

УДК 581.1

## ИНДУЦИРОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ И ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТИ КОЛЕОПТИЛЕЙ ПШЕНИЦЫ ДОНОРОМ СЕРОВОДОРОДА: СВЯЗЬ ЭФФЕКТОВ С ОБРАЗОВАНИЕМ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

© 2017 г. Ю. Е. Колупаев, Е. Н. Фирсова,  
Т. О. Ястреб, Н. В. Швиденко

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

Исследовали влияние донора сероводорода гидросульфида натрия на теплоустойчивость колеоптилей пшеницы и показатели, характеризующие образование и обезвреживание активных форм кислорода (АФК). Обработка отрезков колеоптилей NaHS в концентрациях от 50 до 500 мкМ увеличивала процент их выживания после повреждающего прогрева в водяном термостате (43°C, 10 мин). Под влиянием донора сероводорода отмечалось транзитное усиление образования колеоптилями АФК – супероксидного анион-радикала и пероксида водорода. Обработка колеоптилей пшеницы гидросульфидом натрия вызывала повышение активности антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы, каталазы и гваяколпероксидазы. Все исследуемые эффекты донора сероводорода нивелировались предварительной обработкой колеоптилей антиоксидантом с антирадикальным действием ионолом и сквенджером H<sub>2</sub>S гидроксиламином. Сделано заключение об участии АФК в качестве сигнальных посредников при индуцировании антиоксидантной системы клеток колеоптилей пшеницы и их теплоустойчивости экзогенным сероводородом.

**Ключевые слова:** *Triticum aestivum*, сероводород, сигнальные посредники, активные формы кислорода, антиоксидантные ферменты, теплоустойчивость

Сероводород (H<sub>2</sub>S), который ранее изучался в основном как внешний токсикант, оказывающий вредное влияние на живые организмы (Calvert et al., 2010), в последние годы рассматривается в качестве одной из сигнальных молекул в клетках растений и животных (Hou et al., 2013; Hancock, Whiteman, 2014). Показано существование нескольких путей синтеза H<sub>2</sub>S в клетках растений: из L- и D-цистеина с участием L/D-цистеиндесульфгидраз (Guo et al., 2016), из сульфита при действии сульфитредуктазы с использованием восстановителя ферредоксина (Li et al., 2013). Выявлено усиление экспрессии генов ферментов, синтезирующих сероводород, и повышение его эндогенного содержания при действии на растения засухи, засоления, тяжелых металлов, что свидетельствует о его возможной роли в формировании ответных реак-

ций растений на действие стрессоров (Jin et al., 2011; Fang et al., 2014; Lai et al., 2014). С предположением о роли H<sub>2</sub>S как посредника в процессах активации адаптивных реакций хорошо согласуются многочисленные данные об индуцировании устойчивости растений к стресс-факторам различной природы экзогенным сероводородом. Так, показано повышение устойчивости батата к осмотическому стрессу (Zhang и др. 2009), холодоустойчивости винограда (Fu et al., 2013), теплоустойчивости кукурузы (Li, Zhu, 2014), солеустойчивости пшеницы и люцерны (Bao et al., 2011; Wang et al., 2012) под влиянием доноров H<sub>2</sub>S.

Установлена и природа отдельных защитных реакций растений, индуцируемых действием сероводорода. Так, во многих работах показано усиление экспрессии генов и повышение активности антиоксидантных ферментов под влиянием H<sub>2</sub>S (Wang et al., 2012; Fu et al., 2013; Lai et al., 2014). Зарегистрированы и эффекты индуцирования донорами H<sub>2</sub>S накопления в растительных клетках низкомолекуляр-

---

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

## ИНДУЦИРОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ

ных протекторов – сахаров (Shi et al., 2013), пролина (Lisjak et al., 2013), бетаина (Li, Zhu, 2014), а также синтеза стрессовых белков (Christou et al., 2014).

