

УДК 581.1

КОМБІНОВАНА ДІЯ НІТРОПРУСИДУ НАТРІЮ ТА 24-ЕПІБРАСИНОЛІДУ НА РЕДОКС-ГОМЕОСТАЗ І ТЕПЛОСТІЙКІСТЬ ПРОРОСТКІВ ПШЕНИЦІ

© 2019 р. М. А. Шкляревський, Ю. В. Карпець,
Г. А. Лугова, О. І. Горелова

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

Брасиностероїди є одним з ключових класів фітогормонів, задіяних в адаптації рослин до дії несприятливих чинників. Їх ефекти реалізуються з участю сигнальних посередників, у тому числі активних форм кисню та азоту. Оксид азоту (Нітроген оксид – NO) здатний індукувати різноманітні адаптивні реакції рослин. Водночас фізіологічні ефекти комбінованого впливу на рослини донорів NO і екзогенних брасиностероїдів майже не досліджені. Вивчали роздільний і комбінований впливи обробки насіння або коренів проростків пшениці (*Triticum aestivum* L.) донором NO нітропрусидом натрію (НПН) та 24-епібрасинолідом (24-ЕБЛ) у широкому діапазоні концентрацій на їх теплостійкість та показники редокс-гомеостазу. НПН в концентраціях діапазону 0,2-2 мМ спричиняв підвищення стійкості проростків до ушкоджуючого прогріву. Такий же ефект чинила обробка проростків або насіння 24-ЕБЛ в концентраціях 20-200 нМ. Комбінована обробка проростків або насіння двома сполуками у низьких концентраціях (0,2 мМ НПН та 20 нМ 24-ЕБЛ) чинила найбільший захисний ефект, що перевершував вплив оптимальних концентрацій кожної зі сполук. Обробка проростків НПН та 24-ЕБЛ або їх комбінацією в оптимальній концентрації спричиняли транзиторне підвищення вмісту пероксиду водню (Гідроген пероксиду – H₂O₂) у коренях. Водночас вищі концентрації цих речовин і особливо їх комбінації викликали більш тривалий ефект зростання кількості H₂O₂ у коренях. Обробка насіння 24-ЕБЛ у високих концентраціях та його поєднання з НПН також спричиняли збільшення вмісту пероксиду водню у коренях. НПН у помірних концентраціях та його поєднання з 24-ЕБЛ дещо знижували вміст малонового діальдегіду у коренях, водночас високі концентрації донора NO і особливо його поєднання з 24-ЕБЛ спричиняли прояв окиснювального стресу. Відзначається, що ефект синергізму стрес-протекторної дії НПН і 24-ЕБЛ при використанні їх у відносно низьких концентраціях може бути пов'язаний з посиленням трансдукції сигналу брасиностероїду в генетичний апарат за додаткового надходження в клітини NO, який є одним із посередників в реалізації фізіологічної дії 24-ЕБЛ. Проте комбінована обробка НПН і 24-ЕБЛ у високих концентраціях призводила до накопичення пероксиду водню та продуктів пероксидного окиснення ліпідів.

Ключові слова: *Triticum aestivum*, оксид азоту (NO), 24-епібрасинолід, теплостійкість, редокс-гомеостаз, пероксид водню, малоновий діальдегід

DOI: <https://doi.org/10.35550/vbio2019.02.071>

Брасиностероїди (БС) – клас фітогормонів, що беруть участь в процесах адаптації рослин до стресорів різної природи, зокрема, до екстремальних температур, зневоднення, засолення (Khrpach et al., 2003, Singh, Shono, 2005; Ефимова и др., 2014; Fariduddin et al., 2014). Є

свідчення їх впливу на функціонування всієї гормональної системи рослин, що дає підстави розглядати їх як групу найважливіших стресових фітогормонів (Vajguz, Nayat, 2009).

У трансдукції сигналу БС, очевидно, задіяні універсальні сигнальні посередники, такі як активні форми кисню (АФК), монооксид азоту (Нітроген оксид – NO) та іони кальцію. Так, на рослинах огірка показана здатність БС посилювати генерацію АФК – супероксидного

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

аніон-радикала і пероксиду водню (Xia et al., 2009). Цей ефект пригнічувався інгібітором НАДФН-оксидази дифеніленіодоніумом. Обробка рослин огірка 24-епібрасинолідом (24-ЕБЛ) викликала комплекс реакцій, що зумовлюють підвищення неспецифічної стійкості до абіотичних стресорів (дії параквату і холоду) (Xia et al., 2009), а також системної стійкості до фузаріозу (Xia et al., 2011). Такі ефекти були зумовлені залежним від АФК посиленням експресії цілого ряду захисних генів, що кодують антиоксидантні ферменти, фенілаланінамонійліази, РР-білки та ін. Вказані фізіологічні ефекти БС пригнічувалися обробкою рослин скавенджером АФК диметилтіосечовиною або інгібітором НАДФН-оксидази дифеніленіодоніумом (Xia et al., 2011). Ефект підвищення теплостійкості клітин колеоптилів пшениці під впливом 24-ЕБЛ і 24-епікастастерону також був залежним від АФК, оскільки супроводжувався транзиторним посиленням утворення супероксидного аніон-радикала і пероксиду водню та пригнічувався дією антиоксиданту іонолу та інгібітору НАДФН-оксидази імідазолу (Колупаев и др., 2014).

Ще одним посередником, задіяним в реалізації фізіологічних ефектів БС є оксид азоту. Обробка рослин огірка 24-ЕБЛ спричиняла транзиторне підвищення вмісту NO у листках (Cui et al., 2011). Цей ефект, ймовірно, був пов'язаний з активацією як ферменту подібного до NO-синтази тварин, так і нітратредуктази. При цьому стимульоване БС посилення генерації оксиду азоту відбувалося за посередництва АФК, оскільки усувалося антиоксидантом та інгібітором НАДФН-оксидази. На думку авторів, оксид азоту був задіяний в передачі сигналів БС, які індукують посилення експресії генів антиоксидантних ферментів і розвиток стійкості рослин до холододового і окиснювального стресів (Cui et al., 2011).

Індукування стійкості ізольованих листків кукурудзи до осмотичного стресу також було опосередковано оксидом азоту (Zhan et al., 2011). За обробки БС відзначалося підвищення вмісту NO і АБК у листках. Скавенджер оксиду азоту РТІО (2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide) та інгібітор NO-синтази L-NAME (N^G-nitro-L-arginine methyl ester) усували спричинювані БС ефекти підвищення вмісту АБК і розвитку стійкості до осмотичного стресу.

