°C); 1 – контроль, 2 – NaHS (0,1 мМ).

выживания проростков после промораживания, причем этот эффект проявлялся как на фоне холодового закаливания, так и в обычных условиях (Колупаев и др., в печати).

По крайней мере, одной из причин смягчения экзогенным сероводородом проявлений вызываемого отрицательной температурой окислительного стресса может быть накопление в проростках ржи вторичных метаболитов. В условиях наших экспериментов при обработке NaHS отмечалось повышение активности ФАЛ как в обычных температурных условиях, так и при холодовом закаливании (рис. 1). По-видимому, повышение активности ФАЛ вызывало накопление вторичных метаболитов, что выражалось в повышении общего содержания фенольных соединений и количества флавоноидов, поглощающих в УФ-В (рис. 2).

Можно полагать, что накопление флавоноидных соединений является одним из важных механизмов защитного действия донора сероводорода на растения при стрессах различной природы. Хотя проявление этого эффекта, по-видимому, зависит от особенностей объекта исследования. При хранении корней лотоса (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) при низкой температуре под влиянием донора сероводорода повышались активность ФАЛ и содержание фенольных соединений (Sun et al., 2015). Недавно было показано повышение под действием NaHS общего содержания флавоноидов и количества антоцианов при низкотемпературном хранении плодов боярышника (Aghdama et al., 2018). Как

уже отмечалось, содержание антоцианов увеличивалось у растений пшеницы под влиянием экзогенного сероводорода при адаптации к засухе (Колупаев и др., 2019). Однако в проростках ржи в наших экспериментах, несмотря на повышение под влиянием донора сероводорода общего количества фенольных соединений и бесцветных флавоноидов, существенного увеличения содержания антоцианов не выявлено (рис. 2Б). Возможно, что это обусловлено высоким базовым их содержанием у ржи, превосходящим таковое у пшеницы в несколько раз (Колупаев и др., 2016).

Естественно, что усиление вторичного метаболизма и накопление флавоноидных соединений, по-видимому, далеко не единственный механизм повышения экзогенным сероводородом устойчивости растений к действию стресс-факторов. Сероводород оказывает существенное влияние на различные составляющие антиоксидантной и других стресс-протекторных систем (Banerjee et al., 2018; Hancock, 2018). Например, при индуцировании теплоустойчивости проростков кукурузы донором сероводорода происходило увеличение пула восстановленных аскорбата и глутатиона (Li et al., 2014). Повышение засухоустойчивости растений пшеницы, обработанных донором сероводорода, сопровождалось увеличением активности антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы, пероксидазы и каталазы (Колупаев и др., 2019). Кроме того, обработка растений пшеницы гидросульфидом натрия при засухе увеличивала содержание в листьях пролина, который является не только осмолитом, но и антиоксидантом (Liang et al., 2013). Сообщается, что составляющей стресс-протекторного действия сероводорода может быть и индуцирование экспрессии генов белков теплового шока – БТШ 90, БТШ 80 и БТШ 70, а также аквапоринов (Christou et al., 2014).

Итак, по-видимому, в целом сероводород как компонент сигнальной сети растительных клеток может индуцировать комплекс защитных систем, задействованных в адаптации растений к стрессорам различной природы. В составе этого комплекса важное место занимают вторичные метаболиты. С такими представлениями о действии  $H_2S$  согласуются недавние результаты, полученные с использованием молекулярно-биологических подходов, согласно которым у растений пшеницы сероводород наиболее существенно влиял на экспрессию генов белков, связанных с углеводным обменом, вторичным метаболизмом и синтезом низкомолекулярных антиоксидантов (Ding et al., 2018).