Вполне естественно, что физиологические эффекты сероводорода в клетках растений реализуются с участием других сигнальных посредников. В частности, получены данные о повышении содержания оксида азота (NO) при действии на растения гидросульфида натрия (Singh et al., 2015) и снятии его стресс-протекторных эффектов скавенджерами оксида азота (Wang et al., 2012). Изучается и функциональное взаимодействие между H<sub>2</sub>S и активными формами кислорода (АФК). Например, индуцированное засухой образование сероводорода в листьях арабидопсиса устранялось антиоксидантом аскорбиновой кислотой и ингибитором НАДФН-оксидазы дифенилениодонием (Wang, 2012). Также у мутантов по генам отдельных форм НАДФН-оксидазы *atrbohD*, *atrbohF*, *atrbohD/F* не проявлялось усиления образования сероводорода в условиях засухи (Hancock, Whiteman, 2014). Показано увеличение содержания пероксида водорода в замыкающих клетках устьиц под влиянием донора сероводорода гидросульфида натрия, которое необходимо для изменения ионных потоков, обуславливающих закрытие устьиц (Wang et al., 2015). Недавно установлено участие АФК в реализации защитного влияния NaHS на клетки корней арабидопсиса при солевом стрессе (Li J. et al., 2014). Выявлено, что скавенджер пероксида водорода диметилглиомочевина и ингибитор НАДФН-оксидазы дифенилениодонием устраняли положительное влияние донора сероводорода на состояние мембран, ростовые процессы и поддержание ионного гомеостаза в условиях действия 100 мМ NaCl. С другой стороны, есть данные и об антагонистических отношениях между АФК и H<sub>2</sub>S. Показана возможность ослабления сигналов АФК под влиянием сероводорода за счет индуцирования им антиоксидантной системы, вовлечения в синтез глутатиона, а также прямого его взаимодействия с супероксидным и гидроксильным радикалами, пероксидом водорода (Li, Lancaster, 2013; Hancock, Whiteman, 2014).

В целом же прямые данные об участии АФК как сигнальных посредников в реализации стресс-протекторного действия экзогенного сероводорода пока получены лишь в единичных работах. В частности, остается неизученным возможное участие АФК в формировании теплоустойчивости растений под влиянием

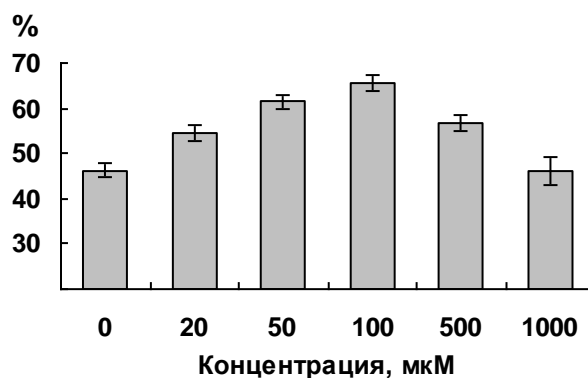
экзогенного сероводорода (Li et al., 2014; Li, Zhu, 2014), хотя есть сведения о повышении содержания сероводорода при индуцировании теплоустойчивости проростков кукурузы пероксидом водорода (Li et al., 2015).

Целью работы было изучение влияния донора сероводорода на активность антиоксидантных ферментов и теплоустойчивость растительных клеток в связи с изменением содержания АФК. Исследования проводили на отрезках колеоптилей пшеницы, которые состоят из однородных клеток и используются как модельный объект для изучения клеточных механизмов устойчивости (Мелехов и др., 1983), а также являются чувствительными ко многим экзогенным соединениям и позволяют оценивать генерацию супероксидного анионрадикала клеточной поверхностью методом разрушающего контроля (Колупаев и др., 2013).

## МЕТОДИКА

Семена пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Досконала обеззараживали в течение 40 мин 6% раствором пероксида водорода, тщательно промывали стерильной дистиллированной водой и проращивали в темноте при температуре 20°C. Базальные части колеоптилей, отделенных от 4-суточных проростков, выдерживали в течение 2 ч на дистиллированной воде для снятия эффекта «раневого стресса» (Колупаев и др., 2013), после чего переносили в чашки Петри с основной средой инкубации – простерилизованным 2% раствором сахарозы с добавлением Na-соли пенициллина (100 тыс. ед./л, контроль). Через 3 ч после инкубации колеоптилей на этой среде в чашки с соответствующими вариантами вносили гидросульфид натрия (NaHS) в конечных концентрациях от 20 мкМ до 1 мМ и выдерживали колеоптили в течение 24 ч, отрезки контрольного варианта инкубировали на 2% растворе сахарозы с добавлением пенициллина.

В отдельных сериях опытов колеоптили обрабатывали скавенджером сероводорода гидроксиламином (200 мкМ) или антиоксидантом ионолом (5 мкМ). В вариантах с комбинированной обработкой эти соединениями добавляли в среду инкубации колеоптилей за 2 ч до внесения в нее NaHS. Концентрации указанных соединений, при которых нивелировались физиологические эффекты донора сероводорода, но не проявлялось видимое токсическое влияние на клетки колеоптилей, выбирали на основании предварительных опытов.



**Рис. 1. Концентрационная зависимость влияния гидросульфида натрия на выживание колеоптилей (%) после повреждающего прогрева (43°C, 10 мин).**

После суточной инкубации колеоптилей в растворах исследуемых отрезки подвергали потенциально летальному прогреву в водяном ультратермостате в стерильной дистиллированной воде в течение 10 мин при  $43,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$  (Колупаев и др., 2013). Затем колеоптиль помещали в чашки Петри со стерильным 2%-ным раствором сахарозы и пенициллина. Через 2 сут оценивали их повреждение по потере тургора и появлению специфического оттенка, обусловленного инфильтрацией тканей.

