

ФІЗІОЛОГІЯ І БІОХІМІЯ РОСЛИН

УДК 581.1

ІНДУКУВАННЯ СОЛЕСТИЙКОСТІ РОСЛИН АРАБІДОПСИСУ ДИКОГО ТИПУ І САЛІЦИЛАТДЕФІЦИТНИХ ТРАНСФОРМАНТІВ *NahG* ДІЄЮ ДОНОРА ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ

© 2019 р. Т. О. Ястреб¹, О. І. Горєлова¹, К. М. Гавва¹,
Ю. Є. Колупаєв^{1,2}, А. І. Дяченко³, О. П. Дмитрієв³

¹Харківський національний аграрний університет ім. В.В. Докучаєва
(Харків, Україна)

²Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна
(Харків, Україна)

³Інститут клітинної біології та генетичної інженерії
Національної академії наук України
(Київ, Україна)

Гідроген сульфід (H₂S) нині розглядається як сигнальна молекула-газотрансмітер, задіяна у багатьох функціях рослинного організму, у тому числі в процесах адаптації до стресових чинників. Проте спектр можливих адаптивних реакцій, індукованих дією H₂S та пов'язаних з солестією, досліджений недостатньо. Гідроген сульфід має функціональні зв'язки зі стресовими фітогормонами, зокрема із саліциловою кислотою. Водночас можлива роль саліцилової кислоти в реалізації фізіологічних (стрес-протекторних) ефектів H₂S залишалася не дослідженою. У роботі вивчали вплив донора Гідроген сульфиду Натрію гідросульфиду (NaHS) на антиоксидантну і осмопротекторну системи та солестієвість рослин *Arabidopsis thaliana* L. дикого типу (Col-0) і саліцилатдефіцитних рослин *NahG*, трансформованих геном бактеріальної саліцилатгідроксилази. Встановлено, що за умов сольового стресу (150 мМ NaCl) трансформанти відрізнялися від рослин дикого типу підвищеною активністю антиоксидантних ферментів та більшим вмістом цукрів. Як у рослин дикого типу, так і у трансформантів *NahG*, оброблених донором Гідроген сульфиду шляхом додавання у живильне середовище 50 мкМ NaHS, при сольовому стресі відзначалося збереження високої активності супероксиддисмутази і каталази, підвищення активності гваяколпероксидази і вмісту цукрів, а також збереження пулу фотосинтетичних пігментів у листках. Рослини обох генотипів, оброблені донором H₂S, за стресових умов відрізнялися меншим вмістом проліну і продукту пероксидного окиснення ліпідів малонового діальдегіду у листках. Зроблено висновок, що індукування екзогенним Гідроген сульфідом протекторних систем, причетних до розвитку солестієвості рослин арабідопсису, може відбуватися без участі саліцилової кислоти.

Ключові слова: *Arabidopsis thaliana*, трансформанти *NahG*, сольовий стрес, Гідроген сульфід, антиоксидантні ферменти, осмоліти

DOI: <https://doi.org/10.35550/vbio2019.02.061>

Гідроген сульфід (H₂S) нині розглядається як важлива молекула-газотрансмітер, що

Адреса для кореспонденції: Колупаєв Юрій Євгенович,
Харківський національний аграрний університет ім. В.В.
Докучаєва, п/в Докучаєвське-2, Харків, 62483, Україна;
e-mail: plant_biology@ukr.net

діє не лише в клітинах ссавців, а й у рослин (Hancock, Whiteman, 2014). Вважається, що Гідроген сульфід може насамперед вступати у взаємодію з сульфгідрильними групами білків, які беруть участь у передачі багатьох клітинних сигналів (Guo et al., 2016). Результатом такої взаємодії є їх S-сульфгідратація (персульфиду-

вання) – перетворення залишків цистеїну –SH на –SSH. Припускають, що ці ефекти можуть бути важливими і для підвищення антиоксидантної здатності тілових пулів (Filipović, Jovanović, 2017).

Ефекти Гідроген сульфїду реалізуються також за його взаємодії з іншими сигнальними посередниками. Зокрема, він бере участь не тільки в регуляції редокс-стану білкових молекул, а й в індукуванні АФК-сигналів (Li et al., 2014), зокрема, шляхом впливу на активність НАДФН-оксидази (Колупаев и др., 2017). Також Гідроген сульфїд здатний прямо і опосередковано впливати на реалізацію сигнального потенціалу Нітроген оксиду (NO). Нітроген оксид може бути посередником у трансдукції сигналу H₂S в генетичний апарат рослинної клітини (Singh et al., 2015). З іншого боку, показаний ефект збільшення ендogenous вмісту H₂S за дії на рослинні об'єкти екзогенного NO (Li et al., 2013).

Є відомості і про участь в сигнальних ефектах Гідроген сульфїду такого універсального внутрішньоклітинного месенджера, як кальцій. Ймовірно, H₂S може відкривати певні кальцеві канали та сприяти надходженню іонів Ca²⁺ в цитозоль (Jin, Pei, 2015; Kolupaev et al., 2019). Кальцій разом з кальмодуліном може виступати як месенджер в трансдукції сигналу H₂S в генетичний апарат. З іншого боку, обробка рослинних клітин екзогенним кальцієм може підсилити утворення в них Гідроген сульфїду (Fang et al., 2014).

В цілому вважається, що Гідроген сульфїд як сигнальний посередник функціонує в тісному зв'язку з кальцієм, АФК і NO. Також H₂S функціонально пов'язаний з рядом стресових фітогормонів. Зокрема, встановлена його участь як посередника в реакції закривання продихів, спричинюваної абсцизовою кислотою (АБК). Вміст H₂S зростає за обробки АБК у проростків пшениці (Ma et al., 2016). Водночас Гідроген сульфїд може посилювати експресію генів, що кодують рецептори АБК (Jin et al., 2013).