На прикладі колеоптилів пшениці показана участь оксиду азоту разом з АФК та іонами кальцію у трансдукції сигналу БС у злако-

вих (Карпец, Колупаев, 2018). За обробки колеоптилів 24-ЕБЛ, яка спричиняла підвищення їх теплостійкості, відзначалося зростання вмісту NO і АФК в тканинах. Антагоністи кальцію ЕГТА і неоміцин значною мірою нівелювали ці ефекти. Збільшення вмісту NO в тканинах колеоптилів, спричинюване дією 24-ЕБЛ, також практично повністю нівелювалося антиоксидантами та інгібіторами ферментів, що беруть участь у синтезі NO.

Можна припустити, що БС і NO здатні посилювати стрес-протекторні ефекти одне одного. При поєднанні передпосівної обробки насіння томату 10 мкМ розчином донора оксиду азоту нітропрусиду натрію (НПН) з обприскуванням рослин у 30-денному віці 10⁻⁸ М розчинами 24-ЕБЛ або 28-гомобрасиноліду відзначалося посилення росту, інтенсивності фотосинтезу та антиоксидантної активності у рослин (Хайят и др., 2010). Водночас БС нейтралізували негативний вплив рістінгібуючої (1 мМ) концентрації НПН на рослини. В цілому ж ефекти комбінованого впливу екзогенних БС і NO досліджені дуже слабо.

Зважаючи на те, що як БС (Xia et al., 2009), так і NO (Карпец, Колупаев, 2017) чинять істотний вплив на редокс-гомеостаз рослин, досліджували роздільний і комбінований впливи обробки насіння або проростків пшениці донором NO НПН та 24-ЕБЛ у широкому діапазоні концентрацій на їх теплостійкість та вміст у коренях пероксиду водню і продукту пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) малонового діальдегіду (МДА).

МЕТОДИКА

Об'єктом досліджень були етіюльовані проростки м'якої озимої пшениці (*Triticum aestivum* L.) сорту Досконала. Насіння незаражували 6% H₂O₂ протягом 30 хв і пророщували у темряві за температури 20°C впродовж чотирьох діб. Чотириденні проростки відповідних варіантів досліду протягом 24 годин інкубували на розчинах донора оксиду азоту нітропрусиду натрію (НПН) в концентраціях 0,1, 0,2, 0,5 і 2 мМ та 24-епібрасиноліду (24-ЕБЛ) в концентраціях 5, 20, 50 і 200 нМ. Контрольні проростки продовжували інкубувати на воді.

В окремих серіях дослідів оцінювали ефекти одноденної передобробки насіння розчинами НПН та/або 24-ЕБЛ.

5-денні проростки піддавали потенційно летальному прогріву у водяному термостаті при температурі 46±0,2°C протягом 10 хв. Через 4 доби після впливу ушкоджуючого прогрі-

ву оцінювали відносну кількість проростків, що вижили.

В окремих дослідках оцінювали вміст пероксиду водню і продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), переважно малонового діальдегіду (МДА).

Пероксид водню екстрагували 5% ТХО з коренів, розтертих на льоду, потім проби центрифугували при 8000g протягом 10 хв за температури 4°C і в супернатанті визначали його вміст феротіоціанатним методом з використанням солі Мора і тіоціанату амонію (Sagisaka, 1976).

Для визначення продуктів ПОЛ (переважно МДА), рослинний матеріал гомогенізували в реакційному середовищі, що містило 0,25% 2-тіобарбітурову кислоту в 10% ТХО, гомогенат поміщали в киплячу водяну баню на 30 хв. Після цього проби швидко охолоджували і центрифугували 15 хв при 10000 g. Оптичну густину супернатанту визначали за довжин хвиль 532 нм (максимум світлопоглинання МДА) і 600 нм (для поправки на неспецифічне світлопоглинання) (Фазлиева и др., 2012).

Досліди проводили в 3-4-разовому біологічному повторенні і кожен відтворювали незалежно три рази. На рисунках наведені середні величини та їх стандартні відхилення. Крім спеціально відзначених випадків, обговорюються відмінності, достовірні при $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Обробка проростків НПН в концентраціях діапазону від 0,1 до 2 мМ спричиняла підвищення їх теплостійкості (рис. 1, А). Такий же ефект спостерігався і за передпосівної обробки насіння в концентраціях від 0,2 до 2 мМ. Проте, величина її позитивного впливу була меншою. За обох способів обробки максимальний позитивний ефект спостерігався при використанні концентрації НПН 0,5 мМ.

Внесення 24-ЕБЛ (5-200 нМ) в середовище інкубації коренів також підвищувало виживаність проростків після теплового стресу (рис. 1, Б). Максимальний ефект спостерігався при використанні фітогормону в концентраціях 20 і 50 нМ. Передпосівна обробка насіння 24-ЕБЛ так само позитивно впливала на стійкість проростків до ушкоджуючого прогріву. Помітний ефект відзначали за концентрацій фітогормону 20, 50 і 200 нМ.

У наступній серії експериментів оцінювали комбінований вплив НПН і 24-ЕБЛ у різних діапазонах концентрацій на теплостійкість проростків. Поєднання донора NO і фітогормо-

ну у низьких концентраціях (0,2 мМ і 20 нМ, відповідно) при внесенні їх у середовище інкубації проростків викликало найбільший позитивний ефект (рис. 2). Він перевершував максимальні ефекти кожної зі сполук при їх окремому використанні, а також вплив комбінацій в інших концентраційних діапазонах. Передпосівна обробка насіння такою комбінацією двох сполук також чинила максимальний позитивний ефект, однак він поступався їх впливу при внесенні у середовище інкубації проростків. Також ефект передпосівної обробки насіння поєднанням 0,2 мМ НПН і 20 нМ 24-ЕБЛ достовірно не відрізнявся від впливу на теплостійкість 0,5 мМ НПН і 50 нМ 24-ЕБЛ при використанні кожного з них окремо (рис. 2).

При поєднанні обробок проростків 0,2 мМ НПН і 50 нМ 24-ЕБЛ їх теплостійкість була вищою від контролю, однак нижчою від дії самого по собі 0,2 мМ НПН. Ще меншим позитивний ефект був при поєднанні 0,5 мМ НПН з 20 нМ 24-ЕБЛ. При використанні поєднання більших концентрацій (0,5 НПН і 50 нМ 24-ЕБЛ) виживаність проростків після прогріву не відрізнялася від контролю, тобто позитивний ефект сполук нівелювався, а за поєднання високих концентрацій донора NO (2 мМ) і брасиностероїду (200 нМ) спостерігалось значне зниження теплостійкості проростків (рис. 2), при тому, що ці сполуки самі по собі в таких концентраціях чинили хоча й відносно невеликий, але достовірний позитивний ефект.