## ЛИТЕРАТУРА

- Запрометов М.Н. 1971. Фенольные соединения и методы их исследования. В кн.: Биохимические методы в физиологии растений. Москва : 185-207. (Zaprometov M.N. 1971. Phenolic compounds and methods of their investigation. In: *Biokhimicheskie metody v fiziologii rastenii* (Biochemical Methods in Plant Physiology). Ed. Pavlinova, O.A. Moscow: 185-207.)
- Колупаев Ю.Е. 2016. Антиоксиданты растительной клетки, их роль в АФК-сигналинге и устойчивости растений. *Успехи соврем. биологии*. 136 (2) : 181-198. (Kolupaev Yu.E. 2016. Plant cell antioxidants and their role in ROS signaling and plant resistance. *Uspekhi Sovrem. Biologii*. 136 (2) : 181-198.)
- Колупаев Ю.Е., Горелова Е.И., Ястреб Т.О., Рябчун Н.И., Кириченко В.В. В печати. Стресс-протекторные реакции проростков пшеницы и ржи при индуцировании устойчивости к низким температурам донором сероводорода. *Физиология растений*. (Kolupaev Yu.E., Horielova E.I., Yastreb T.O., Ryabchun N.I., Kirichenko V.V. Stress-protective reactions of wheat and rye seedlings in inducing resistance to low temperatures by hydrogen sulfide donor. *Russ. J. Plant Physiol. (Fiziologiya Rastenii)*. (in press))
- Колупаев Ю.Е., Рябчун Н.И., Вайнер А.А., Ястреб Т.О., Обозный А.И. 2015. Активность антиоксидантных ферментов и содержание осмолитов в проростках озимых злаков при закаливании и криострессе. *Физиология растений*. 62 (4) : 533-541. (Kolupaev Yu.E., Ryabchun N.I., Vayner A.A., Yastreb T.O., Oboznii A.I. 2015. Antioxidant enzyme activity and osmolyte content in winter cereal seedlings under hardening and cryostress. *Russ. J. Plant Physiol. (Fiziologiya Rastenii)*. 62 (4) : 499-506.)
- Колупаев Ю.Е., Фирсова Е.Н., Ястреб Т.О., Рябчун Н.И., Кириченко В.В. 2019. Влияние донора сероводорода на состояние антиоксидантной системы и устойчивость растений пшеницы к почвенной засухе. *Физиология растений*. 66 (1). (Kolupaev Yu.E., Firsova E.N., Yastreb T.O., Ryabchun N.I., Kirichenko V.V. 2019. Influence of the hydrogen sulfide donor on the state of the antioxidant system and the resistance of wheat plants to soil drought. *Russ. J. Plant Physiol. (Fiziologiya Rastenii)*. 66 (1))
- Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О., Обозный А.И., Рябчун Н.И., Кириченко В.В. 2016. Конститутивная и индуцированная холодом устойчивость проростков ржи и пшеницы к агентам окислительного стресса. *Физиология растений*. 63 (3) : 346-358. (Kolupaev Yu.E., Yastreb T.O., Oboznii A.I., Ryabchun N.I., Kirichenko V.V. 2016. Constitutive and cold-induced resistance of rye and wheat seedlings to oxidative stress. *Russ. J. Plant Physiol. (Fiziologiya Rastenii)*. 63 (3) : 346-358.)
- Олениченко Н.А., Загоскина Н.В., Астахова Н.В., Трунова Т.И., Кузнецов Ю.В. 2008. Первичный и вторичный метаболизм озимой пшеницы при холодовом закаливании и действии антиоксидантов. *Прикл. биохимия и микробиология*. 2008. 44 (5) : 589-594. (Olenichenko N.A., Zagoskina N.V., Astakhova N.V., Trunova T.I., Kuznetsov Yu.V. 2008. Primary and secondary metabolism of winter wheat under cold hardening and treatment with antioxidants. *Appl Biochem Microbiol. (Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya)*. 44 (5) : 535-540.)
- Пиотровский М.С., Шевырева Т.А., Жесткова И.М., Трофимова М.С. 2011. Активация НАДФН-оксидазы плазмалеммы при действии низких положительных температур на этиолированные проростки кукурузы. *Физиология растений*. 58 (2) : 234-242. (Piotrovskii M.S., Shevyreva T.A., Zhestkova I.M., Trofimova M.S. 2011. Activation of plasmalemmal NADPH oxidase in etiolated maize seedlings exposed to chilling temperatures. *Russ. J. Plant Physiol. (Fiziologiya Rastenii)*. 58 (2) : 290-298.)
- Aghdama M.S., Mahmoudi R., Razavi F., Rabiei V., Soleimani A. Hydrogen sulfide treatment confers chilling tolerance in hawthorn fruit during cold storage by triggering endogenous H<sub>2</sub>S accumulation, enhancing antioxidant enzymes activity and promoting phenols accumulation. *Sci Horticult*. 2018; 238: 264-271.
- Banerjee A., Tripathi D.K., Roychoudhury A. 2018. Hydrogen sulphide trapeze: Environmental stress amelioration and phytohormone crosstalk., *Plant Physiol. Biochem.* doi: 10.1016/j.plaphy.2018.08.028.
- Cheng W., Zhang L., Jia, C., Su M., Yang T., Zhou L., Peng R., Wang R., Wang C. 2013. Hydrogen sulfide alleviates hypoxia-induced root tip death in *Pisum sativum*. *Plant Physiol. Biochem.* 70 : 278-286.
- 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.
- Ding H., Han Q., Ma D., Hou J., Huang X., Wang C., Xie Y., Kang G., Guo T. 2018. Characterizing physiological and proteomic analysis of the action of H<sub>2</sub>S to mitigate drought stress in young seedling of wheat. *Plant Mol Biol Rep.* 36 : 45.
- Hancock J.T. 2018. Hydrogen sulfide and environmental stresses. *Environ. Exp. Bot.* doi.org/10.1016/j.envepbot.2018.08.034.
- Havaux M., Kloppstech K. 2001. The protective functions of carotenoid and flavonoids pigments against excess visible radiation at chilling temperature investigated in Arabidopsis npq and tt mutants. *Planta*. 213 : 953-966.
- Janmohammadi M., Enayati V., Sabaghnia N. 2012. Impact of cold acclimation, de-acclimation and re-