Ймовірно, H₂S бере участь і у трансдукції сигналу саліцилової кислоти. За обробки проростків кукурудзи саліциловою кислотою, що спричиняла підвищення вмісту ендogenous H₂S, зростала їх теплостійкість (Li et al., 2015). При поєднанні обробки рослин екзогенними H₂S і саліциловою кислотою спостерігався їх синергічний вплив на активність антиоксидантних ферментів (супероксиддисмутази – СОД, аскорбатпероксидази і гваяколпероксидази), а

також на накопичення проліну, аскорбату і відновленого глутатіону.

З іншого боку, припускають, що деякі фізіологічні ефекти сигнальних посередників реалізуються з участю ендogenous саліцилової кислоти. Зокрема, саліцилова кислота вважається важливим компонентом в трансдукції і ампліфікації сигналів АФК (Quan et al., 2008). Індукування Нітроген оксидом експресії генів, що кодують PR- (pathogenesis-related) білки, залежить від саліцилової кислоти і не відбувається у саліцилатдефіцитних рослин (Kovacs et al., 2015). Водночас відомостей про участь саліцилової кислоти у реалізації фізіологічних ефектів Гідроген сульфїду в літературі поки що немає.

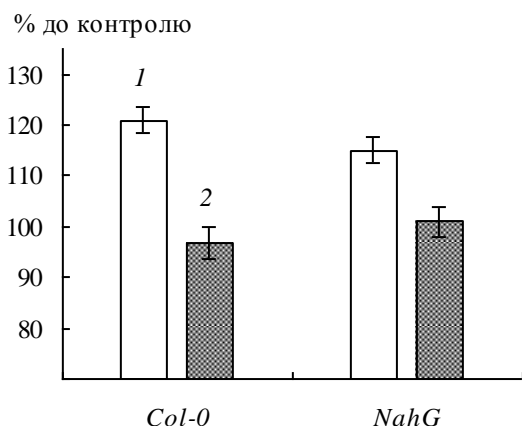
Відомо, що як Гідроген сульфїд, так і саліцилова кислота, здатні індукувати стійкість рослин до стресорів різної природи, зокрема, до засолення. Так, показано, що обробка рослин арабїдопсису донором Гідроген сульфїду NaHS спричиняла підвищення їх виживаності при довготривалому сольовому стресі і збільшення в них активності СОД, глутатіоредуктази та неспецифічної пероксидази (Shi et al., 2015). Також досить давно на рослинах різної таксономічної належності показано підвищення солестійкості і антиоксидантної активності за дії екзогенної саліцилової кислоти (Shakirova et al., 2003; Joseph et al., 2010). З іншого боку, отримано результати, які вказують на здатність рослин адаптуватися до засолення і без участі саліцилової кислоти. Так, показано, що саліцилатдефіцитні рослини арабїдопсису *NahG* при помірному сольовому стресі накопичували менше пероксиду водню і відрізнялися кращою здатністю підтримувати про-/антиоксидантну рівновагу порівняно з рослинами дикого типу (Cao et al., 2009; Ястреб и др., 2017). Таким чином, в цілому питання про можливу роль саліцилової кислоти та її функціональних зв'язків з Гідроген сульфїдом і АФК при адаптації рослин до стресорів, зокрема, до засолення, залишається відкритим.

Основною метою роботи було порівняння впливу донора Гідроген сульфїду Натрію гідросульфїду (NaHS) на функціонування антиоксидантної системи арабїдопсису дикого типу (Col-0) і саліцилатдефіцитних рослин *NahG* за умов сольового стресу.

МЕТОДИКА

В експериментах використовували чотиригнєві рослини *Arabidopsis thaliana* L. дикого типу (Col-0) і трансформовані геном *NahG*, що кодує саліцилатгідроксилазу

ІНДУКУВАННЯ СОЛЕСТІЙКОСТІ РОСЛИН АРАБІДОПСИСУ



Вміст МДА (% до контролю) у листках рослин арабідопсису.

1 – NaCl (150 мМ); 2 – NaCl (150 мМ) + NaHS (50 мкМ)

(КФ 1.14.13.1) у бактерії *Pseudomonas putida*, (Gaffney et al., 1993). Вміст саліцилової кислоти в клітинах трансформантів арабідопсису *NahG* приблизно на порядок нижчий, ніж у рослин дикого типу (He et al., 2014). Насіння рослин *NahG* було люб'язно надано проф. Ж.-М. Нейгаузом (Університет Нашатель, Швейцарія). Рослини вирощували у водній культурі на середовищі Хогланда з модифікаціями (Gibeaut et al., 1997) за температури 24/18°C (день/ніч), освітлення 6000 лк і фотоперіоду 10 год (Ястреб и др., 2015).

Рослини дослідних варіантів обох генотипів обробляли протягом доби донором Гідроген сульфід шляхом додавання у живильне середовище NaHS в кінцевій концентрації 50 мкМ. Оптимальну концентрацію Натрію гідросульфід визначали за результатами попередніх дослідів (результати не наводяться). Після цього рослини впродовж доби піддавали сольовому стресу шляхом перенесення на живильне середовище без NaHS, але з додаванням 150 мкМ NaCl. Надалі рослини усіх варіантів інкубували на звичайному живильному середовищі.

Оразу після закінчення добового впливу сольового стресу у зрілих листках прикореневої розетки визначали активність антиоксидантних ферментів, вміст проліну, цукрів і продукту пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) малонового діальдегіду (МДА). Вміст фотосинтетичних пігментів визначали через дві доби після закінчення впливу на рослини сольового стресу.

