

ФІЗИОЛОГІЯ І БІОХІМІЯ РОСЛИН

УДК 581.1

ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ СЕРОВОДОРОДА В ИНДУЦИРОВАННИИ ПУТРЕСЦИНОМ АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ И ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТИ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ

© 2020 г. А. И. Кокорев¹, М. А. Шкляревский¹,
Н. В. Швиденко¹, Ю. Е. Колупаев^{1,2}

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

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

Полиамины в растительных клетках рассматриваются в качестве стрессовых метаболитов, выполняющих не только протекторные, но и регуляторные функции. В частности, они задействованы в регуляции редокс-гомеостаза в целом и активности антиоксидантных ферментов. Роль сигнальных посредников, в том числе сероводорода, в реализации физиологических эффектов полиаминов остается малоизученной. Исследовали возможное участие эндогенного сероводорода в проявлении протекторного действия диамина путресцина на проростки пшеницы (*Triticum aestivum* L.) при тепловом стрессе и активность антиоксидантных ферментов в их корнях. Инкубация корней интактных проростков в среде, содержащей 1 мМ путресцин, вызывала транзиторное усиление генерации сероводорода. Наиболее заметный эффект наблюдался через 2 ч после начала обработки, к 24 ч инкубации содержание сероводорода в корнях снижалось почти до уровня контроля. Обработка корней проростков ингибитором основного фермента синтеза H₂S L-цистеиндесульфгидразы 0,3 мМ пируватом калия частично нивелировала вызываемое путресцином повышение устойчивости проростков к повреждающему прогреву (10 мин при 45°C). Через сутки после теплового стресса в корнях повышалось содержание продукта пероксидного окисления липидов. Такой эффект стресса ослаблялся обработкой проростков путресцином и донором сероводорода и усиливался ингибитором синтеза H₂S. Под влиянием путресцина происходило повышение активности супероксиддисмутазы и каталазы в корнях. Этот эффект полиамина устранялся обработкой проростков пируватом калия. При комбинированной обработке проростков 1 мМ путресцином и 0,1 мМ донором сероводорода NaHS отмечалось дополнительное повышение теплоустойчивости проростков и увеличение активности антиоксидантных ферментов. Сделано заключение о возможном участии сероводорода как посредника при индуцировании путресцином теплоустойчивости проростков пшеницы и их антиоксидантной системы.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, путресцин, сероводород, сигналинг, теплоустойчивость, антиоксидантная система

DOI: <https://doi.org/10.35550/vbio2020.01.044>

Полиамины являются низкомолекулярными органическими соединениями катионной

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

природы, присутствующими во всех компартаментах растительных клеток (Galston et al., 1997; Bouchereau et al., 1999; Кузнецов и др., 2006). Они обладают выраженным стресс-протекторным действием и вовлекаются во многие регуляторные процессы у растений (Кузнецов и др., 2006; Takahashi, Kakehi, 2010;

Kuznetsov, Shevyakova, 2011; Колупаев, Кокорев, 2019).

Считается, что благодаря катионному состоянию полиамины могут оказывать стабилизирующее действие на белки, нуклеиновые кислоты и мембранные структуры в стрессовых условиях (Kaur-Sawhney et al., 2003; Pang et al., 2003). Однако этим их роль в адаптации растений к действию стрессоров не ограничивается. Получены сведения, свидетельствующие о вовлечении полиаминов в клеточный сигналинг у растений, что может быть связано с образованием активных форм кислорода (АФК) и оксида азота при их метаболизме (Pal et al., 2015), модификацией состояния ионных каналов (Dobrovinskaya et al., 1999) и другими механизмами. Сообщается о влиянии полиаминов на экспрессию генов антиоксидантных ферментов (Tanou et al., 2014; Pal et al., 2015). Опрыскивание растений риса спермидином способствовало повышению активности супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, аскорбатпероксидазы и глутатион-S-трансферазы в условиях теплового стресса (Mostofa et al., 2014). При обработке путресцином повышалась активность каталазы и глутатионредуктазы у риса в условиях солевого стресса (Ghosh et al., 2012). У растений нута под влиянием экзогенных полиаминов путресцинового ряда снижалось накопление пероксида водорода и продуктов пероксидного окисления липидов (ПОЛ) при холодовом стрессе (Nauyar, Chander, 2004). Обработка стевии синтетическими полиаминами также вызывала повышение холодоустойчивости, препятствуя проявлению эффектов окислительного стресса листьях (Peunevandi et al., 2018).