## ВТОРИЧНИЙ МЕТАБОЛІЗМ ПРОРОСТКОВ *SECALE CEREALE*

- acclimation on carbohydrate content and antioxidant enzyme activities in spring and winter wheat. *Icel. Agric. Sci.* 25 : 3-11.
- Khlestkina E.K. 2013. The adaptive role of flavonoids: emphasis on cereals. *Cereal Res Commun.* 41 (2) : 185-198.
- Li Z.G., Yi X.Y., Li Y.T. 2014. Effect of pretreatment with hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide on heat tolerance in relation to antioxidant system in maize (*Zea mays*) seedlings. *Biologia.* 69 (8) : 1001-1009.
- Li Q., Wang Z., Zhao Y., Zhang X., Zhang S., Bo L., Wang Y., Ding Y., An L. 2016. Putrescine protects hullless barley from damage due to UV-B stress via H<sub>2</sub>S- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated signaling pathways. *Plant Cell Rep.* 35 : 1155-1168.
- Li Z.G., Zhu L.P. 2015. Hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide-induced accumulation of betaine is involved in the acquisition of heat tolerance in maize seedlings. *Braz. J. Bot.* 38 (1) : 31-38.
- Liang X., Zhang L., Natarajan S.K., Becker D.F. 2013. Proline mechanisms of stress survival. *Antioxid Redox Signal.* 19 (9) : 998-1011.
- Luo Z., Li D., Du R., Mou W. 2015. Hydrogen sulfide alleviates chilling injury of banana fruit by enhance-antioxidant system and proline content. *Sci Horticult.* 183 : 144-151.
- Ma D., Ding H., Wang C., Qin H., Han Q., Hou J., Lu H., Xie Y., Guo T. 2016. Alleviation of drought stress by hydrogen sulfide is partially related to the abscisic acid signaling pathway in wheat. *PLoS One.* 11 : e0163082.
- Shan C., Zhang S., Ou X. 2018. The roles of H<sub>2</sub>S and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in regulating AsA-GSH cycle in the leaves of wheat seedlings under drought stress. *Protoplasma.* doi.org/10.1007/s00709-018-1213-5.
- 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.
- Sun Y., Zhang W., Zeng T., Nie Q., Zhang F., Zhu L. 2015. Hydrogen sulfide inhibits enzymatic browning of fresh-cut lotus root slices by regulating phenolic metabolism. *Food Chemistry.* 177 : 376-381.
- Zhang H., Hu LY., Li P., Hu K.D., Jiang C.X., Luo J.P. 2010. Hydrogen sulfide alleviated chromium toxicity in wheat. *Biol. Plant.* 54 : 743-747.
- Zucker M. Induction of phenylalanine ammonia-lyase in Xanthium leaf disks. Photosynthetic requirement and effect of day length. 1969. *Plant Physiol.* 44 : 912-922.

Поступила в редакцію  
29.09.2018 г.

## SECONDARY METABOLISM IN *SECALE CEREALE* SEEDLINGS AT ACTION OF HYDROGEN SULFIDE DONOR AND COLD HARDENING

E. I. Horielova<sup>1</sup>, N. V. Shvydenko<sup>1</sup>, N. I. Ryabchun<sup>2</sup>, Yu. E. Kolupaev<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>*Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University  
(Kharkiv, Ukraine)*

*E-mail: plant\_biology@ukr.net*

<sup>2</sup>*Yurjev Plant Production Institute  
of National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine  
(Kharkiv, Ukraine)*