Активність антиоксидантних ферментів визначали за методиками, докладно описаними

раніше (Ястреб и др., 2015). Наважки листків гомогенізували на холоді в 0,15 М К, Na-фосфатному буфері (рН 7,6), що містив 0,1% детергент Тритон Х-100, 0,1 мМ ЕДТА і 1 мМ дигітотрейгол. Для аналізу використовували супернатант після центрифугування гомогенату при 8000 g протягом 10 хв при 4°C. Активність супероксиддисмутази (СОД, КФ 1.15.1.1) визначали при рН 7,6, використовуючи метод, що ґрунтується на здатності ферменту конкурувати з нітросинім тетразолієм за супероксидні аніон-радикали, які утворюються внаслідок аеробної взаємодії НАДН і феназинметосульфату. Активність каталази (КФ 1.11.1.6) аналізували при рН 7,0 за кількістю пероксиду водню, розкладеного за одиницю часу. Активність гваяколпероксидази (КФ 1.11.1.7) визначали, використовуючи як донор Гідрогену гваякол, як субстрат – Гідроген пероксид.

Вміст проліну в листках аналізували за методом Bates і співавт. (Bates et al., 1973). Сумарний вміст цукрів в рослинному матеріалі визначали методом Morris-Roe (Zhao et al., 2003) в нашій модифікації (Колупаев и др., 2015). Кількість малонового діальдегіду (МДА) визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою (Фазлиева и др., 2012).

Фотосинтетичні пігменти екстрагували з листків етанолом і визначали їх вміст спектрофотометричним методом (Шльк, 1971).

Досліди проводили в 4-разовому біологічному повторенні і кожен з них незалежно відтворювали двічі. В таблицях і на рисунку наведені середні величини та їх стандартні похибки. Обговорюються відмінності, достовірні при $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ

Помірний вплив сольового стресу на рослини дикого типу спричиняв зниження в листках сумарного вмісту хлорофілів (табл. 1). У трансформантів *NahG* цей ефект був менш помітним. Попередня обробка донором Гідроген сульфід рослин обох генотипів сприяла збереженню пулу хлорофілів після сольового стресу.

Вміст каротиноїдів після дії сольового стресу у рослин обох генотипів також знижувалася (табл. 1). При цьому передобробка рослин NaHS сприяла збереженню у листках вмісту каротиноїдів, близького до значень контролю.

Після впливу NaCl у листках рослин обох генотипів відзначалося відносно невелике, але достовірне при $P \leq 0,05$ підвищення вмісту МДА, що свідчить про ефект помірного окис-

Таблиця 1. Вміст фотосинтетичних пігментів у листках рослин арабідопсису

Варіант	Сумарний вміст хлорофілу (мг/г сухої маси)		Вміст каротиноїдів (мг/г сухої маси)	
	Col-0	<i>NahG</i>	Col-0	<i>NahG</i>
Контроль	13,40 ± 0,12	13,46 ± 0,23	1,36 ± 0,04	1,16 ± 0,02
NaCl (150 мМ)	10,02 ± 0,22	11,71 ± 0,27	1,01 ± 0,03	0,89 ± 0,03
NaCl (150 мМ) + NaHS (50 мкМ)	12,47 ± 0,31	12,75 ± 0,17	1,18 ± 0,03	1,03 ± 0,04

Таблиця 2. Активність антиоксидантних ферментів у листках рослин арабідопсису

Варіант	Col-0	<i>NahG</i>
СОД (умов. од./г сухої маси • хв.)		
Контроль	165,0 ± 6,0	216,0 ± 4,0
NaCl (150 мМ)	76,0 ± 4,2	121,3 ± 3,9
NaCl (150 мМ) + NaHS (50 мкМ)	129,0 ± 4,0	200,6 ± 5,8
Каталаза (ммоль H ₂ O ₂ /г сухої маси • хв.)		
Контроль	40,8 ± 0,9	43,0 ± 1,0
NaCl (150 мМ)	34,1 ± 1,2	47,0 ± 1,4
NaCl (150 мМ) + NaHS (50 мкМ)	40,6 ± 0,8	53,7 ± 1,1
Гваяколпероксидаза (умов. од./г сухої маси • хв.)		
Контроль	335 ± 7	397 ± 9
NaCl (150 мМ)	369 ± 9	628 ± 14
NaCl (150 мМ) + NaHS (50 мкМ)	424 ± 8	719 ± 11

Таблиця 3. Вміст осмолітів у листках рослин арабідопсису

Варіант	Вміст проліну (мкмоль/г сухої маси)		Вміст цукрів (мг/г сухої маси)	
	Col-0	<i>NahG</i>	Col-0	<i>NahG</i>
Контроль	7,73 ± 0,19	10,43 ± 0,33	25,5 ± 0,4	27,7 ± 0,7
NaCl (150 мМ)	21,00 ± 0,50	19,57 ± 0,47	28,1 ± 0,6	37,7 ± 0,9
NaCl (150 мМ) + NaHS (50 мкМ)	15,83 ± 0,73	15,91 ± 0,33	34,3 ± 0,9	39,9 ± 0,7

новального стресу (рисунок). Попередній вплив на рослини донора H₂S повністю усував цей ефект, що вказує на стрес-протекторний ефект Гідроген сульфіді за дії засолення.

Рослини, трансформовані геном саліцилатгідроксилази, відрізнялися підвищеною порівняно з рослинами дикого типу активністю СОД за звичайних умов (табл. 2). Сольовий стрес викликав зниження активності ферменту у рослин обох генотипів. При цьому у трансформантів *NahG* абсолютні величини були вищими, ніж у рослин дикого типу. Попередній вплив на рослини Натрію гідросульфіді сприяв збереженню за умов сольового стресу активності СОД, близької до величин контролю. Більш помітно цей ефект проявлявся у трансформантів *NahG* (табл. 2).