Повышение активности антиоксидантных ферментов под действием полиаминов у растений может быть связано с формированием сигнала, индуцирующего антиоксидантную систему. Одними из наиболее вероятных участников такого сигнального процесса могут быть АФК. В нашей предыдущей работе показано, что индуцированию теплоустойчивости проростков пшеницы путресцином и активации антиоксидантных ферментов (СОД, каталазы и гваяколпероксидазы) предшествовало транзитное увеличение содержания пероксида водорода (Kolupaev et al., 2019b). При этом как повышение содержания H_2O_2 , так и активация антиоксидантной системы и развитие теплоустойчивости устранялись скавенджером пероксида водорода диметилтиомочевинной, а также ингибиторами диаминооксидазы аминоксидином и НАДФН-оксидазы имидазолом. Это дало осно-

вание сделать заключение о роли АФК, образующихся с участием, как минимум двух ферментов, в формировании сигнала, индуцирующего защитные реакции.

Однако эффекты АФК как сигнальных посредников обычно реализуются в тесной связи с другими участниками сигнальной сети, в том числе с ключевыми газотрансмиттерами – оксидом азота (NO) и сероводородом (H_2S) (Kolupaev et al., 2019a). Оксид азота может быть продуктом окисления полиаминов полиаминоксидазами (Palavan-Unsal, Arisan, 2009; Pal et al., 2015). Полиамины также могут активировать нитратредуктазу, являющуюся одним из возможных генераторов NO (Shi, Chan, 2014). Формирование под влиянием полиаминов сигнала, включающего в себя АФК и оксид азота, по-видимому, может индуцировать антиоксидантную систему растений (Pal et al., 2015).

В работе Li и соавт. (2016) впервые получены данные, указывающие на роль сероводорода в реализации протекторного действия путресцина на растения ячменя, подвергнутые облучению УФ-В. Обработка растений путресцином, уменьшающая повреждения, вызываемые действием УФ-В, приводила к повышению в листьях содержания сероводорода. При этом защитное влияние путресцина, выражающееся в повышении активности антиоксидантных ферментов и уменьшении окислительных повреждений, устранялось обработкой растений скавенджером H_2S гипотаурином (Li et al., 2016). Этот факт является по сути единственным, указывающим на роль сероводорода как посредника в реализации стресс-протекторного действия путресцина на листья растений. Возможная роль H_2S в генерации путресцином сигналов, индуцирующих устойчивость растений к другим стресс-факторам и формирующихся в других органах (в частности, в корнях), на момент выполнения нашей работы оставалась не исследованной.

В связи с изложенным, цель настоящей работы состояла в изучении возможной роли сероводорода в процессе индуцирования путресцином антиоксидантной системы корней и теплоустойчивости проростков пшеницы.

МЕТОДИКА

Объектом исследования служили этиолированные проростки мягкой озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Досконала. Семена были любезно предоставлены сотрудниками Института растениеводства им В.Я. Юрьева НААН Украины. Зерновки поверхностно обез-

ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ СЕРОВОДОРОДА

зараживали в течение 30 мин в 6% растворе H_2O_2 и проращивали при температуре 20-22°C на очищенной водопроводной воде. На третьи сутки проращивания семян в среду добавляли путресцин в концентрации 1 мМ или донор сероводорода NaHS (0,1 мМ) и выдерживали проростки на этих растворах в течение одних суток. Концентрации этих соединений, индуцирующие развитие теплоустойчивости проростков были установлены ранее (Карпец та ін., 2019; Колупаев et al., 2019b). В отдельных вариантах опыта проростки обрабатывали ингибитором L-цистеиндисульфгидразы пируватом калия (Li et al., 2015) в концентрации 0,3 мМ. Как было установлено в предварительных опытах, пируват в этой концентрации заметно угнетал проявление стресс-протекторного действия путресцина на проростки, но оказывал видимого токсического действия (результаты не приводятся). Инкубация на среде с пируватом составляла 26 ч, в вариантах с комбинированным действием путресцина и пирувата последний добавляли за 2 ч до внесения в раствор путресцина.

Для определения теплоустойчивости проростков их подвергали повреждающему прогреву в водяном ультратермостате при температуре $45,0 \pm 0,1^\circ C$ в течение 10 мин. После этого образцы всех вариантов переносили на очищенную водопроводную воду. Через 3 суток после воздействия повреждающего прогрева оценивали относительное количество выживших проростков (Колупаев и др., 2013).

Для биохимических анализов использовали корни проростков, которые быстро реагируют на действие экзогенных соединений и являются удобным объектом для изучения механизмов изменения редокс-гомеостаза (Колупаев и др., 2013; Часов, Минибаева, 2014).