При передпосівній обробці насіння комбінацією 0,2 мМ НПН і 50 нМ 24-ЕБЛ та 0,5 мМ НПН і 20 нМ 24-ЕБЛ позитивні ефекти не виявлялися, виживаність проростків у цих варіантах не відрізнялася від контролю (рис. 2). У варіантах з комбінаціями вищих концентрацій цих сполук відзначалося істотне зниження теплостійкості проростків відносно контролю і, особливо, порівняно з варіантами з обробкою лише 0,5 мМ НПН або 50 нМ 24-ЕБЛ.

Отже, в цілому при поєднанні донора оксиду азоту і брасиностероїду в низьких діапазонах концентрацій відзначався ефект синергізму їх стрес-протекторного впливу. Натомість при підвищенні концентрацій двох сполук такий ефект зменшувався, а комбінація високих концентрацій НПН і 24-ЕБЛ взагалі призводила до виразного антагонізму дії речовин і зниження теплостійкості проростків. Необхідно відзначити, що при застосуванні передпосівної обробки насіння комбінацією НПН і 24-ЕБЛ характер ефектів в цілому був схожим на той, що спостерігався при внесенні сполук у середовище

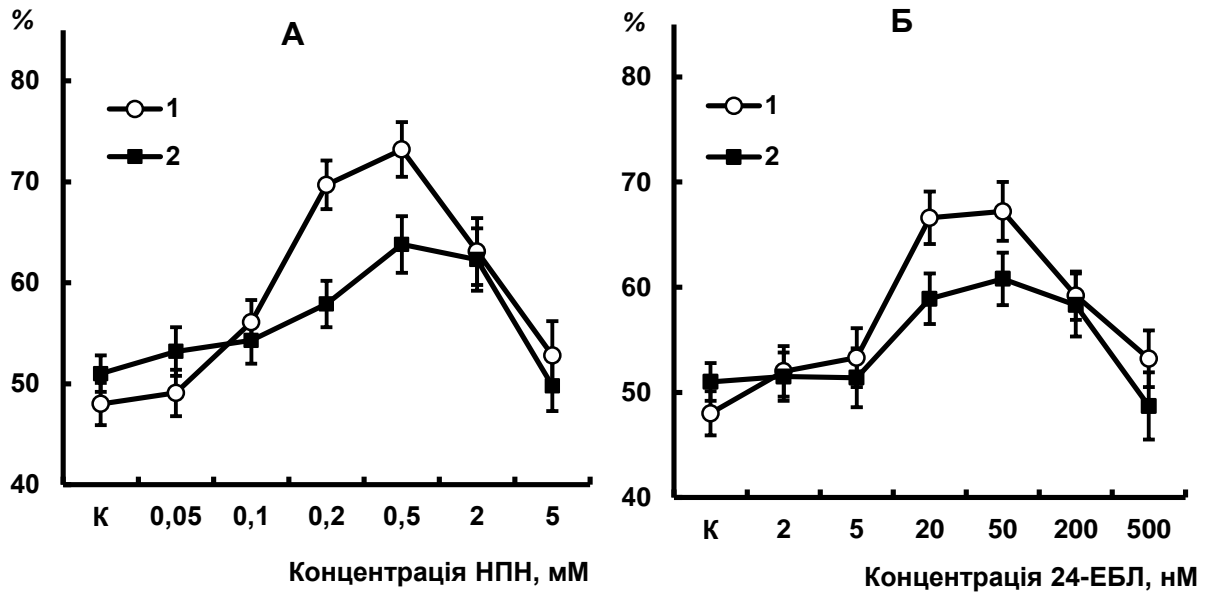


Рис. 1. Концентраційна залежність впливу НПН (А) і 24-ЕБЛ (Б) на теплостійкість проростків пшениці.

1 – додавання НПН або 24-ЕБЛ в середовище інкубації; 2 – передпосівна обробка насіння НПН або 24-ЕБЛ.

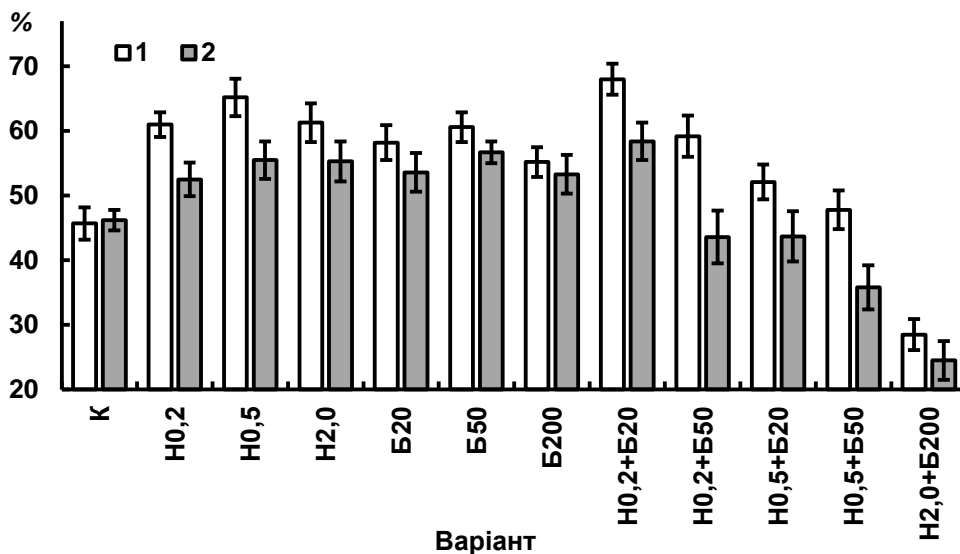


Рис. 2. Вживаність (%) проростків після теплового стресу за дії НПН (Н) і 24-ЕБЛ (Б) або їх комбінацій.

1 – додавання НПН або 24-ЕБЛ в середовище інкубації; 2 – передпосівна обробка насіння НПН або 24-ЕБЛ. Н – НПН, Б – 24-ЕБЛ.

інкубації коренів. Проте кількісно позитивні ефекти були виражені слабше. При цьому негативний вплив комбінацій високих концентрацій донора оксиду азоту і брасиностероїду, навпаки, був виражений сильніше.

Можна припустити, що принаймні однією з причин різних ефектів комбінування умовно низьких та високих концентрацій НПН і 24-ЕБЛ є односпрямований вплив оксиду азоту і брасиностероїду на редокс-метаболізм.

Для перевірки цього припущення досліджували вплив вказаних сполук та їх комбінацій у різних концентраційних діапазонах на вміст пероксиду водню і продукту ПОЛ МДА в коренях.