Генерацию супероксидных анион-радикалов ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) отрезками колеоптилей определяли по восстановлению нитросинего тетразолия (НСТ), как описано ранее (Колупаев и др., 2013). По 15 отрезков помещали в пробирки с 5 мл 0,1 М К,Na-фосфатного буфера (рН 7,6), содержавшего 0,05% нитросинего тетразолия, 10 мкМ ЭДТА, 0,1% Тритона X-100. Пробы в течение 1 ч встряхивали на шейкере (120 об./мин), после чего определяли оптическую плотность инкубационного раствора при длине волны 530 нм. Для проверки специфичности генерации в специальных опытах в пробы добавляли супероксиддисмутазу (СОД, 50 ед./мл). СОД ингибировала генерацию супероксидного анион-радикала не менее, чем на 90%. В связи с этим считали, что количество восстановленного НСТ определяется количеством супероксидного анион-радикала. Супероксид-продуцирующую активность оценивали как изменение оптической плотности реакционной смеси за 1 ч инкубации в расчете на один отрезок. За 100% принимали величину в контрольном варианте в первой временной точке наблюдений.

Активность антиоксидантных ферментов определяли по методикам, подробно описан-

ным ранее (Карпец и др., 2014). Навески колеоптилей гомогенизировали на холоде в 0,15 М К,Na-фосфатного буфера (рН 7,6), содержавшего ЭДТА (0,1 мМ) и дитиотрейтол (1 мМ). Для анализа использовали супернатант после центрифугирования гомогената при 8000 g в течение 10 мин при  $4^\circ\text{C}$ . Активность цитозольной супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1) определяли при рН 7,6, используя метод, основанный на способности фермента конкурировать с тетразолием нитросиним за супероксидные анионы, образующиеся вследствие аэробного взаимодействия НАДН и феназинметосульфата. Активность каталазы (КФ 1.11.1.6) анализировали при рН 7,0 по количеству разложившегося пероксида водорода за единицу времени. Активность гваяколпероксидазы (ГПО, КФ 1.11.1.7) определяли при рН 6,2, используя в качестве донора водорода гваякол, в качестве субстрата – пероксид водорода.

Эксперименты воспроизводили независимо 2-4 раза при 4-5-кратной повторности в пределах каждого отдельного опыта. На рисунках приведены средние значения и их стандартные ошибки. Кроме случаев, оговоренных специально, обсуждаются различия, достоверные при  $P \leq 0.05$ .