Активность антиоксидантных ферментов определяли по методикам, подробно описанным ранее (Колупаев и др., 2013; Колупаев et al., 2019b). Навески корней гомогенизировали при температуре не выше $4^\circ C$ в 0,15 М К,Na-фосфатном буфере (рН 7,6) с добавлением ЭДТА (0,1 мМ) дитиотрейтола (1 мМ) и детергента тритона X-100 (конечная концентрация 0,1%). Для анализа использовали супернатант после центрифугирования гомогената при 8000 g в течение 10 мин при $4^\circ C$.

Общую активность СОД (КФ 1.15.1.1) определяли при рН реакционной смеси 7,6, используя метод, основанный на способности фермента конкурировать с тетразолием нитросиним за супероксид-анионы, образующиеся

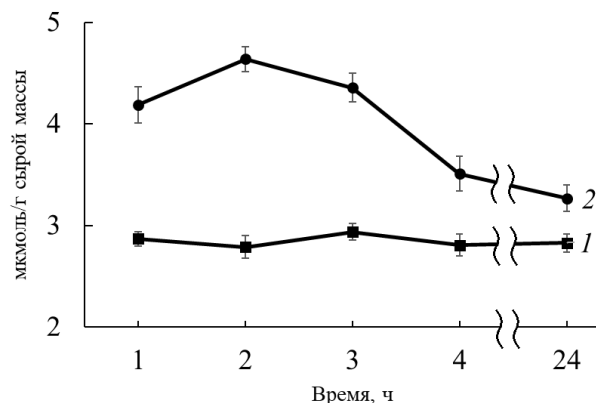


Рис. 1. Динамика содержания сероводорода в корнях проростков пшеницы при обработке путресцином.

1 – контроль; 2 – путресцин (1 мМ).

вследствие аэробного взаимодействия НАДН и феназинметосульфата. Активность каталазы (КФ 1.11.1.6) анализировали при рН реакционной смеси 7,0 по количеству H_2O_2 , разложившегося за единицу времени. Активность гваяколпероксидазы (КФ 1.11.1.7) определяли, используя в качестве донора водорода гваякол, а в качестве субстрата – пероксид водорода. С помощью К,Na-фосфатного буфера рН реакционной смеси доводили до 6,2.

Для определения продуктов ПОЛ, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (в основном малоновый диальдегид – МДА), растительный материал гомогенизировали в реакционной среде, содержащей 0,25% 2-тиобарбитуровую кислоту в 10% ТХУ, гомогенат помещали в кипящую водяную баню на 30 мин. Затем пробы охлаждали и центрифугировали в течение 15 мин при 10000 g. Оптическую плотность супернатанта определяли при длинах волн 532 нм (максимум светопоглощения МДА) и 600 нм (для поправки на неспецифическое светопоглощение) (Фазлиева и др., 2012).

Опыты проводили в 3-4 кратной биологической повторности и каждый опыт воспроизводили независимо не менее трех раз. На рисунках приведены средние величины и их стандартные ошибки. Кроме отдельно оговоренных случаев обсуждаются различия, достоверные при $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Содержание сероводорода в корнях проростков контрольного варианта в течение 24 ч эксперимента достоверно не изменялось (рис. 1). Через 1 ч после начала их обработки путресцином происходило заметное увеличение

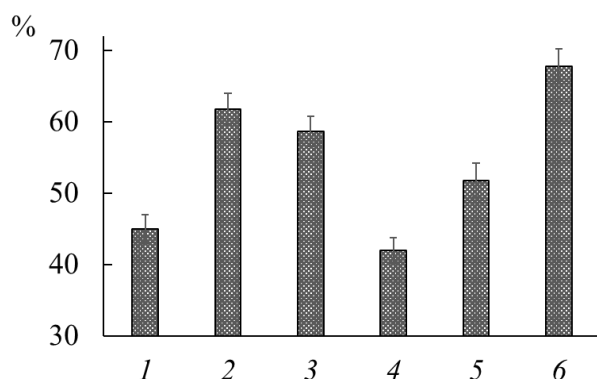


Рис. 2. Теплоустойчивость проростков пшеницы (% выживших после 10 мин прогрева при 45°C) при воздействии путресцина, гидросульфид натрия, пирувата калия и комбинаций указанных соединений.

1 – контроль; 2 – путресцин (1 мМ); 3 – NaHS (0,1 мМ); 4 – пируват калия (0,3 мМ); 5 – путресцин (1 мМ) + пируват калия (0,3 мМ); 6 – путресцин (1 мМ) + NaHS (0,1 мМ).