<sup>3</sup>*Karazin Kharkiv National University  
(Kharkiv, Ukraine)*

Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) is now considered as one of the important signal mediators involved in plant adaptation to stress factors of various nature. However, its participation in the formation of plant resistance to low temperatures remains poorly understood. The separate and combined effects of cold hardening (7 days at 2-4°C) and treatment with hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide (NaHS – 0.1 mM) on secondary metabolism of winter rye (*Secale cereale* L.) seedlings were investigated. Treatment with the H<sub>2</sub>S donor increased the frost resistance of unhardened seedlings and amplified the positive effect of hardening. Under the action of exogenous hydrogen sulfide, an augmentation of the activity of phenylalanine ammonia-lyase occurred in unhardened seedlings and magnification of the effect of its increase caused by cold hardening. When treated with sodium hydrosulfide, the total content of phenolic compounds and flavonoids absorbing in UV-B also raised, the content of anthocyanins did not change significantly. Cold hardening caused an increase in the content of phenolic compounds, anthocyanins and colorless flavonoids in the seedlings. The hydrogen sulfide donor treatment increased the cold-induced rise in the total content of phenolic compounds and flavo-

noids absorbing in UV-B. After cold hardening, in the seedlings, there was a decrease in the content of the lipid peroxidation product malonic dialdehyde (MDA), treatment with the H<sub>2</sub>S donor enhanced this effect. Also, treatment of seedlings with sodium hydrosulfide reduced the accumulation of MDA in seedlings after their 4-hour freezing at -5°C. It is assumed that one of the significant components of the positive effect of exogenous hydrogen sulfide on the frost resistance of rye seedlings is the activation of secondary metabolism and accumulation of low-molecular-weight compounds with antioxidant properties.

**Key words:** *Secale cereale*, hydrogen sulfide, phenylalanine ammonia-lyase, phenolic compounds, flavonoids, lipid peroxidation, frost resistance

## **ВТОРИННИЙ МЕТАБОЛІЗМ ПРОРОСТКІВ *SECALE CEREALE* ЗА ДІЇ ДОНОРА СІРКОВОДНЮ І ХОЛОДОВОГО ЗАГАРТУВАННЯ**

О. І. Горелова<sup>1</sup>, М. В. Швиденко<sup>1</sup>, Н. І. Рябчун<sup>2</sup>, Ю. Є. Колупаєв<sup>1, 3</sup>

<sup>1</sup>*Харківський національний аграрний університет ім. В.В. Докучаєва  
(Харків, Україна)*

*E-mail: plant\_biology@ukr.net*

<sup>2</sup>*Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва  
Національної академії аграрних наук України  
(Харків, Україна)*

<sup>3</sup>*Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна  
(Харків, Україна)*

Сірководень (H<sub>2</sub>S) нині розглядається як один з важливих сигнальних посередників, задіяних в адаптації рослин до стрес-факторів різної природи. Однак його участь у формуванні стійкості рослин до низьких температур залишається маловивченою. Досліджували роздільний і сумісний вплив холодного загартування (7 дб за температури 2-4° C) та обробки донором сірководню гідросульфідом натрію (NaHS – 0,1 мМ) на показники вторинного метаболізму проростків жита (*Secale cereale* L.). Обробка донором H<sub>2</sub>S підвищувала морозостійкість незагартованих проростків і посилювала позитивний вплив загартування. Під дією екзогенного сірководню відбувалося підвищення активності фенілаланінамонійліази (ФАЛ) у незагартованих проростках і посилення ефекту її збільшення, спричинюваного холодним загартуванням. При обробці гідросульфідом натрію також підвищувався загальний вміст фенольних сполук і флавоноїдів, що поглинають в УФ-В, вміст антоціанів змінювався неістотно. Холодове загартовування викликало підвищення вмісту в проростках фенольних сполук, антоціанів і безбарвних флавоноїдів. Обробка донором сірководню посилювала спричинюване холодом збільшення загального вмісту фенольних сполук і флавоноїдів, що поглинають в УФ-В. Після холодного загартовування відбувалося зниження вмісту в проростках продукту пероксидного окиснення ліпідів малонового діальдегіду (МДА), обробка донором H<sub>2</sub>S посилювала цей ефект. Також обробка проростків гідросульфідом натрію знижувала накопичення МДА в проростках після їх 4-годинного проморожування при -5 ° C. Висловлено припущення, що однією зі значних складових позитивного впливу екзогенного сірководню на морозостійкість проростків жита є активація вторинного метаболізму і накопичення низькомолекулярних сполук, що мають антиоксидантні властивості.

**Ключові слова:** *Secale cereale*, сірководень, фенілаланінамонійліаза, фенольні сполуки, флавоноїди, пероксидне окиснення ліпідів, морозостійкість