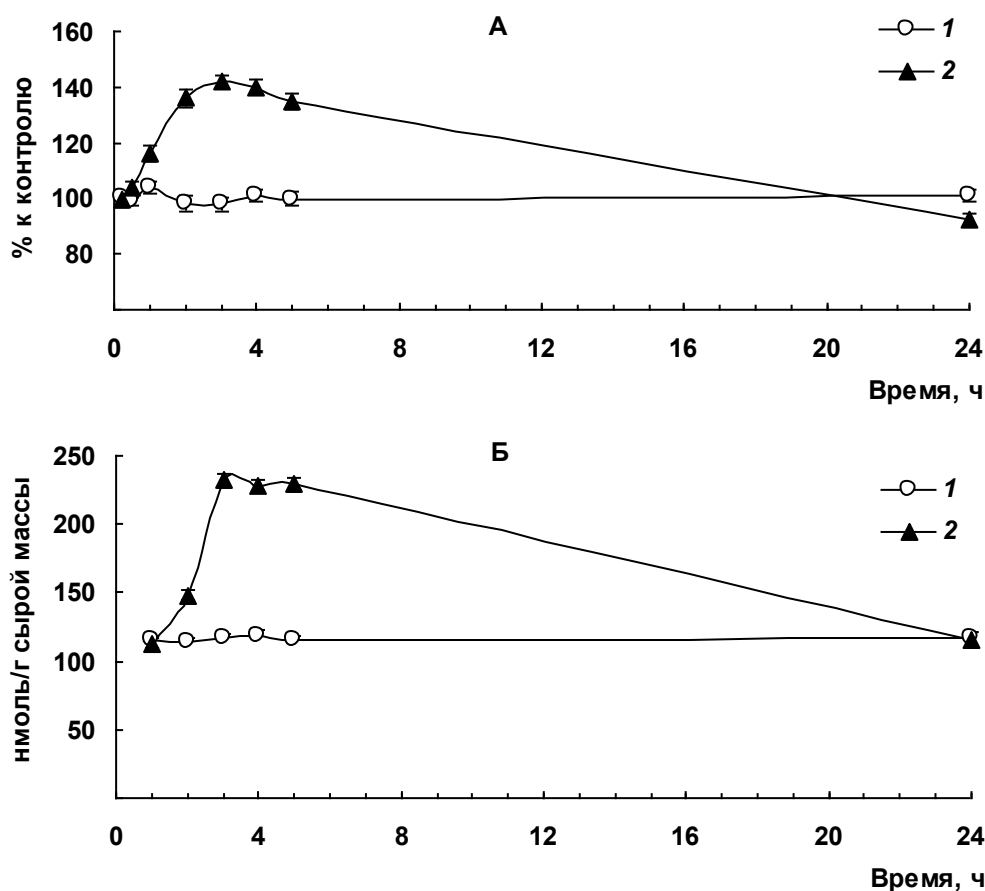
## РЕЗУЛЬТАТЫ

Обработка колеоптилей пшеницы донором сероводорода гидросульфидом натрия в концентрациях 50-500 мкМ вызывала повышение их выживания после повреждающего прогрева (рис. 1). Максимальный эффект проявлялся при использовании концентрации 100 мкМ. При повышении концентрации NaHS до 1 мМ его положительное влияние на теплоустойчивость колеоптилей пшеницы не проявлялось.

В дальнейших экспериментах донор сероводорода использовали в концентрации, максимально повышающей выживание колеоптилей после теплового стресса – 100 мкМ.

Генерация супероксидного анион-радикала колеоптилями в контроле в течение 24 ч эксперимента существенно не изменялась (рис. 2, А). Обработка отрезков донором  $\text{H}_2\text{S}$  вызывала усиление генерации  $\text{O}_2^{\cdot-}$  колеоптилями пшеницы. Этот эффект достоверно проявлялся через 2 ч после начала обработки, через 3-4 ч отмечались максимальные величины образования супероксидного анион-радикала колеоптилями пшеницы (рис. 2, А). В то же время через 24 ч после начала инкубации колеоптилей на растворе донора сероводорода генерация

## ИНДУЦИРОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ



**Рис. 2.** Динамика генерации супероксидного анион-радикала (А) (% к контролю) и содержания пероксида водорода (Б) (нмоль/г сырой массы) в coleoptiliaх пшеницы. 1 – контроль; 2 – NaHS (100 мкМ).

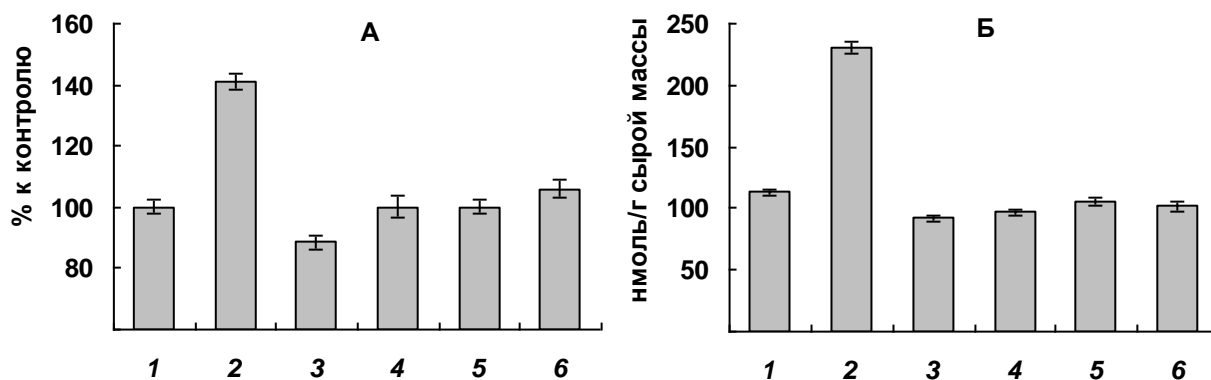
$O_2^{\cdot-}$  становилась даже несколько меньше, чем в контроле.

Динамика содержания пероксида водорода в coleoptiliaх пшеницы во многом совпадала с динамикой генерации  $O_2^{\cdot-}$ . Так, в контроле в период наблюдений содержание  $H_2O_2$  практически не изменялось, в то же время в coleoptiliaх, инкубируемых на среде с донором сероводорода, отмечалось существенное повышение количества пероксида водорода через 3-5 ч после начала воздействия  $H_2S$  (рис. 2, Б). Через 24 ч инкубации coleoptilей содержание  $H_2O_2$  в опытном варианте не отличалось от контрольного. Таким образом, усиление образования АФК (супероксидного анион-радикала и пероксида водорода), вызываемое обработкой coleoptilей донором сероводорода, было транзиторным.