содержания H_2S в корнях. В течение следующего часа инкубации этот эффект усиливался, а через 4 ч существенно уменьшался. К 24 ч наблюдений содержание сероводорода в корнях проростков в варианте с обработкой путресцином незначительно превышало таковое в контроле (рис. 1). Таким образом, обработка проростков путресцином вызывала транзиторное увеличение содержания H_2S в корнях с максимумом через 2 ч после ее начала.

Инкубация проростков на растворах путресцина и донора сероводорода гидросульфид натрия повышала их выживание после повреждающего прогрева (рис. 2). Обработка проростков ингибитором L-цистеиндесульфгидразы пируватом калия сама по себе не оказывала достоверного влияния на их теплоустойчивость. В то же время при комбинированной обработке с путресцином пируват уменьшал, однако не снимал в полной мере, его стресс-протекторный эффект (рис. 2). При комбинированной обработке проростков путресцином и гидросульфидом натрия отмечалась тенденция к усилению их защитных эффектов. Хотя различия относительного количества выживших проростков в вариантах с путресцином и его комбинацией с NaHS были достоверны только при $P \leq 0,1$.

В течение первых суток после прогрева повреждения проростков не визуализировались, то есть все проростки оставались живыми, что позволило проанализировать содержание продукта ПОЛ МДА. Под влиянием про-

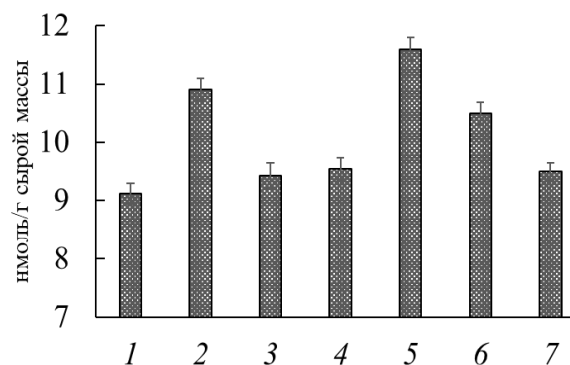


Рис. 3. Содержание МДА в корнях проростков пшеницы, обработанных путресцином, гидросульфидом натрия, пируватом калия и комбинациями указанных соединений, через 24 ч после 10 мин прогрева при 46°C.

1 – контроль (без прогрева); 2 – прогрев; 3 – прогрев + путресцин (1 мМ); 4 – прогрев + NaHS (0,1 мМ); 5 – прогрев + пируват калия (0,3 мМ); 6 – прогрев + путресцин (1 мМ) + пируват калия (0,3 мМ); 7 – прогрев + путресцин (1 мМ) + NaHS (0,1 мМ).

грева его количество в корнях проростков увеличивалось (рис. 3). Обработка путресцином, донором сероводорода и их комбинацией в значительной степени смягчала проявление эффекта окислительного стресса. В варианте с пируватом отмечалась тенденция к усилению накопления МДА в корнях после прогрева проростков, а при комбинированной обработке пируватом и путресцином проявление антиоксидантного действия последнего заметно уменьшалось (рис. 3).

Инкубация проростков на растворах путресцина и донора сероводорода способствовала повышению активности СОД в корнях (рис. 4, А). В варианте с обработкой пируватом калия, наоборот, отмечалась тенденция к ее снижению. При этом обработка проростков ингибитором L-цистеиндесульфгидразы полностью устраняла эффект повышения активности СОД в корнях, вызываемый путресцином. В варианте с комбинированным воздействием путресцина и NaHS активность фермента достоверно не отличалась от величин, которые наблюдались при обработке указанными соединениями по отдельности.

Под влиянием прогрева проявлялась тенденция к увеличению активности СОД в корнях проростков контрольного варианта (рис. 4, А). В корнях проростков, обработанных путресцином и NaHS, повышение активности фермента после прогрева было более существенным. Еще большие значения активности СОД после прогрева отмечались в варианте с комбинированным действием путресцина и донора сероводо-

ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ СЕРОВОДОРОДА

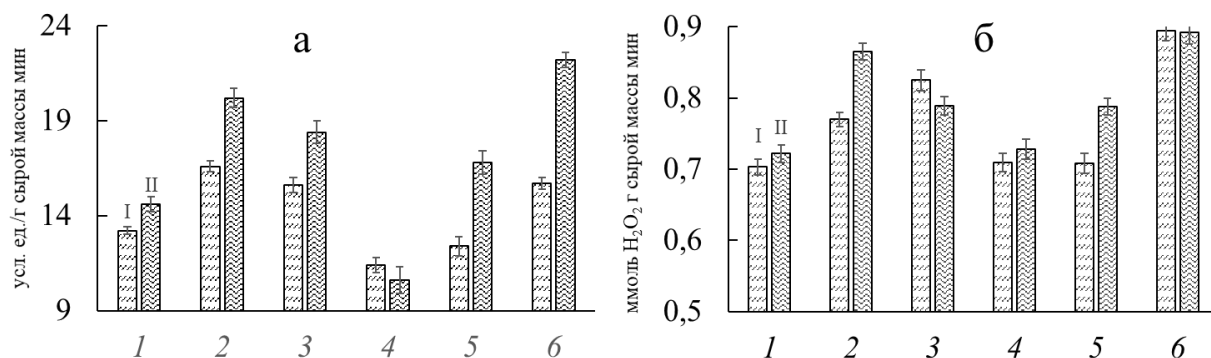


Рис. 4. Активность СОД (а) и каталазы (б) в корнях проростков пшеницы при воздействии путресцина, гидросульфида натрия, пирувата калия и комбинаций указанных соединений. I – до стрессового воздействия; II – через 2 ч после 10 мин прогрева при 45°C.

1 – контроль; 2 – путресцин (1 мМ); 3 – NaHS (0,1 мМ); 4 – пируват калия (0,3 мМ); 5 – путресцин (1 мМ) + пируват калия (0,3 мМ); 6 – путресцин (1 мМ) + NaHS (0,1 мМ).

рода. В то же время в варианте с ингибитором L-цистеиндисульфидгидразы повышения активности фермента после прогрева проростков не происходило. При комбинированной обработке проростков путресцином и пируватом последний на фоне воздействия теплового стресса частично устранял повышение активности СОД, вызываемое путресцином (рис. 4, А).

Активность каталазы в корнях проростков пшеницы под влиянием путресцина и донора сероводорода повышалась (рис. 4, Б). Еще более заметным ее повышение было в варианте с комбинированным действием путресцина и NaHS. Обработка пируватом калия сама по себе существенно не влияла на активность фермента, но полностью устраняла ее повышение, вызываемое действием путресцина.

Тепловой стресс почти не влиял на активность каталазы в корнях проростков контрольного варианта (рис. 4, Б). В варианте с воздействием путресцина после прогрева активность фермента повышалась. В то же время в корнях проростков, обработанных донором сероводорода, а также смесью путресцина и NaHS, активность каталазы после стрессового воздействия существенно не изменялась. Не происходило изменения активности фермента и в корнях проростков, обработанных пируватом калия. При этом ингибитор L-цистеиндисульфидгидразы устранял вызываемое путресцином повышение активности каталазы в корнях проростков, подвергнутых тепловому стрессу (рис. 4, Б).

ОБСУЖДЕНИЕ

В целом, полученные результаты свидетельствуют об участии сероводорода в индуцируемом путресцином развитии теплоустойчивости проростков пшеницы. В частности, нами

зафиксировано повышение содержания сероводорода в корнях под влиянием обработки путресцином. Эффект увеличения активности L-цистеиндисульфидгидразы и содержания сероводорода после 12-часовой обработки путресцином обнаружен в листьях молодых растений ячменя (Li et al., 2016). В нашей работе впервые исследована динамика содержания сероводорода в корнях при обработке путресцином. Обнаруженный транзиторный характер изменения количества H₂S (рис. 1) сам по себе может указывать на его сигнальную роль. Следует отметить, что сведений о характере изменения содержания сероводорода в органах растений при их обработке стрессовыми метаболитами или фитогормонами пока очень мало. Установлен эффект монотонного повышения содержания сероводорода в надземной части проростков кукурузы под влиянием салициловой кислоты при индуцировании ею теплоустойчивости (Li et al., 2015). Увеличение содержания сероводорода и экспрессии гена L-цистеиндисульфидгидразы наблюдалось после 6-часовой обработки изолированных листьев арабидопсиса абсцизовой кислотой (АБК) (Shi et al., 2015). В указанных работах вызываемое путресцином, салициловой кислотой и АБК увеличение содержания сероводорода рассматривают как составляющую трансдукции сигнала, вызывающего повышение устойчивости растительных объектов к стрессорам различной природы: УФ-В (Li et al., 2016), гипертермии (Li et al., 2015), засухе, засолению и холоду (Shi et al., 2015).