Через 4 год після обробки коренів НПН в концентраціях діапазону 0,2-2 мМ відзначалося відносно невелике (на 10-20%), але достовірне підвищення вмісту пероксиду водню (рис. 3, А).

КОМБІНОВАНА ДІЯ НІТРОПРУСИДУ НАТРІЮ ТА 24-ЕПБРАСИНОЛІДУ

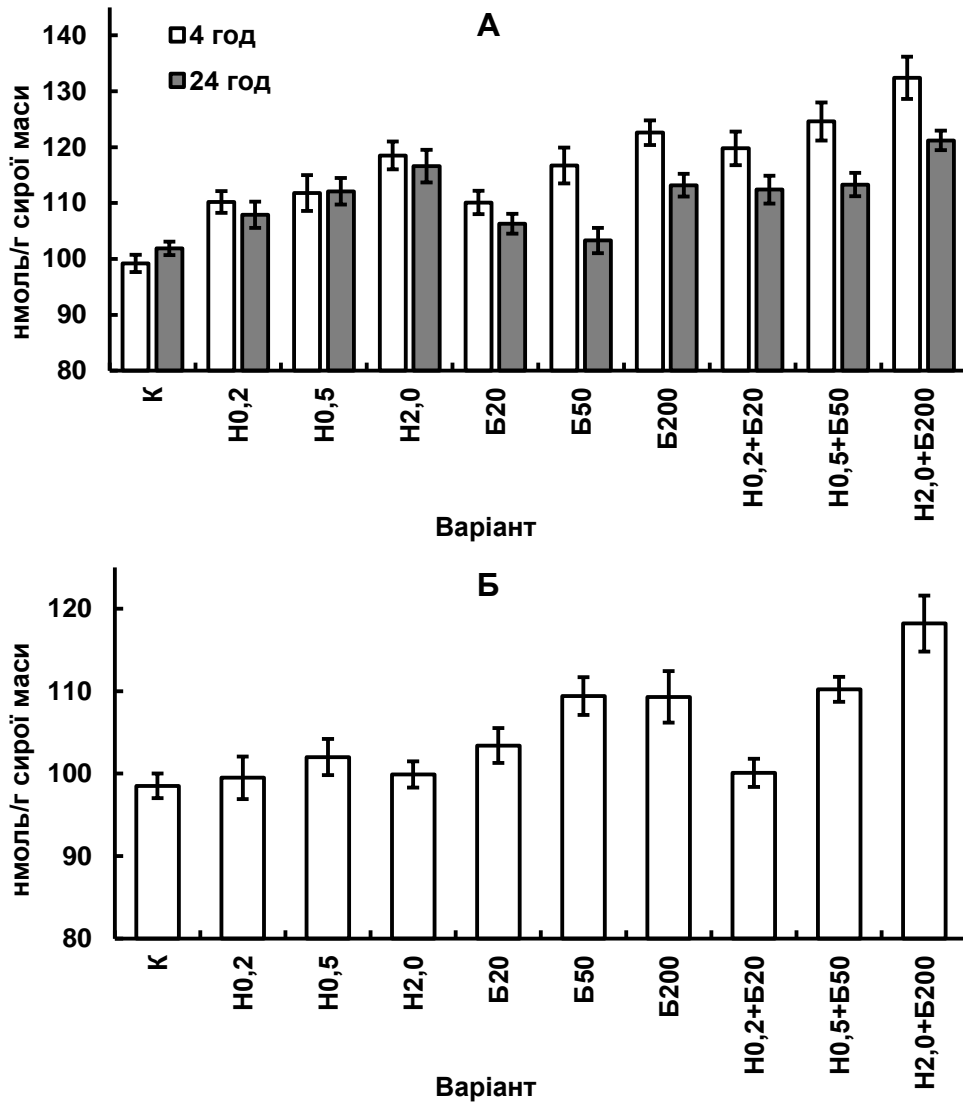


Рис. 3. Вміст пероксиду водню за додавання НПН або 24-ЕБЛ в середовище інкубації (А) або передпосівної обробки насіння (Б) НПН або 24-ЕБЛ. Н – НПН, Б – 24-ЕБЛ.

Схожі ефекти спостерігалися і за впливу на корені 24-ЕБЛ. За комбінованої обробки НПН і 24-ЕБЛ у помірних концентраціях сумарно їх впливу на вміст пероксиду водню не спостерігалося. Проте такий ефект виявлявся за комбінованої дії 2 мМ НПН та 200 нМ 24-ЕБЛ.

Через 24 год впливу досліджуваних сполук у більшості варіантів вміст H_2O_2 в коренях дещо зменшувався, наближаючись до контролю (рис. 3, А). Особливо помітно це було у варіанті з 50 нМ 24-ЕБЛ.

За передпосівної обробки насіння донором оксиду азоту та брасиностероїдом вміст пероксиду водню у коренях 5-добових проростків слабо відрізнявся від контролю (рис. 3, Б). Проте у варіантах з високими концентраціями

24-ЕБЛ та їх комбінаціями вміст H_2O_2 перевищував значення контролю.

Вміст продукту ПОЛ МДА в коренях через 4 год дії донора НПН в низьких концентраціях практично не змінювався, під впливом концентрації 2 мМ відзначалося деяке його підвищення (рис. 4, А). За обробки коренів 24-ЕБЛ в концентраціях 20 і 50 нМ на цій стадії спостережень відзначалося зниження вмісту МДА. За впливу брасиностероїду у концентрації 200 нМ вміст МДА в коренях не відрізнявся від контролю. Так само істотно не відрізнявся від контролю і вміст МДА в коренях за комбінованої обробки НПН в концентраціях 0,2 і 0,5 мМ та 24-ЕБЛ в концентраціях 20 і 50 нМ. За комбінованої дії 2 мМ НПН і 200 нМ 24-ЕБЛ вміст МДА в коренях дещо підвищувався.