Эффекты усиления образования супероксидного анион-радикала и повышения содержания пероксида водорода в coleoptiliaх, индуцируемые донором  $H_2S$ , устранялись обра-

боткой антиоксидантом антирадикального действия ионолом (рис. 3). Следует отметить, что сам по себе ионол также снижал регистрируемые величины генерации coleoptiliaми супероксидного анион-радикала и содержания пероксида водорода. Также усиление образования  $O_2^{\cdot-}$  и  $H_2O_2$ , вызываемое обработкой coleoptilей гидросульфидом натрия, устранялось сквенджером  $H_2S$  гидроксиламином, который сам по себе не влиял на содержание АФК в coleoptiliaх (рис. 3). Эти результаты свидетельствуют о действии гидросульфида натрия на генерацию АФК coleoptiliaми именно как донора сероводорода, а не как соединения, которое может оказывать неспецифическое физиологическое влияние на растительные клетки.

В момент прекращения  $H_2S$ -индуцированного эффекта усиления генерации АФК клетками coleoptilей пшеницы в них отмечалось повышение активности антиоксидантных ферментов (таблица). Так, активность СОД при обработке донором сероводорода



**Рис. 3.** Генерация супероксидного анион-радикала (А) (% к контролю) и содержание пероксида водорода (Б) (нмоль/г сырой массы) в coleoptилях пшеницы после 3 ч обработки гидросульфидом натрия или 5 ч воздействия ионола или гидроксиламина.

Здесь и на рис. 4: 1 – контроль; 2 – NaHS (100 мкМ); 3 – ионол (5 мкМ); 4 – NaHS (100 мкМ) + ионол (5 мкМ); 5 – гидроксилламин (200 мкМ); 6 – NaHS (100 мкМ) + гидроксилламин (200 мкМ).

#### Активность антиоксидантных ферментов в coleoptилях пшеницы при действии гидросульфида натрия, ионола и гидроксиламина

Вариант	СОД, усл. ед./г сырой массы мин)	Каталаза, ммоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /г сырой массы мин)	ГПО, усл. ед./г сырой массы мин)
Контроль	5,42 ± 0,14	1,13 ± 0,03	16,0 ± 0,3
NaHS (100 мкМ)	6,92 ± 0,18	1,31 ± 0,02	20,1 ± 0,4
Ионол (5 мкМ)	5,35 ± 0,15	1,11 ± 0,04	14,6 ± 0,4
NaHS (100 мкМ) + ионол (5 мкМ)	5,83 ± 0,17	1,13 ± 0,04	14,8 ± 0,3
Гидроксилламин (200 мкМ)	5,67 ± 0,16	1,14 ± 0,03	15,6 ± 0,5
NaHS (100 мкМ) + гидроксилламин (200 мкМ)	5,65 ± 0,18	1,15 ± 0,02	15,5 ± 0,2

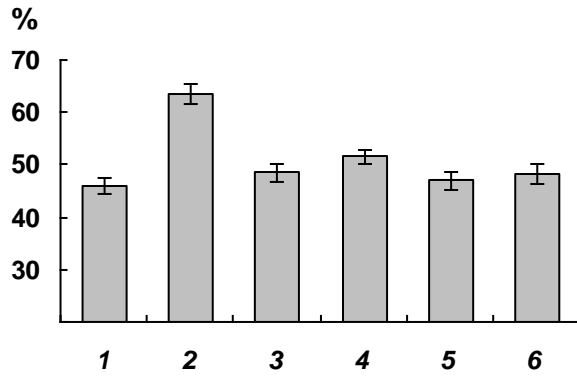
**Примечание.** Время инкубации coleoptилей на среде с добавлением NaHS – 24 ч, ионола или гидроксиламина – 26 ч, в вариантах с комбинированным действием соединений ионол и гидроксилламин вносили в среду инкубации coleoptилей за 2 ч до добавления в нее NaHS.

повышалась на 27, активность каталазы – на 16, а ГПО – на 25% по сравнению с контролем. Ионол и гидроксилламин сами по себе не оказывали существенного влияния на активность указанных ферментов, в то же время как антиоксидант, так и сквенджер сероводорода, устраняли повышение активности антиоксидантных ферментов, вызываемое обработкой coleoptилей донором H<sub>2</sub>S.

Как отмечалось выше, обработка coleoptилей пшеницы гидросульфидом натрия не только индуцировала их ферментативную антиоксидантную систему, но и оказывала влияние на интегральный показатель – теплоустойчивость. При этом положительное влияние донора сероводорода на выживание coleoptилей после повреждающего прогрева нивелировалось их обработкой антиоксидантом ионолом и сквенджером сероводорода гидроксилламином (рис. 4).

## ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе показан эффект повышения устойчивости отрезков coleoptилей пшеницы к повреждающему нагреву после обработки гидросульфидом натрия (рис. 1). Эти результаты согласуются со сведениями о повышении теплоустойчивости культуры клеток табака (Li et al., 2012), проростков кукурузы (Li, Zhu, 2014) и растений клубники (Chitistou et al., 2014) под влиянием донора сероводорода. В указанных работах сообщается о снижении обработкой NaHS вызываемых гипертермией окислительных повреждений растительных клеток (Li et al., 2012; Li, Zhu, 2014), что проявлялось в уменьшении содержания продукта пероксидного окисления липидов малонового диальдегида. Также показано более низкое по сравнению с контролем содержание пероксида водорода в клетках растений, обработанных



**Рис. 4.** Влияние обработки coleoptилей пшеницы NaHS, ионолом, гидросульфидом и комбинациями соединений на их выживание (%) после повреждающего прогрева (43°C, 10 мин).

Обозначения вариантов, как на рис. 3.

перед прогревом донором сероводорода (Chtistou et al., 2014).

В наших экспериментах выявлено транзиторное усиление образования АФК (супероксидного анион-радикала и пероксида водорода) в клетках coleoptилей пшеницы после обработки гидросульфидом натрия (рис. 2). Можно полагать, что это кратковременное увеличение АФК выполняет функции сигнала, индуцирующего антиоксидантную систему. Так, в coleoptилях, обработанных донором сероводорода, через 24 ч зарегистрирована повышенная активность антиоксидантных ферментов: СОД, каталазы и ГПО (таблица). Как вызываемое обработкой донором H<sub>2</sub>S увеличение содержания АФК в клетках coleoptилей, так и повышение активности антиоксидантных ферментов подавлялись предварительным воздействием антиоксидантом ионолом (рис. 3, таблица). Положительное влияние донора сероводорода на выживание coleoptилей после повреждающего прогрева также нивелировалось их предобработкой ионолом (рис. 4). Такие эффекты указывают на роль АФК как сигнальных посредников в индуцировании антиоксидантной системы при действии донора сероводорода. Ранее было показано снятие положительного влияния гидросульфида натрия на солеустойчивость корней арабидопсиса антиоксидантом диметилтиомочевинной и ингибитором НАДФН-оксидазы дифенилениондониумом (Li J. et al., 2014). В связи с этим можно полагать, что усиление генерации АФК в клетках растений под влиянием экзогенного сероводорода происходит с участием НАДФН-оксидазы. В то же время для выяснения роли этого фермента в индуцированном сероводородом образовании АФК

в клетках coleoptилей пшеницы требуются специальные исследования. Также остается пока открытым вопрос о функциональном взаимодействии сероводорода с другими сигнальными посредниками, в первую очередь, с ионами кальция и оксидом азота, которые имеют тесные функциональные связи с АФК (Kolupaev et al., 2015; Singh et al., 2015). Недавно было показано снятие положительного влияния гидросульфида натрия на солеустойчивость растений люцерны (Wang et al., 2012) предварительной обработкой растительного материала скавенджером оксида азота.

Таким образом, в настоящей работе показана причинно-следственная связь между индуцируемым сероводородом повышением содержания АФК в клетках, последующей активацией антиоксидантных ферментов и развитием теплоустойчивости. Однако пока не исследован возможный вклад различных ферментов, генерирующих АФК, в H<sub>2</sub>S-индуцированную активацию антиоксидантных ферментов. Также остается открытым вопрос о роли кальция в трансдукции сигнала сероводорода. В то же время хорошо известно, что кальций может быть причастен к регуляции (активации) НАДФН-оксидазы (Ogasawara et al., 2008), которая может быть одним из основных генераторов «сигнальных» АФК на клеточной поверхности.

## ЛИТЕРАТУРА

- Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е., Луговая А.А., Обозный А.И. Влияние экзогенной жасмоновой кислоты на про-/антиоксидантную систему coleoptилей пшеницы в связи с устойчивостью к гипертермии // Физиология растений. – 2014. – Т. 61, № 3. – С. 367-375.
- Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В., Ястреб Т.О. Coleoptили пшеницы как модельный объект для исследования стресс-протекторного действия экзогенных соединений // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2013. – Вип. 1 (28). – С. 103-108.
- Мелехов Е.И., Рамазанова Л.Х., Васильева А.В. Методы количественной оценки гербицидных повреждений и их модификации // Изв. АН СССР. Сер. биологическая. – 1983. – № 3. – С. 785-788.
- Bao J., Ding T.L., Jia W.J., Wang L.Y., Wang B.S. Effect of exogenous hydrogen sulfide on wheat seed germination under salt stress // Modern. Agric. Sci. Technol. – 2011. – V. 20. – P. 40-42.
- Calvert J.W., Coetzee W.A., Lefter D.J. Novel insights into hydrogen sulfide-mediated cytoprotection // Antioxid. Redox Signal. – 2010. – V. 12. – P. 1203-1217.