Наши результаты показали, по крайней мере, частичное устранение положительного влияния путресцина на теплоустойчивость проростков пшеницы при их обработке ингибитором L-цистеиндисульфидгидразы (рис. 2). Эти ре-

зультаты указывают на возможную роль сероводорода как посредника в индуцировании теплоустойчивости проростков путресцином. В то же время они не исключают наличия альтернативных, не связанных с сероводородом, путей передачи сигнала путресцина. В работе Li и соавт. (2016) показано устранение скавенджером сероводорода гипотаурином протекторного действия путресцина на растения ячменя, подвергнутые облучению УФ-В. Также в присутствии скавенджера сероводорода и ингибитора его синтеза частично подавлялось защитное действие салициловой кислоты на проростки кукурузы при тепловом стрессе (Li et al., 2015).

Показано синергическое позитивное влияние салициловой кислоты и донора сероводорода NaHS на проростки кукурузы при тепловом стрессе (Li, 2015). В наших экспериментах обнаружена лишь тенденция к усилению стресс-протекторного действия путресцина на проростки пшеницы в присутствии донора сероводорода (рис. 2). Возможно, что в условиях используемой экспериментальной модели ключевую роль играло индуцирование путресцином эндогенного синтеза сероводорода, а не его поступление извне.

Одной из причин защитного влияния путресцина на проростки пшеницы при тепловом стрессе может быть предотвращение им вторичного окислительного стресса. Об этом свидетельствует уменьшение накопления МДА в корнях проростков, обработанных путресцином, после теплового стресса (рис. 3). Об участии сероводорода в этом процессе свидетельствует частичное нивелирование защитного эффекта путресцина при обработке растений антагонистами сероводорода.

В свою очередь возможной причиной повышения устойчивости проростков пшеницы к вторичному окислительному стрессу при действии путресцина может быть активация ферментативной антиоксидантной системы. Такой эффект мы наблюдали в отношении СОД и каталазы (рис. 4). При этом ингибитор синтеза H_2S пируват, по крайней мере, частично нивелировал индуцируемое путресцином повышение активности антиоксидантных ферментов. При комбинированном действии путресцина и NaHS на проростки пшеницы активность каталазы повышалась более существенно, чем при обработке каждым соединением по отдельности. Также на фоне теплового стресса отмечалось более существенное повышение активности СОД в корнях проростков пшеницы при совместном действии путресцина и донора се-

роводорода (рис. 4). В работе Li (2015) выявлен синергизм влияния салициловой кислоты и донора сероводорода на активность некоторых антиоксидантных ферментов проростков кукурузы.

В целом же, есть основания полагать, что для реализации физиологических эффектов путресцина в первую очередь имеет значение повышение эндогенного содержания сероводорода как сигнального посредника. Вполне естественно, что в дальнейших исследованиях потребуется выяснить характер взаимодействия сероводорода с другими сигнальными посредниками (АФК, NO, ионами кальция) при индуцировании стрессоустойчивости растений путресцином. Кроме того, представляет интерес выяснение вопроса об участии сероводорода в реализации физиологических эффектов других полиаминов, также проявляющих защитное действие в стрессовых условиях.

ЛИТЕРАТУРА

- Карпещ Ю.В., Колупаев Ю.С., Ястреб Т.О., Горелова О.Л., Шкляревський М.А., Дмитрієв О.П. 2019. Роль активних форм кисню та азоту в індукованні теплостійкості проростків пшениці екзогенним H_2S . Доповіді НАН України. 3 : 89-97.
- Колупаев Ю.Е., Кокорев А.И. Участие полиаминов в регуляции редокс-гомеостаза у растений. Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. 2019. 1 (46) : 6-22. DOI: <https://doi.org/10.35550/vbio2019.01.006>
- Колупаев Ю.Е., Обозный А.И., Швиденко Н.В. 2013. Роль пероксида водорода в формировании сигнала, индуцирующего развитие теплоустойчивости проростков пшеницы. Физиология растений. 60 (2) : 221-229.
- Кузнецов Вл.В., Радюкина Н.Л., Шевякова Н.И. 2006. Полиамины при стрессе: биологическая роль, метаболизм и регуляция. Физиология растений. 53 (5) : 658-683.
- 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.
- Часов А.В., Минибаева Ф.В. 2014. Методические подходы к исследованию редокс-активности апопласта. 2. Регуляция активности пероксидазы. Физиология растений. 61 (5) : 668-675.
- Bouchereau A., Aziz A., Larher F., Martin-Tanguy J. 1999. Polyamines and environmental challenges: recent development. Plant Sci. 140 (2) : 103-125. doi: [org/10.1016/S0168-9452\(98\)00218-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00218-0)
- Dobrovinskaya O.R., Muniz J., Pottosin I. 1999. Inhibition of vacuolar ion channels by polyamines. J.

ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ СЕРОВОДОРОДА

- Membr. Biol. 167 : 127-140. doi: [org/10.1007/s002329900477](https://doi.org/10.1007/s002329900477)
- Galston A.W., Kaur-Sawhney R., Atabella T., Tiburcio A.F. Plant polyamines in reproductive activity and response to abiotic stress. *Bot. Acta.* 1997. 110 : 197-207.
- Ghosh N., Das S.P., Mandal C., Gupta S., Das K., Dey N., Adak M.K. 2012. Variations of antioxidative responses in two rice cultivars with polyamine treatment under salinity stress. *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 18 (4) : 301-313.
- Kaur-Sawhney R., Tiburcio A. F., Altabella T., Galston A.W. 2003. Polyamines in plants: An overview. *J. Cell Mol. Biol.* 2 : 1-12.
- Kolupaev Yu.E., Karpets Yu.V., Beschasniy S.P., Dmitriev A.P. 2019a. Gasotransmitters and their role in adaptive reactions of plant cells. *Cytol. Genet.* 53 (5) : 392-406. <https://doi.org/10.3103/S0095452719050098>
- Kolupaev Yu.E., Kokorev A.I., Yastreb T.O., Horielova E.I. 2019b. Hydrogen peroxide as a signal mediator at inducing heat resistance in wheat seedlings by putrescine. *Ukr. Biochem. J.* 91 (6) : 103-111. doi: <https://doi.org/10.15407/ubj91.06.103>
- Kuznetsov V.I., Shevyakova N.I. 2011. Polyamines and plant adaptation to saline environment. In: *Desert Plants. Biology and Biotechnology.* Ed. Ramawat K.B. Berlin, Heidelberg: Springer : 261-297. Doi: [org/10.1007/978-3-642-02550-1_13](https://doi.org/10.1007/978-3-642-02550-1_13)
- 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](https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1051278)
- Li Z.-G., Xie L.-R., Li X.-J. 2015. Hydrogen sulfide acts as a downstream signal molecule in salicylic acid-induced heat tolerance in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *J. Plant Physiol.* V. 177 : 121-127. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.12.018>
- Li Q., Wang Z., Zhao Y., Zhang X., Zhang S., Bo L., Wang Y., Ding Y., An L. Putrescine protects hullless barley from damage due to UV-B stress via H₂S- and H₂O₂-mediated signaling pathways. *Plant Cell Reports.* 2016. 35 (5) : 1155-1168. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-1952-8>
- Mostofa M.G., Yoshida N., Fujita M. 2014. Spermidine pretreatment enhances heat tolerance in rice seedlings through modulating antioxidative and glyoxalase systems. *Plant Growth Regul.* 73 (1) : 31-44.
- Nayyar H., Chander S. 2004. Protective effects of polyamines against oxidative stress induced by water and cold stress in chickpea. *J. Agron. Crop Sci.* 190 : 355-365. doi: [org/10.1111/j.1439-037X.2004.00106.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2004.00106.x)
- Pal M., Szalai G., Janda T. 2015. Speculation: Polyamines are important in abiotic stress signaling. *Plant Sci.* 237 : 16-23. doi: [10.1016/j.plantsci.2015.05.003](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.05.003)
- Palavan-Unsal N., Arisan D. 2009. Nitric oxide signaling in plants. *Bot. Rev.* 75 : 203-229. Doi: [org/10.1007/s12229-009-9031-2](https://doi.org/10.1007/s12229-009-9031-2)
- Pang X.M., Zhang Z.Y., Wen X.P., Ban Y., Moriguchi T. 2007. Polyamines, all-purpose players in response to environment stresses in plants. *Plant Stress.* 1 (2) : 173-188.
- Peynevandi K.M., Razavi S.M., Zahri S. 2018. The ameliorating effects of polyamine supplement on physiological and biochemical parameters of *Stevia rebaudiana* Bertoni under cold stress. *Plant Production Sci.* 21 (2) : 123-131. Doi: [org/10.1080/1343943X.2018.1437756](https://doi.org/10.1080/1343943X.2018.1437756)
- 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.* Vol. 57 (7) : 628-640. <https://doi.org/10.1111/jipb.12302>
- Shi H., Chan Z. 2014. Improvement of plant abiotic stress tolerance through modulation of the polyamine pathway. *J. Integr. Plant Biol.* 56 (2) : 114-121. doi: [10.1111/jipb.12128](https://doi.org/10.1111/jipb.12128)
- Takahashi T., Kakehi J. 2010. Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses. *Ann Bot.* 105 (1) : 1-6.
- Tanou G., Ziogas V., Belghazi M., Christou A., Filipou P., Job D., Fotopoulos V., Molassiotis A. 2014. Polyamines reprogram oxidative and nitrosative status and the proteome of citrus plants exposed to salinity stress. *Plant Cell Environ.* 37 (4) : 864-885. doi: [10.1111/pce.12204](https://doi.org/10.1111/pce.12204)