Активність каталази в контролі у рослин генотипу *NahG* була дещо вищою, ніж у рослин дикого типу (табл. 2), але ця відмінність не була достовірною при $P \leq 0,05$. За умов сольового стресу активність ферменту знижувалася у рослин Col-0, а у трансформантів *NahG* мала тенденцію до невеликого підвищення. Під впливом попередньої обробки донором H₂S активність каталази у рослин дикого типу підвищувалася до рівня контролю, а у рослин *NahG* істотно перевищувала його (табл. 2).

Активність гваяколпероксидази за звичайних умов у рослин генотипу *NahG* була вищою, ніж у Col-0 (табл. 2). Сольовий стрес спричиняв підвищення активності ферменту у рослин обох генотипів. При цьому абсолютні значення у трансформантів *NahG* були набагато вищими порівняно з величинами у рослин дикого типу. За попередньої обробки рослин На-

ІНДУКУВАННЯ СОЛЕСТІЙКОСТІ РОСЛИН АРАБІДОПСИСУ

трію гідросульфідом відзначалося підвищення активності гваяколпероксидази, особливо істотно у рослин генотипу *NahG* (табл. 2).

За звичайних умов вміст проліну у листах рослин *NahG* був дещо вищим, ніж у рослин дикого типу (табл. 3). Сольовий стрес спричиняв майже триразове підвищення вмісту проліну у рослин дикого типу і приблизно дворазове у трансформантів *NahG*. За попередньої обробки донором H_2S вміст проліну при сольовому стресі у рослин обох генотипів був нижчим (табл. 3).

За відсутності стресового впливу сумарний вміст цукрів у листках трансформантів *NahG* істотно не відрізнявся від такого у рослин дикого типу (табл. 3). Під впливом сольового стресу цей показник у рослин Col-0 майже не змінювався, а у трансформантів *NahG* зростав. Передстресова обробка Натрію гідросульфідом сприяла підвищенню вмісту цукрів у листках у рослин дикого типу, у рослин генотипу *NahG* виявлялася тенденція до такого ефекту (табл. 3).

ОБГОВОРЕННЯ

Отримані результати свідчать, що саліцилатдефіцитні трансформанти арабідопсису *NahG* мають вищу базову солестійкість порівняно з рослинами дикого типу. Це виявлялося у кращому збереженні пулу фотосинтетичних пігментів після впливу сольового стресу (табл. 1). Такі результати узгоджуються з отриманими нами раніше за умов сильнішого сольового стресу – 200 мМ NaCl (Ястреб и др., 2017). За відсутності стресу рослини *NahG* відрізнялися від рослин Col-0 вищою активністю СОД, гваяколпероксидази і дещо вищим вмістом проліну (табл. 2, 3).

Після сольового стресу у трансформантів *NahG* активність усіх досліджуваних антиоксидантних ферментів була істотно вищою порівняно з такою у рослин дикого типу (табл. 2). Також у рослин *NahG* в стресових умовах відзначався високий вміст цукрів (табл. 3).

Є підстави вважати, що вища стійкість трансформантів *NahG* до сольового стресу, принаймні частково, зумовлена ефективним функціонуванням ферментативної складової антиоксидантної системи. Окремо слід відзначити дуже високу активність гваяколпероксидази у цих рослин. Ймовірною причиною цього може бути характерний для рослин *NahG* підвищений вміст катехолу (van Wees, Glazebrook, 2003), що здатний виступати у ролі відновника при знешкодженні Гідроген пероксиду у перок-

сидазних реакціях. Примітно, що екзогенний катехол чинив позитивний вплив на проростання насіння арабідопсису за умов сольового стресу (Lee et al., 2010). Також підвищена стійкість рослин *NahG* може бути зумовлена більшим вмістом цукрів, що виконують антиоксидантні і осмопротекторні функції (Колупаев, Карпец, 2010).

Обробка рослин арабідопсису донором Гідроген сульфідом перед сольовим стресом підвищувала їх резистентність. Так, у рослин дикого типу, оброблених NaHS, за умов сольового стресу значення активності СОД, каталази і гваяколпероксидази були помітно вищими (табл. 2). Ці результати узгоджуються з даними, отриманими у роботі Shi і співавт. (2015) за умов дії на рослини арабідопсису довготривалого сольового стресу. Іншою складовою позитивного впливу обробки рослин донором Гідроген сульфідом може бути підвищення вмісту цукрів (табл. 3). Слід відзначити, що обробка NaHS перед сольовим стресом спричиняла менше накопичення проліну за умов впливу NaCl. Відомо, що між вмістом проліну та активністю антиоксидантних ферментів можуть проявлятися реципрокні зв'язки (Сошникова и др., 2013). Ймовірно, у рослин, оброблених донором Гідроген сульфідом, гомеостаз підтримувався за рахунок високої активності антиоксидантних ферментів і підвищеного вмісту цукрів, а не проліну.

Реакція рослин дикого типу і саліцилатдефіцитних трансформантів на дію екзогенного Гідроген сульфідом якісно не відрізнялася. Під впливом обробки NaHS солестійкість рослин обох генотипів підвищувалася. Це виявлялося у меншому накопиченні продукту ПОЛ МДА (рисунок) і кращому збереженні пулу фотосинтетичних пігментів (табл. 1) після сольового стресу. Обробка рослин *NahG* донором Гідроген сульфідом спричиняла підвищення активності комплексу антиоксидантних ферментів. При цьому вплив обробки NaHS на активність СОД у рослин *NahG* був навіть більш помітним, ніж відповідний ефект у рослин дикого типу.