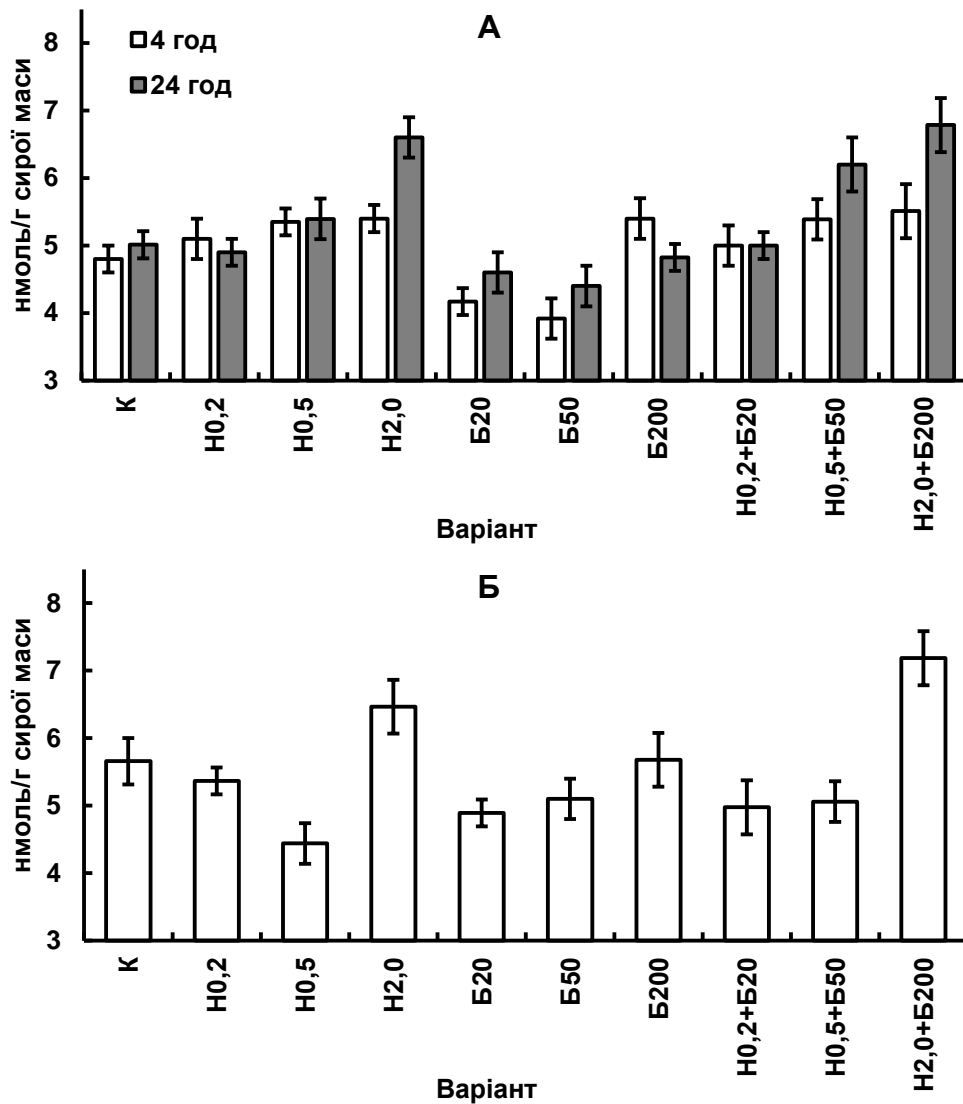


Рис. 4. Вміст МДА за додавання НПН або 24-ЕБЛ в середовище інкубації (А) або передпосівної обробки (Б) насіння.

Н – НПН, Б – 24-ЕБЛ.

Інша картина спостерігалася після 24-годинної обробки коренів проростків досліджуваними сполуками. За обробки НПН в низьких концентраціях вміст МДА на цій стадії досліду не відрізнявся від контролю, проте у варіанті з 2 мМ НПН істотно підвищувався (рис. 4, А). В усіх варіантах з 24-ЕБЛ кількість МДА в коренях через 24 год обробки не відрізнялася від контролю. Не було відмінності від контролю і у варіанті з поєднанням 0,2 мМ НПН та 20 нМ 24-ЕБЛ. Водночас комбінований вплив донора NO і брасиностероїду у вищих концентраціях спричиняв підвищення вмісту МДА в коренях (рис. 4, А).

За передпосівної обробки насіння НПН в різних концентраціях зміни вмісту МДА у коренях 5-добових проростків мали складний характер. Найнижча з досліджуваних концентра-

цій (0,2 мМ) не впливала на цей показник, за дії 0,5 мМ НПН відзначалося зниження вмісту МДА, а за обробки насіння 2 мМ НПН він істотно підвищувався (рис. 4, Б). Передпосівна обробка насіння 24-ЕБЛ в низьких концентраціях викликала деяке зниження вмісту МДА в коренях, а за дії 200 нМ 24-ЕБЛ він не відрізнявся від контролю. За комбінованої обробки насіння донором оксиду азоту та брасиностероїдом у низьких концентраціях вміст МДА був нижчим від контролю, а за поєднання 2 мМ НПН і 200 нМ 24-ЕБЛ він істотно перевищував значення контролю.

В цілому отримані результати підтверджують припущення про зв'язок між впливом донора оксиду азоту і брасиностероїду та їх комбінацій на теплостійкість проростків зі змінами показників редокс-метаболізму. Так, при

КОМБІНОВАНА ДІЯ НІТРОПРУСИДУ НАТРІЮ ТА 24-ЕБЛБРАСИНОЛІДУ

використанні нарізно найбільший позитивний ефект НПН і 24-ЕБЛ чинили в концентраціях 0,5 мМ і 50 нМ, відповідно (рис. 2). Водночас при комбінованій обробці найкращий ефект відзначався за дії менших концентрацій: 0,2 мМ НПН і 20 нМ 24-ЕБЛ. Обробка коренів цими сполуками у вказаних концентраційних діапазонах спричиняла деяке підвищення вмісту пероксиду водню через 4 год, надалі (через 24 год) він зменшувався, наближаючись до значень контролю. Проте за використання 2 мМ НПН і 200 нМ 24-ЕБЛ і особливо їх комбінації вміст пероксиду водню помітно зростав через 4 год спостережень і, незважаючи на деяке зниження, залишався істотно вищим від контролю через 24 год (рис. 3, А).

За передпосівної обробки насіння НПН сам по собі істотно не впливав на вміст пероксиду водню, 24-ЕБЛ у високих концентраціях збільшував його, а особливо істотне підвищення відзначалося при поєднанні високих концентрацій обох сполук (рис. 3, Б).

Як відомо, зростання вмісту продукту ПОЛ МДА в рослинних тканинах зазвичай розглядають як ознаку окиснювального стресу (Фазлиева и др., 2012). Помітне підвищення вмісту МДА відзначалося через 24 год після впливу на корені 2 мМ НПН і комбінації донора оксиду азоту в концентраціях 0,5 і 2 мМ та брасиностероїду в концентраціях 50 і 200 нМ (рис. 4). Ці сполуки у вказаних концентраціях самі по собі чинили значний позитивний вплив на теплостійкість проростків, а за обробки коренів їх комбінаціями вона була помітно нижчою, тобто спостерігався ефект антагонізму (рис. 2, А).