- Christou A., Filippou P., Manganaris G., Fotopoulos V. Sodium hydrosulfide induces systemic thermotolerance to strawberry plants through transcriptional regulation of heat shock proteins and aquaporin // BMC Plant Biol. – 2014. – V. 14:42.
- Fang H.H., Pei Y.X., Tian B.H., Zhang L.P., Qiao Z.J., Liu Z.Q. Ca<sup>2+</sup> participates in H<sub>2</sub>S induced Cr<sup>6+</sup> tolerance in *Setaria italica* // Chin. J. Cell. Biol. – 2014. – V. 36. – P. 758-765.
- Fu P.N., Wang W.J., Hou L.X., Liu X. Hydrogen sulfide is involved in the chilling stress response in *Vitis vinifera* L. // Acta Soc. Bot. Pol. – 2013. – V. 82. – P. 295-302.
- Guo H., Xiao T., Zhou H., Xie Y., Shen W. Hydrogen sulfide: a versatile regulator of environmental stress in plants // Acta Physiol. Plant. – 2016. – V. 38:16.
- Hancock J.T., Whiteman M. Hydrogen sulfide and cell signaling: Team player or referee? // Plant Physiol. Biochem. – 2014. – V. 78. – P. 37-42.
- Hou Z., Wang L., Liu J., Hou L., Liu X. Hydrogen sulfide regulates ethylene-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana* // J. Integr. Plant Biol. – 2013. – V. 55. – P. 277-289.
- Jin Z.P., Shen J.J., Qiao Z.J., Yang G.D., Wang R., Pei Y.X. Hydrogen sulfide improves drought resistance in *Arabidopsis thaliana* // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2011. – V. 414. – P. 481486.
- Kolupaev Yu.E., Karpets Yu.V., Dmitriev A.P. Signal mediators in plants in response to abiotic stress: calcium, reactive oxygen and nitrogen species // Cytol. Genet. – 2015. – V. 49. – P. 338-348.
- Lai D.W., Mao Y., Zhou H., Li F., Wu M., Zhang J., He Z., Cui W., Xie Y. Endogenous hydrogen sulfide enhances salt tolerance by coupling the reestablishment of redox homeostasis and preventing salt-induced K<sup>+</sup> loss in seedlings of *Medicago sativa* // Plant Sci. – 2014. – V. 225. – P. 117-129.
- Li J., Jia H., Wang J., Cao Q., Wen Z. Hydrogen sulfide is involved in maintaining ion homeostasis via regulating plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter system in the hydrogen peroxide-dependent manner in salt-stress *Arabidopsis thaliana* root // Protoplasma. – 2014. – V. 251. – P. 899-912.
- Li Q., Lancaster J.R. Chemical foundations of hydrogen sulfide biology // Nitric Oxide. – 2013. – V. 35. – P. 21-34.
- Li Z.G., Luo L.J., Sun Y.F. Signal crosstalk between nitric oxide and hydrogen sulfide may be involved in hydrogen peroxide induced thermotolerance in maize seedlings // Russ. J. Plant Physiol. – 2015. – V. 62. – P. 507-514.
- Li Z.G., Yang S.Z., Long W.B., Yang G.X., Shen Z.Z. Hydrogen sulphide may be a novel downstream signal molecule in nitric oxide-induced heat tolerance of maize (*Zea mays* L.) seedlings // Plant Cell Environ. – 2013. – V. 36. – P. 1564-1572.
- Li Z.G., Yi X.Y., Li Y.T. Effect of pretreatment with hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide on heat tolerance in relation to antioxidant system in maize (*Zea mays*) seedlings // Biologia. – 2014. – V. 69. – P. 1001-1009.
- Li Z.G., Zhu L.P. Hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide-induced accumulation of betaine is involved in the acquisition of heat tolerance in maize seedlings // Braz. J. Bot. – 2014, DOI 10.1007/s40415-014-0106-x
- Lisjak M., Teklic T., Wilson I.D., Whiteman M., Hancock J.T. Hydrogen sulfide: environmental factor or signalling molecule? // Plant Cell Environ. – 2013. – V. 36. – P. 1607-1616.
- Ogasawara Y., Kaya H., Hiraoka G., Yumoto F., Kimura S., Kadota Y., Hishinuma H., Senzaki E., Yamagoe S., Nagata K., Nara M., Suzuki K., Tanokura M., Kuchitsu K. Synergistic activation of the *Arabidopsis* NADPH oxidase AtrbohD by Ca<sup>2+</sup> and phosphorylation // J. Biol. Chem. – 2008. – V. 283. – P. 8885-8892.
- Shi H., Ye T., Chan Z. Exogenous application of hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide enhanced multiple abiotic stress tolerance in bermudagrass (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.) // Plant Physiol Biochem. – 2013. – V. 71. – P. 226-234.
- Singh V.P., Singh S., Kumar J., Prasad S.M. Hydrogen sulfide alleviates toxic effects of arsenate in pea seedlings through up-regulation of the ascorbate-glutathione cycle: possible involvement of nitric oxide // J. Plant Physiol. – 2015. – V. 181. – P. 20-29.
- Wang Y., Li L., Cui W., Xu S., Shen W., Wang R. Hydrogen sulfide enhances alfalfa (*Medicago sativa*) tolerance against salinity during seed germination by nitric oxide pathway // Plant Soil. – 2012. – V. 351. – P. 107-119.
- Wang L., Ma X., Che Y., Hou L., Liu X., Zhang W. Extracellular ATP mediates H<sub>2</sub>S-regulated stomatal movements and guard cell K<sup>+</sup> current in a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent manner in *Arabidopsis* // Sci. Bull. – 2015. – V. 60. – P. 419-427.
- Zhang H., Ye Y.K., Wang S.H., Luo J.P., Tang J., Ma D.F. Hydrogen sulfide counteracts chlorophyll loss in sweet potato seedling leaves and alleviates oxidative damage against osmotic stress // Plant Growth Regul. – 2009. – V. 58. – P. 243-250.