Отримані результати вказують на те, що саліцилова кислота, очевидно, не бере безпосередньої участі в процесі індукування солестійкості рослин екзогенним Гідроген сульфідом. Примітно, що солестійкість саліцилатдефіцитних рослин індукувалася також дією донора NO Натрію нітропрусида (Yastreba et al., 2017) і екзогенного Гідроген пероксиду (Ястреб и др., 2017). Екзогенний NO спричиняв у трансформантів *NahG* так само, як і у рослин дикого ти-

пу, підвищення активності СОД, гваяколпероксидази та вмісту цукрів. Під впливом попередньої обробки H_2O_2 у саліцилатдефіцитних рослин так само, як і у рослин дикого типу, підвищувалася активність СОД, каталази і гваяколпероксидази та вміст проліну. Ймовірно, що, незважаючи на свою поліфункціональність (Колупаев, Карпец, 2009), саліцилова кислота не є обов'язковим компонентом в трансдукції сигналів, що індукують розвиток стійкості рослин до дії абіотичних стресорів.

Таким чином, на підставі результатів даної роботи та отриманих нами раніше з використанням саліцилатдефіцитних рослин арабідопсису *NahG* (Ястреб и др., 2017; Yastreb et al., 2017) можна припустити наявність незалежних від саліцилової кислоти механізмів індукування стрес-протекторних систем рослин дією таких екзогенних сигнальних посередників, як NO , H_2O_2 і H_2S .

ЛІТЕРАТУРА

- Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. 2009. Салициловая кислота и устойчивость растений к абитотическим стрессорам. Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. 2 (17) : 19-39.
- Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. 2010. Участие растворимых углеводов и низкомолекулярных соединений азота в адаптивных реакциях растений. Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. 2 (20) : 36-53.
- 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.
- Колупаев Ю.Е., Фирсова Е.Н., Ястреб Т.О., Луговая А.А. 2017. Участие ионов кальция и активных форм кислорода в индуцировании антиоксидантных ферментов и теплоустойчивости растительных клеток донором сероводорода. Прикл. биохимия и микробиол. 53 (5) : 502-509.
- Сошинкова Т.Н., Радюкина Н.Л., Королькова Д.В., Носов А.В. 2013. Пролин и функционирование антиоксидантной системы растений и культивируемых клеток *Thellungiella salsuginea* при окислительном стрессе. Физиология растений. 60 (1) : 47-60.
- Фазлиева Э.Р., Киселева И.С., Жуйкова Т.В. 2012. Антиоксидантная активность листьев *Melilotus albus* и *Trifolium medium* из техногенно нарушенных местообитаний Среднего Урала при действии меди. Физиология растений. 59 (3) : 369-375.
- Шлык А.А. 1971. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев. В кн.: Биохимические методы в физиологии растений. Под ред. О.А. Павлиновой. Москва : 154-170.
- Ястреб Т.О., Колупаев Ю.Е., Луговая А.А., Дмитриев А.П. 2017. Индуцирование пероксидом водорода солеустойчивости саліцилат-дефіцитних трансформантов арабідопсиса *NahG*. Прикл. биохимия и микробиология. 53 (6) : 635-641.
- Ястреб Т.О., Колупаев Ю.Е., Швиденко Н.В., Луговая А.А., Дмитриев А.П. 2015. Реакция растений *Arabidopsis thaliana*, дефектных по жасмонатному сигналингу, на солевой стресс. Прикл. биохимия и микробиология. 51 (4) : 412-416.
- Bates L.S., Walden R.P., Tear G.D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil. 39 : 205-210. doi: org/10.1007/BF00018060
- Cao Y., Zhan Z. W., Xue L. W., Du J. B., Shang J., Xu F., Yuan S., Lin H.H. 2009. Lack of salicylic acid in *Arabidopsis* protects plants against moderate salt stress. Z. Naturforsch. 64 (3-4) : 231-238.
- Fang H.H., Pei Y.X., Tian B.H., Zhang, L.P., Qiao Z.J., Liu Z.Q. 2014. Ca^{2+} participates in H_2S induced Cr^{6+} tolerance in *Setaria italica*. Chin. J. Cell Biol. 36 : 758-765.
- Filipovic M.R., Jovanovic V.M. 2017. More than just an intermediate: hydrogen sulfide signalling in plants. J. Exp. Bot. 68 (17) : 4733-4736. doi: 10.1093/jxb/erx352
- Gaffney T., Friedrich L., Vermooij B., Negrotto D., Nye G., Uknes S., Ward E., Kessmann H., Ryalsm J. 1993. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. Science. 261 : 754-756. doi: 10.1126/science.261.5122.754
- Gibeaut D.M., Hulett J., Cramer G.R., Seemann J.R. 1997. Maximal biomass of *Arabidopsis thaliana* using a simple, low-maintenance hydroponic method and favorable environmental conditions. Plant Physiol. 115 : 317-319. doi: org/10.1104/pp.115.2.317
- Guo H., Xiao T., Zhou H., Xie Y., Shen W. Hydrogen sulfide: a versatile regulator of environmental stress in plants. Acta Physiol. Plant. 2016. 38 : 16. doi: 10.1007/s11738-015-2038-x
- Hancock J.T., Whiteman M. 2014. Hydrogen sulfide and cell signaling: Team player or referee? Plant Physiol. Biochem. 78 : 37-42. Doi: 10.1016/j.plaphy.2014.02.012
- He Q., Zhao S., Ma Q., Zhang Y., Huang L., Li G., Hao L. 2014. Endogenous salicylic acid levels and signaling positively regulate arabidopsis response to polyethylene glycol-simulated drought stress. J. Plant Growth Regul. 33 : 871-880. doi: 10.1007/s00344-014-9438-9
- Jin Z., Xue S., Luo Y., Tian B., Fang H., Li H., Pei Y. 2013. Hydrogen sulfide interacting with abscisic acid in stomatal regulation responses to drought stress in *Arabidopsis*. Plant Physiol. Biochem. 62 : 41-46. doi: 10.1016/j.plaphy.2012.10.017