В цілому схожа картина спостерігалася і за передпосівної обробки насіння. Поєднання високих концентрацій НПН і 24-ЕБЛ спричиняло збільшення вмісту МДА в коренях і зниження теплостійкості проростків. Водночас при використанні комбінації їх низьких концентрацій відзначалося зниження вмісту МДА (рис. 4, Б) та істотне підвищення теплостійкості проростків (рис. 2, Б).

Підвищення вмісту пероксиду водню в коренях за дії помірних концентрацій донора оксиду азоту і брасиностероїду та їх комбінацій, яке було транзиторним, ймовірно, слід розглядати як ефект активації АФК-сигналіну (Xia et al., 2009; 2011; Колупаев и др., 2014). Він міг бути пов'язаний з підвищенням активності НАДФН-оксидази. Для рослин пшениці показано, що такий ефект спричиняють як донори оксиду азоту (Карпец и др., 2015), так і

24-ЕБЛ (Карпец, Колупаев, 2018). Водночас показано, що NO виступає у ролі посередника при індукуванні теплостійкості колеоптилів пшениці дією 24-ЕБЛ (Карпец, Колупаев, 2018). При цьому спричинюване брасиностероїдом зростання вмісту NO було опосередковане залежним від НАДФН-оксидази підвищенням генерації АФК.

Можна припустити, що ефект синергізму стрес-протекторної дії НПН і 24-ЕБЛ при використанні їх у відносно низьких концентраціях пов'язаний з посиленням трансдукції сигналу брасиностероїду в генетичний апарат за додаткового надходження в клітини NO, який є одним із посередників в реалізації фізіологічної дії 24-ЕБЛ (Cui et al., 2011; Карпец, Колупаев, 2018). Натомість високі концентрації донора оксиду азоту і брасиностероїду можуть призводити до так званого «перезбудження» сигнальної мережі, надмірної генерації АФК та, як наслідок, посилення ПОЛ і нівелювання стрес-протекторних ефектів або взагалі зниження стійкості рослин. Ймовірно, саме такий розвиток подій мав місце при поєднанні обробки проростків пшениці 2 мМ НПН та 200 мкМ ЕБЛ (рис. 2-4).

Слід зауважити, що як донор оксиду азоту (Zhang et al., 2007; Карпец, Колупаев, 2017), так і брасиностероїди (Fariduddin et al., 2014; Колупаев, Вайнер, 2014) здатні спричинити активацію ферментативної антиоксидантної системи. Щоправда, оксид азоту може не лише активувати, а й інгібувати (у підвищених концентраціях) ключові антиоксидантні ферменти (Lozano-Juste et al., 2011; Arora et al., 2016; Карпец, Колупаев, 2017). Не виключено, що при поєднанні обробки донором оксиду азоту та брасиностероїдом в клітинах відбувалося надмірне збільшення вмісту NO, пов'язане як з екзогенним його надходженням, так і з утворенням під впливом 24-ЕБЛ. Безумовно, ці припущення потребують експериментального підтвердження. Для пояснення виявлених ефектів синергізму і антагонізму дії комбінацій донора оксиду азоту і брасиностероїду необхідне також дослідження функціонування стрес-протекторних систем проростків пшениці і, в першу чергу, антиоксидантної.

Автори вдячні академіку НАН Білорусі В.О. Хрипачу (Інститут біоорганічної хімії НАН Білорусі) за надання 24-ЕБЛ.

ЛІТЕРАТУРА

Ефимова М.В., Савчук А.Л., Дж. Хасан А.К., Литвиновская Р.П., Хрипач В.А., Холодова В.П., Кузнецов Вл.В. 2014. Физиологические механизмы

- повышения солеустойчивости растений рапса brassinостероидами. Физиология растений. 61 : 778-789.
- Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е., Вайнер А.А. 2015. Функциональное взаимодействие оксида азота и пероксида водорода при формировании индуцированной теплоустойчивости проростков пшеницы. Физиология растений. 62 (1) : 72-78.
- Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е. 2017. Функциональное взаимодействие оксида азота с активными формами кислорода и ионами кальция при формировании адаптивных реакций растений. Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. 2 (41) : 6-31.
- Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е. 2018. Участие оксида азота в индуцировании теплоустойчивости coleoptiles пшеницы 24-эпибрасинолидом: функциональное взаимодействие NO с АФК и ионами кальция. Физиология растений. 65 (2) : 111-120.
- Колупаев Ю.Е., Вайнер А.А. 2014. Механизмы стресспротекторного влияния brassinостероидов на растения. Агрехимия. 7 : 6-84.
- Колупаев Ю.Е., Вайнер А.А., Ястреб Т.О., Обозный А.И., Хрипач В.А. 2014. Активные формы кислорода и ионы кальция в реализации стресспротекторного действия brassinостероидов на растительные клетки. Прикл. биохимия и микробиология. 50 (6) : 593-598.
- Фазлиева Э.Р., Киселева И.С., Жуйкова Т.В. 2012. Антиоксидантная активность листьев *Melilotu salbus* и *Trifolium medium* из техногенно нарушенных местообитаний Среднего Урала при действии меди. Физиология растений. 59 (3) : 369-375.
- Хайят Ш., Ядав С., Али Б., Ахмад А. 2010. Взаимодействие окиси азота и brassinостероидов при их влиянии на фотосинтез и антиоксидантную систему томата. Физиология растений. 57 (2) : 224-233.
- Arora D., Jain P., Singh N., Kaur H., Bhatla S.C. 2016. Mechanisms of nitric oxide crosstalk with reactive oxygen species scavenging enzymes during abiotic stress tolerance in plants. Free Radical Res. 50 : 291-303. Doi: 10.3109/10715762.2015. 1118473
- Bajguz A., Hayat S. 2009. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. Plant Physiol. Biochem. 47 : 1-8. doi: 10.1016/j.plaphy.2008.10.002
- Cui J.X., Zhou Y.H., Ding J.G., Xia X.J., Shi K., Chen S.C., Asami T., Chen Z., Yu J.Q. 2011. Role of nitric oxide in hydrogen peroxide-dependent induction of abiotic stress tolerance by brassinosteroids in cucumber. Plant Cell Environ. 34 : 347-358. doi: 10.1111/j.1365-3040.2010.02248.x
- Fariduddin Q., Yusuf M., Ahmad I., Ahmad A. 2014. Brassinosteroids and their role in response of plants to abiotic stresses. Biol. Plant. 58 : 9-17. doi: 10.1007/s10535-013-0374-5
- Khripach V., Zhabinskii V., De Groot A. 2000. Twenty years of brassinosteroids: Steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century. Ann. Bot. 86 : 441-447. doi: 10.1006/anbo.2000.1227
- Lozano-Juste J., Colom-Moreno R., Leon J. 2011. In vivo protein tyrosine nitration in *Arabidopsis thaliana*. J. Exp. Bot. 62 : 3501-3517. doi: 10.1093/jxb/err042
- Sagisaka S. 1976. The occurrence of peroxide in a perennial plant, *Populus gelrica*. Plant Physiol. 57 : 308-309.
- Singh I., Shono M. 2005. Physiological and molecular effects of 24-epibrassinolide, a brassinosteroid on thermotolerance of tomato. Plant Growth Regul. 47 : 111-119. doi: 10.1007/s10725-005-3252-0
- Xia X.J., Wang Y.J., Zhou Y.H., Tao Y., Mao W.H., Shi K., Asami T., Chen Z., Yu J.Q. 2009. Reactive oxygen species are involved in brassinosteroid-induced stress tolerance in cucumber. Plant Physiol. 150 : 801-814. doi: 10.1104/pp.109.138230
- Xia X.J., Zhou Y.H., Ding J., Shi K., Asami T., Chen Z., Yu J.Q. 2011. Induction of systemic stress tolerance by brassinosteroid in *Cucumis sativus*. New Phytol. 191 : 706-720. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03745.x
- Zhang A., Zhang J., Zhang J., Ye N., Zhang H., Tan M., Jiang M. 2011. Nitric oxide mediates brassinosteroid-induced ABA biosynthesis involved in oxidative stress tolerance in maize leaves. Plant Cell Physiol. 52 (1): 181-192. doi: 10.1093/pcp/pcq187
- Zhang A., Jiang M., Zhang J., Ding H., Xu S., Hu X., Tan M. 2007. Nitric oxide induced by hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade involved in antioxidant defense in maize leaves. New Phytol. 175 : 36-50. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02071.x