Ποστυπια *ε* *ρε*δακτιο  
16.01.2017 *ε*.

## **ИНДУЦИРОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ**

### **INDUCTION OF ANTIOXIDANT SYSTEM AND HEAT RESISTANCE OF WHEAT COLEOPTILES BY HYDROGEN SULFIDE DONOR: CONNECTION WITH REACTIVE OXYGEN SPECIES FORMATION**

Yu. E. Kolupaev, E. N. Firsova, T. O. Yastreb, N. V. Shvidenko

*V.V. Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University  
(Kharkiv, Ukraine)  
e-mail: plant\_biology@ukr.net*

The effect of hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide on heat resistance of wheat coleoptiles and indicators characterizing formation and neutralization of reactive oxygen species (ROS) was investigated. Processing of coleoptiles segments with NaHS at concentrations of 50 to 500  $\mu\text{M}$  enhanced the percentage of their survival after damage in water thermostat (43°C, 10 min). Under the influence of hydrogen sulfide donor a transient increase in ROS formation by coleoptiles was noted, namely superoxide anion radical and hydrogen peroxide. Treatment of wheat coleoptiles with sodium hydrosulfide caused enhancing activity of antioxidant enzymes like superoxide dismutase, catalase and guaiacol peroxidase. All investigated effects of hydrogen sulfide donor were leveled by pretreatment of coleoptiles with antioxidant with anti-radical action ionol and H<sub>2</sub>S scavenger hydroxylamine. The conclusion was made about ROS participation as signal mediators in the induction of antioxidant system and heat resistance of wheat coleoptiles cells by exogenous hydrogen sulfide.

**Key words:** *Triticum aestivum, hydrogen sulfide, signal mediators, reactive oxygen species, antioxidant enzymes, heat resistance*

## **ІНДУКУВАННЯ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ І ТЕПЛОСТІЙКОСТІ КОЛЕОПТИЛІВ ПШЕНИЦІ ДОНОРОМ СІРКОВОДНЮ: ЗВ'ЯЗОК ЕФЕКТІВ З УТВОРЕННЯМ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ**

Ю. Є. Колупаєв, К. М. Фірсова, Т. О. Ястреб, М. В. Швиденко

*Харківський національний аграрний університет ім. В.В. Докучаєва  
(Харків, Україна)  
E-mail: plant\_biology@ukr.net*

Досліджували вплив донора сірководню гідросульфід натрію на теплостійкість колеоптилів пшениці і показники, що характеризують утворення і знешкодження активних форм кисню (АФК). Обробка відрізків колеоптилів NaHS в концентраціях від 50 до 500 мкМ збільшувала відсоток їх виживаності після ушкоджуючого прогріву в водяному термостаті (43°C, 10 хв). Під впливом донора сірководню відзначалося транзиторне посилення утворення колеоптилями АФК – супероксидного аніон-радикала і пероксиду водню. Обробка колеоптилів пшениці гідросульфідом натрію спричинювала підвищення активності антиоксидантних ферментів – супероксиддисмутази, каталази і гваяколлапероксидази. Всі досліджувані ефекти донора сірководню нівелювалися попередньою обробкою колеоптилів антиоксидантом з антирадикальною дією іонолом і скавенджером H<sub>2</sub>S гідроксиламіном. Зроблено висновок про участь АФК як сигнальних посередників при індукуванні антиоксидантної системи клітин колеоптилів пшениці і їх теплостійкості екзогенним сірководнем.

**Ключові слова:** *Triticum aestivum, сірководень, сигнальні посередники, активні форми кисню, антиоксидантні ферменти, теплостійкість*