- Jin Z., Pei Y. 2015. Physiological implications of hydrogen sulfide in plants: pleasant exploration behind its unpleasant odour. *Oxid. Med. Cell Longev.* 397502. doi: 10.1155/2015/397502
- Joseph B., Jini D., Sujatha S. 2010. Insight into the role of exogenous salicylic acid on plants growth under salt environment. *Asian J. Crop Sci.* 2 : 226-235.
- Kolupaev Yu.E., Karpets Yu.V., Yastreb T.O. 2019. Induction of wheat plant resistance to stressors by donors of nitric oxide and hydrogen sulfide. In: *Wheat Production in Changing Environments*. Eds. M. Hasanuzzaman et al. Singapore: Springer Nature Pte Ltd. : 521-556. doi: org/10.1007/978-981-13-6883-7_21
- Kovacs I., Durner J., Lindermayr C. 2015. Crosstalk between nitric oxide and glutathione is required for NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES 1 (NPR1)-dependent defense signaling in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 208 : 860-872. doi: 10.1111/nph.13502
- Lee S., Kim S.-G., Park C.-M. 2010. Salicylic acid promotes seed germination under high salinity by modulating antioxidant activity in *Arabidopsis*. *New Phytol.* 188 : 626-637. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03378.x
- 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. doi: org/10.2478/s11756-014-0396-2
- 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 (8) : 1564-1572. doi: 10.1111/pce.12092
- Li Z.-G. 2015. Synergistic effect of antioxidant system and osmolyte in hydrogen sulfide and salicylic acid crosstalk-induced heat tolerance in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Plant Signal. Behav.* 10 (9) : e1051278. doi: 10.1080/15592324.2015.1051278
- 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 (9) : e0163082. doi: .1371/journal.pone.0163082
- Quan L.-J., Zhang B., Shi W.-W., Li H.-Y. 2008. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *J. Integr. Plant Biol.* 50 (1) : 2-18. doi: 10.1111/j.1744-7909.2007.00599.x
- Shakirova F.M., Sakhabutdinova A.R., Bezrukova M.V., Fatkhutdinova R.A., Fatkhutdinova D.R. 2003. Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. *Plant Sci.* 164 (3) : 317-322. doi: 10.1016/S0168-9452(02)00415-6
- 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: 628-640. doi: 10.1111/jipb.12302
- 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 : 20-29. doi: 10.1016/j.jplph.2015.03.015
- van Wees S.C.M., Glazebrook J. 2003. Loss of non-host resistance of *Arabidopsis NahG* to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* is due to degradation products of salicylic acid. *Plant J.* 33 : 733-742. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01665.x
- Yastreb T.O., Karpets Yu.V., Kolupaev Yu.E., Dmitriev A.P. 2017. Induction of salt tolerance in salicylate-deficient *NahG* *Arabidopsis* transformants using the nitric oxide donor. *Cytol. Genet.* 51 (2) : 134-141. doi: 10.3103/S0095452717020086
- Zhao K., Fan H., Zhou S., Song J. 2003. Study on the salt and drought tolerance of *Suaeda salsa* and *Kalanchoe claigremontiana* under isoosmotic salt and water stress. *Plant Sci.* 165 : 837-844. doi: org/10.1016/S0168-9452(03)00282-6

REFERENCES

- Kolupaev Yu.Ye., Karpets Yu.V. 2009. Salicylic acid and plants resistance to abiotic stressors. *Visn. Hark. nac. agrar. univ., Ser. Biol.* 2 (17) : 19-39. (In Russian)
- Kolupaev Yu.Ye., Karpets Yu.V. 2010. Participation of soluble carbohydrates and low-molecular nitrogen compounds in adaptive reactions of plants. *Visn. Hark. nac. agrar. univ., Ser. Biol.* 2 (20) : 36-53. (In Russian)
- Kolupaev Yu.E., Ryabchun N.I., Vayner A.A., Yastreb T.O., Oboznyi A.I. 2015. Antioxidant enzyme activity and osmolyte content in winter cereal seedlings under hardening and cryostress. *Russ. J. Plant Physiol.* 62 (4) : 499-506. doi: 10.1134/S1021443715030115
- 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 (5) : 573-579. doi: 10.1134/S0003683817050088
- Soshinkova T.N., Radyukina N.L., Korolkova D.V., Nosov A.V. 2013. Proline and functioning of the antioxidant system in *Thellungiella salsuginea* plants and cultured cells subjected to oxidative stress. *Russ. J. Plant Physiol.* 60 (1) : 41-54. doi: 10.1134/S1021443713010093
- Fazlieva E.R., Kiseleva I.S., Zhuikova T.V. 2012. Antioxidant activity in the leaves of *Melilotus albus* and *Trifolium medium* from man-made disturbed habi-