REFERENCES

- Efimova M.V., Savchuk A.L., Khasan A.K., Litvinovskaya R.P., Khripach V.A., Kholodova V.P., Kuznetsov V.V. 2014. Physiological mechanisms of enhancing salt tolerance of oilseed rape plants with brassinosteroids. Russ. J. Plant Physiol. 61 : 733-743. doi: 10.1134/S1021443714060053
- Karpets Yu.V., Kolupaev Yu.E., Vayner A.A. 2015. Functional interaction between nitric oxide and hydrogen peroxide during formation of wheat seedling induced heat resistance. Russ. J. Plant Physiol. 62 (1) : 65-70. doi: 10.1134/S1021443714060090
- Karpets Yu.V., Kolupaev Yu.E. 2017. Functional interaction of nitric oxide with reactive oxygen species and calcium ions at development of plants adaptive responses. Visn. Hark. nac. agrar. univ., Ser. Biol. 2 (41) : 6-31.
- Karpets Yu.V., Kolupaev Yu.E. 2018. Participation of nitric oxide in 24-epibrassinolide-induced heat resistance of wheat coleoptiles: Functional interactions of nitric oxide with reactive oxygen species and Ca

КОМБІНОВАНА ДІЯ НІТРОПРУСИДУ НАТРІЮ ТА 24-ЕПІБРАСІНОЛІДУ

- ions. *Russ. J. Plant Physiol.* 65 (2) : 177-185. doi: 10.1134/S1021443718010053
- Kolupaev Yu.E., Vayner A.A. 2014. Mechanisms of the stress-protective effect of brassinosteroids on plants. *Agrochimiya*. 7 : 69-84.
- Kolupaev Yu.E., Vayner A.A., Yastreb T.O., Oboznyi A.I., Khripach V.A. 2014. The role of reactive oxygen species and calcium ions in the implementation of the stress-protective effect of brassinosteroids on plant cells. *Appl. Biochem. Microbiol.* 50 (6) : 658-663. doi: 10.1134/S0003683814060076
- 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 habitats in the Middle Urals under the influence of copper. *Russ. J. Plant Physiol.* 59 (3) : 333-338. doi: 10.1134/S1021443712030065
- Hayat Sh., Yadav S., Ali B., Ahmad A. 2010. Interactive effect of nitric oxide and brassinosteroids on photosynthesis and the antioxidant system of *Lycopersicon esculentum*. *Russ. J. Plant Physiol.* 57 (2) : 212-221. doi: 10.1134/S1021443710020081
- Arora D., Jain P., Singh N., Kaur H., Bhatla S.C. 2016. Mechanisms of nitric oxide crosstalk with reactive oxygen species scavenging enzymes during abiotic stress tolerance in plants. *Free Radical Res.* 50 : 291-303. doi: 10.3109/10715762.2015. 1118473
- Bajguz A., Hayat S. 2009. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiol. Biochem.* 47 : 1-8. doi: 10.1016/j.plaphy.2008.10.002
- Cui J.X., Zhou Y.H., Ding J.G., Xia X.J., Shi K., Chen S.C., Asami T., Chen Z., Yu J.Q. 2011. Role of nitric oxide in hydrogen peroxide-dependent induction of abiotic stress tolerance by brassinosteroids in cucumber. *Plant Cell Environ.* 34 : 347-358. doi: 10.1111/j.1365-3040.2010.02248.x
- Fariduddin Q., Yusuf M., Ahmad I., Ahmad A. 2014. Brassinosteroids and their role in response of plants to abiotic stresses. *Biol. Plant.* 58 : 9-17. doi: org/10.1007/s10535-013-0374-5
- Khripach V., Zhabinskii V., De Groot A. 2000. Twenty years of brassinosteroids: Steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century. *Ann. Bot.* 86 : 441-447. doi: org/10.1006/anbo.2000.1227
- Lozano-Juste J., Colom-Moreno R., Leon J. 2011. In vivo protein tyrosine nitration in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 62 : 3501-3517. doi: 10.1093/jxb/err042
- Sagisaka S. 1976. The occurrence of peroxide in a perennial plant, *Populus gelrica*. *Plant Physiol.* 57 : 308-309.
- Singh I., Shono M. 2005. Physiological and molecular effects of 24-epibrassinolide, a brassinosteroid on thermotolerance of tomato. *Plant Growth Regul.* 47 : 111-119. doi: 10.1007/s10725-005-3252-0
- Xia X.J., Wang Y.J., Zhou Y.H., Tao Y., Mao W.H., Shi K., Asami T., Chen Z., Yu J.Q. 2009. Reactive oxygen species are involved in brassinosteroid-induced stress tolerance in cucumber. *Plant Physiol.* 150 : 801-814. doi: 10.1104/pp.109.138230
- Xia X.J., Zhou Y.H., Ding J., Shi K., Asami T., Chen Z., Yu J.Q. 2011. Induction of systemic stress tolerance by brassinosteroid in *Cucumis sativus*. *New Phytol.* 191 : 706-720. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03745.x
- Zhang A., Zhang J., Zhang J., Ye N., Zhang H., Tan M., Jiang M. 2011. Nitric oxide mediates brassinosteroid-induced ABA biosynthesis involved in oxidative stress tolerance in maize leaves. *Plant Cell Physiol.* 52 (1): 181-192. doi: 10.1093/pcp/pcq187
- Zhang A., Jiang M., Zhang J., Ding H., Xu S., Hu X., Tan M. 2007. Nitric oxide induced by hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced activation of the mi-togen-activated protein kinase cascade involved in antioxidant defense in maize leaves. *New Phytol.* 175 : 36-50. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02071.x

Надійшла до редакції
13.05.2019 р.