- tats in the Middle Urals under the influence of copper. *Russ. J. Plant Physiol.* 59 (3) : 333-338. doi: 10.1134/S1021443712030065
- Shlyk A.A. 1971. Measuring of chlorophylls and carotenoids in extracts of green leaves, *Biokhimicheskie metody v fiziologii rastenii* (Biochemical Methods in Plant Physiology). Ed. Pavlinova O.A. Moscow : 154-170. (In Russian)
- Yastreba T.O., Kolupaev Yu.E., Lugovaya A.A., Dmitriev A.P. 2017. Hydrogen peroxide-induced salt tolerance in the *Arabidopsis salicylate*-deficient transformants NahG. *Appl. Biochem. Microbiol.* 53 (6) : 719-724. doi: 10.1134/S000368381706014X
- Yastreba T.O., Kolupaev Yu.E., Shvidenko N.V., Lugovaya A.A., Dmitriev A.P. 2015. Salt stress response in *Arabidopsis thaliana* plants with defective jasmonate signaling. *Appl. Biochem. Microbiol.* 51 (4) : 451-454. doi: org/10.1134/S000368381504016X
- Bates L.S., Walden R.P., Tear G.D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil.* 39 : 205-210. doi: org/10.1007/BF00018060
- Cao Y., Zhan Z. W., Xue L. W., Du J. B., Shang J., Xu F., Yuan S., Lin H.H. 2009. Lack of salicylic acid in *Arabidopsis* protects plants against moderate salt stress. *Z. Naturforsch.* 64 (3-4) : 231-238.
- Fang H.H., Pei Y.X., Tian B.H., Zhang, L.P., Qiao Z.J., Liu Z.Q. 2014. Ca²⁺ participates in H₂S induced Cr⁶⁺ tolerance in *Setaria italica*. *Chin. J. Cell Biol.* 36 : 758-765.
- Filipovic M.R., Jovanovic V.M. 2017. More than just an intermediate: hydrogen sulfide signalling in plants. *J. Exp. Bot.* 68 (17) : 4733-4736. doi: 10.1093/jxb/erx352
- Gaffney T., Friedrich L., Vernooij B., Negrotto D., Nye G., Uknes S., Ward E., Kessmann H., Ryals J. 1993. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science.* 261 : 754-756. doi: 10.1126/science.261.5122.754
- Gibeau D.M., Hulett J., Cramer G.R., Seemann J.R. 1997. Maximal biomass of *Arabidopsis thaliana* using a simple, low-maintenance hydroponic method and favorable environmental conditions. *Plant Physiol.* 115 : 317-319. doi: org/10.1104/pp.115.2.317
- Guo H., Xiao T., Zhou H., Xie Y., Shen W. Hydrogen sulfide: a versatile regulator of environmental stress in plants. *Acta Physiol. Plant.* 2016. 38 : 16. doi: 10.1007/s11738-015-2038-x
- Hancock J.T., Whiteman M. 2014. Hydrogen sulfide and cell signaling: Team player or referee? *Plant Physiol. Biochem.* 78 : 37-42. Doi: 10.1016/j.plaphy.2014.02.012
- He Q., Zhao S., Ma Q., Zhang Y., Huang L., Li G., Hao L. 2014. Endogenous salicylic acid levels and signaling positively regulate *Arabidopsis* response to polyethylene glycol-simulated drought stress. *J. Plant Growth Regul.* 33 : 871-880. doi: 10.1007/s00344-014-9438-9
- Jin Z., Xue S., Luo Y., Tian B., Fang H., Li H., Pei Y. 2013. Hydrogen sulfide interacting with abscisic acid in stomatal regulation responses to drought stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Biochem.* 62 : 41-46. doi: 10.1016/j.plaphy.2012.10.017
- Jin Z., Pei Y. 2015. Physiological implications of hydrogen sulfide in plants: pleasant exploration behind its unpleasant odour. *Oxid. Med. Cell Longev.* 397502. doi: 10.1155/2015/397502
- Joseph B., Jini D., Sujatha S. 2010. Insight into the role of exogenous salicylic acid on plants growth under salt environment. *Asian J. Crop Sci.* 2 : 226-235.
- Kolupaev Yu.E., Karpets Yu.V., Yastreba T.O. 2019. Induction of wheat plant resistance to stressors by donors of nitric oxide and hydrogen sulfide. In: *Wheat Production in Changing Environments*. Eds. M. Hasanuzzaman et al. Singapore: Springer Nature Pte Ltd. : 521-556. doi: org/10.1007/978-981-13-6883-7_21
- Kovacs I., Durner J., Lindermayr C. 2015. Crosstalk between nitric oxide and glutathione is required for NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES 1 (NPR1)-dependent defense signaling in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 208 : 860-872. doi: 10.1111/nph.13502
- Lee S., Kim S.-G., Park C.-M. 2010. Salicylic acid promotes seed germination under high salinity by modulating antioxidant activity in *Arabidopsis*. *New Phytol.* 188 : 626-637. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03378.x
- 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. doi: org/10.2478/s11756-014-0396-2
- 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 (8) : 1564-1572. doi: 10.1111/pce.12092
- Li Z.-G. 2015. Synergistic effect of antioxidant system and osmolyte in hydrogen sulfide and salicylic acid crosstalk-induced heat tolerance in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Plant Signal. Behav.* 10 (9) : e1051278. doi: 10.1080/15592324.2015.1051278
- 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 (9) : e0163082. doi: .1371/journal.pone.0163082
- Quan L.-J., Zhang B., Shi W.-W., Li H.-Y. 2008. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *J. Integr. Plant*

- Biol. 50 (1) : 2-18. doi: 10.1111/j.1744-7909.2007.00599.x
- Shakirova F.M., Sakhabutdinova A.R., Bezrukova M.V., Fatkhutdinova R.A., Fatkhutdinova D.R. 2003. Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. *Plant Sci.* 164 (3) : 317-322. doi: 10.1016/S0168-9452(02)00415-6
- 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: 628-640. doi: 10.1111/jipb.12302
- 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 : 20-29. doi: 10.1016/j.jplph.2015.03.015
- van Wees S.C.M., Glazebrook J. 2003. Loss of non-host resistance of *Arabidopsis NahG* to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* is due to degradation products of salicylic acid. *Plant J.* 33 : 733-742. doi: 10.1046/j.1365-3113X.2003.01665.x
- Yastreb T.O., Karpets Yu.V., Kolupaev Yu.E., Dmitriev A.P. 2017. Induction of salt tolerance in salicylate-deficient *NahG* *Arabidopsis* transformants using the nitric oxide donor. *Cytol. Genet.* 51 (2) : 134-141. doi: 10.3103/S0095452717020086
- Zhao K., Fan H., Zhou S., Song J. 2003. Study on the salt and drought tolerance of *Suaeda salsa* and *Kalanchoe clavigrammontiana* under isoosmotic salt and water stress. *Plant Sci.* 165 : 837-844. doi: org/10.1016/S0168-9452(03)00282-6

Надійшла до редакції
11.05.2019 р.