COMBINED INFLUENCE OF SODIUM NITROPRUSSIDE AND 24-EPIBRASSINOLIDE ON REDOX-HOMEOSTASIS AND HEAT RESISTANCE OF WHEAT PLANTLETS

M. A. Shkliarevskiy, Yu. V. Karpets, G. A. Lugova, O. I. Horielova

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

E-mail: plant_biology@ukr.net

Brassinosteroids are one of the key classes of phytohormones, involved into the adaptation of plants to the action of adverse factors. Their effects are realized with the participation of signal mediators, including reactive oxygen and nitrogen species. Nitric oxide (NO) is capable to induce various adap-

tive responses of plants. At the same time physiological effects of combined influence of NO donors and exogenous brassinosteroids on plants are almost not investigated. The separate and combined influences of treatment of seeds or roots of plantlets of wheat (*Triticum aestivum* L.) with NO donor sodium nitroprusside (SNP) and 24-epibrassinolide (24-EBL) in the wide range of concentration on their heat resistance and indicators the redox homeostasis have been studied. SNP in the concentration range of 0,2-2 mM caused the increase in resistance of plantlets to the damaging heating. The treatment of plantlets or seeds with 24-EBL in concentration of 20-200 nM had the same effect. The cotreatment of plantlets or seeds with two compounds in low concentration (0,2 mM of SNP and 20 nM of 24-EBL) had the greatest protective effect, which exceeded the influence of the optimal concentrations of each of the compounds separately. The treatment of plantlets with SNP and 24-EBL or their combination in optimum concentration caused the transitional increase in the content of hydrogen peroxide (H₂O₂) in roots. At the same time high concentration of these compounds and especially their combination caused longer effect of growth of quantity of H₂O₂ in roots. The treatment of seeds with 24-EBL in high concentration and its combination with SNP also affected the increase of content of hydrogen peroxide in roots. SNP in moderate concentration and its combination with 24-EBL reduced to some extent the content of malonic dialdehyde in roots, at the same time their high concentration and especially their combination with 24-EBL caused the manifestation of the effect of oxidative stress. It is noted that the effect of synergism of stressprotective influence of SNP and 24-EBL at their use in rather low concentration can be bound to the intensifying of the signal transduction of brassinosteroids to the genetic apparatus at the additional influx of NO, which is one of the mediators in realization of physiological action 24-EBL, into the cells. At the same time the cotreatment with SNP and 24-EBL in high concentration led to the accumulation of hydrogen peroxide and products of lipid peroxidation.

Key words: *Triticum aestivum*, nitric oxide (NO), 24-epibrassinolide, heat resistance, redox homeostasis, hydrogen peroxide, malonic dialdehyde

КОМБИНИРОВАННОЕ ДЕЙСТВИЕ НИТРОПРУССИДА НАТРИЯ И 24-ЭПИБРАССИНОЛИДА НА РЕДОКС-ГОМЕОСТАЗ И ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТЬ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ

М. А. Шкляревский, Ю. В. Карпец, А. А. Луговая, Е. И. Горелова

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

E-mail: plant_biology@ukr.net

Браassinостероиды являются одним из ключевых классов фитогормонов, задействованных в адаптации растений к действию неблагоприятных факторов. Их эффекты реализуются с участием сигнальных посредников, в том числе активных форм кислорода и азота. Оксид азота (NO) способен индуцировать различные адаптивные реакции растений. В то же время физиологические эффекты комбинированного воздействия на растения доноров NO и экзогенных браassinостероидов почти не исследованы. Изучали раздельное и комбинированное влияние обработки семян или корней проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) донором NO нитропруссидом натрия (НПН) и 24-эпибрасинолидом (24-ЭБЛ) в широком диапазоне концентраций на их теплоустойчивость и показатели редокс-гомеостаза. НПН в концентрациях диапазона 0,2-2 mM вызывал повышение устойчивости проростков к повреждающему прогреву. Такой же эффект оказывала обработка проростков или семян 24-ЭБЛ в концентрациях 20-200 nM. Комбинированная обработка проростков или семян двумя соединениями в низких концентрациях (0,2 mM НПН и 20 nM 24-ЭБЛ) оказывала наибольшее защитное действие, которое превосходило влияние оптимальных концентраций каждого из соединений. Обработка проростков НПН и 24-ЭБЛ или их комбинацией в оптимальной концентрации вызывала транзиторное повышение содержания пероксида водорода (H₂O₂) в корнях. В то же время высокие концентрации этих веществ и особенно их комбинации вызвали более длительный эффект увеличения количества H₂O₂ в корнях. Обработка семян 24-ЭБЛ в высоких концентрациях и ее сочетание с НПН также вызывали увеличение содержания пероксида водорода в корнях. НПН в умеренных концентрациях и его комбинация с 24-ЭБЛ несколько снижали содержание малонового диальдегида в корнях, в то же время высокие концентрации донора NO

КОМБІНОВАНА ДІЯ НІТРОПРУСИДУ НАТРІЮ ТА 24-ЕПБРАСИНОЛІДУ

и особенно их сочетание с 24-ЭБЛ вызывали проявление эффекта окислительного стресса. Отмечается, что эффект синергизма стресс-протекторного действия НПН и 24-ЭБЛ при использовании их в относительно низких концентрациях может быть связан с усилением трансдукции сигнала brassinosterоидов в генетический аппарат при дополнительном поступлении в клетки NO, который является одним из посредников в реализации физиологического действия 24-ЭБЛ. Однако комбинированная обработка НПН и 24-ЭБЛ в высоких концентрациях приводила к накоплению пероксида водорода и продуктов пероксидного окисления липидов.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, оксид азота (NO), 24-эпибрасинолид, теплоустойчивость, редокс-гомеостаз, пероксид водорода, малоновый диальдегид