INDUCTION OF SALT RESISTANCE OF ARABIDOPSIS PLANTS OF WILD-TYPE AND SALICYLATE-DEFICIENT TRANSFORMANT *NahG* BY HYDROGEN SULFIDE DONOR

T. O. Yastreb¹, O. I. Horielova¹, K. M. Havva¹,
Yu. E. Kolupaev^{1,2}, A. I. Dyachenko³, O. P. Dmitriev³

¹ *Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University
(Kharkiv, Ukraine)*

E-mail: plant_biology@ukr.net

² *Karazin Kharkiv National University
(Kharkiv, Ukraine)*

³ *Institute of Cell Biology and Genetic Engineering
of National Academy of Sciences of Ukraine
(Kyiv, Ukraine)*

Hydrogen sulfide (H₂S) is currently regarded as a signal gasotransmitter molecule involved in many functions of plant organism, including adaptation to stress factors. However, the spectrum of possible adaptive reactions associated with salt resistance and induced by the H₂S action has not been sufficiently investigated. Hydrogen sulfide has functional bonds with stress phytohormones, in particular with salicylic acid. At the same time, the possible role of salicylic acid in the realization of physiological (stress-protective) effects of H₂S remained unexplored. We studied the effect of sodium hydrosulfide (NaHS), the hydrogen sulfide donor, on the antioxidant and osmoprotective systems, and salt resistance of *Arabidopsis thaliana* L. wild-type (Col-0) and salicylate-deficient *NahG* plants, transformed with the bacterial salicylate hydroxylase gene. It was found that transformants differed from wild-type plants by increased activity of antioxidant enzymes and high sugar content under salt stress conditions (150 mM NaCl). In both wild-type and *NahG* transformants treated with hydrogen sulfide donor by adding 50 μM NaHS to the nutrient medium, under salt stress it was retained high activity of superoxide dismutase and catalase, increased guaiacol peroxidase activity and sugar content, and maintained a pool of photosynthetic pigments in the leaves. Plants of both genotypes treated with the H₂S donor, under stress conditions, differed in their lower content of proline and the product of lipid peroxidation malonic dialdehyde in the leaves. It was concluded that the exogenous hydrogen sulfide induction of protective systems involved in the development of salt resistance in *Arabidopsis* plants can occur without the participation of salicylic acid.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, transformants *NahG*, salt stress, hydrogen sulfide, antioxidant enzymes, osmolytes

**ИНДУЦИРОВАНИЕ СОЛЕУСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ
АРАБИДОПСИСА ДИКОГО ТИПА И САЛИЦИЛАТДЕФИЦИТНЫХ
ТРАНСФОРМАНТОВ *NahG* ДЕЙСТВИЕМ ДОНОРА СЕРОВОДОРОДА**

Т. О. Ястреб¹, Е. И. Горелова¹, Е. Н. Гавва¹,
Ю. Е. Колупаев^{1,2}, А. И. Дяченко³, А. П. Дмитриев³

¹*Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева
(Харьков, Украина)*

E-mail: plant_biology@ukr.net

²*Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина
(Харьков, Украина)*

³*Институт клеточной биологии и генетической инженерии
Национальной академии наук Украины
(Киев, Украина)*

Сероводород (H_2S) в настоящее время рассматривается как сигнальная молекула-газотрансмиттер, задействованная во многих функциях растительного организма, в том числе в адаптации к стрессовым факторам. Однако спектр возможных адаптивных реакций, связанных с солеустойчивостью и индуцированных действием H_2S , исследован недостаточно. Сероводород имеет функциональные связи со стрессовыми фитогормонами, в частности с салициловой кислотой. В то же время возможная роль салициловой кислоты в реализации физиологических (стресс-протекторных) эффектов H_2S оставалась не исследованной. В работе изучали влияние донора сероводорода гидросульфида натрия ($NaHS$) на антиоксидантную и осмопротекторную системы и солеустойчивость *Arabidopsis thaliana* L. дикого типа (Col-0) и салицилатдефицитных растений *NahG*, трансформированных геном бактериальной салицилатгидроксилазы. Установлено, что трансформанты отличались от растений дикого типа повышенной активностью антиоксидантных ферментов и большим содержанием сахаров в условиях солевого стресса (150 мМ NaCl). Как у растений дикого типа, так и у трансформантов *NahG*, обработанных донором сероводорода путем добавления в питательную среду 50 мкМ NaHS, при солевом стрессе отмечалось сохранение высокой активности супероксиддисмутазы и каталазы, повышение активности гваяколпероксидазы и содержания сахаров, сохранения пула фотосинтетических пигментов в листьях. Растения обоих генотипов, обработанные донором H_2S , в стрессовых условиях отличались меньшим содержанием пролина и продукта пероксидного окисления липидов малонового диальдегида в листьях. Сделано заключение, что индуцирование экзогенным сероводородом протекторных систем, причастных к развитию солеустойчивости растений арабидопсиса, может происходить без участия салициловой кислоты.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, трансформанты *NahG*, солевой стресс, сероводород, антиоксидантные ферменты, осмолиты