REFERENCES

- Karpets Yu.V., Kolupaev Yu.E., Yastreb T.O., Horielova O.I., Shkliarevskiy M.A., Dmitriev O.P. 2019. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the induction of heat resistance of wheat plantlets by exogenous hydrogen sulfide. *Dopov. Nac. akad. nauk Ukr.* 3 : 89-97. doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2019.03.089>
- Kolupaev Yu. E., Kokorev O.I. 2019. Participation of polyamines in regulation of redox homeostasis in plants. *Visn. Hark. nac. agrar. univ. Ser. Biol.* 1 (46) : 6-22. doi: <https://doi.org/10.35550/vbio2019.01.006>
- Kolupaev Yu.E., Oboznyi A.I., Shvidenko N.V. 2013. Role of hydrogen peroxide in generation of a signal inducing heat tolerance of wheat seedlings. *Russ. J. Plant Physiol.* 60 (2) : 227-234. doi: [10.1134/S102144371302012X](https://doi.org/10.1134/S102144371302012X)
- Kuznetsov V.V., Radyukina N.L., Shevyakova N.I. Polyamines and stress: Biological role, metabolism, and regulation. *Russ. J. Plant Physiol.* 53 (5) : 583-604. doi: [10.1134/S1021443706050025](https://doi.org/10.1134/S1021443706050025)
- 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. <https://doi.org/10.1134/S1021443712030065>
- Chasov A.V., Minibayeva F.V. 2014. Methodological approaches for studying apoplastic redox activity: 2. Regulation of peroxidase activity. *Russ. J. Plant Physiol.* 61 (5) : 626-633. <https://doi.org/10.1134/S1021443714050045>
- Bouchereau A., Aziz A., Larher F., Martin-Tanguy J. 1999. Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci.* 140 (2) : 103-125. doi: [org/10.1016/S0168-9452\(98\)00218-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00218-0)
- Dobrovinskaya O.R., Muniz J., Pottosin I. 1999. Inhibition of vacuolar ion channels by polyamines. *J. Membr. Biol.* 167 : 127-140. doi: [org/10.1007/s002329900477](https://doi.org/10.1007/s002329900477)
- Galston A.W., Kaur-Sawhney R., Atabella T., Tiburcio A.F. Plant polyamines in reproductive activity and response to abiotic stress. *Bot. Acta.* 1997. 110 : 197-207.
- Ghosh N., Das S.P., Mandal C., Gupta S., Das K., Dey N., Adak M.K. 2012. Variations of antioxidative responses in two rice cultivars with polyamine treatment under salinity stress. *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 18 (4) : 301-313.
- Kaur-Sawhney R., Tiburcio A. F., Altabella T., Galston A.W. 2003. Polyamines in plants: An overview. *J. Cell Mol. Biol.* 2 : 1-12.
- Kolupaev Yu.E., Karpets Yu.V., Beschasniy S.P., Dmitriev A.P. 2019a. Gasotransmitters and their role in adaptive reactions of plant cells. *Cytol. Genet.* 53 (5) : 392-406. <https://doi.org/10.3103/S0095452719050098>
- Kolupaev Yu.E., Kokorev A.I., Yastreb T.O., Horielova E.I. 2019b. Hydrogen peroxide as a signal mediator at inducing heat resistance in wheat seedlings by putrescine. *Ukr. Biochem. J.* 91 (6) : 103-111. doi: <https://doi.org/10.15407/ubj91.06.103>
- Kuznetsov V.I., Shevyakova N.I. 2011. Polyamines and plant adaptation to saline environment. In: *Desert Plants. Biology and Biotechnology.* Ed. Ramawat K.B. Berlin, Heidelberg: Springer : 261-297. Doi: [org/10.1007/978-3-642-02550-1_13](https://doi.org/10.1007/978-3-642-02550-1_13)
- 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](https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1051278)
- Li Z.-G., Xie L.-R., Li X.-J. 2015. Hydrogen sulfide acts as a downstream signal molecule in salicylic acid-induced heat tolerance in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *J. Plant Physiol.* V. 177 : 121-127. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.12.018>
- Li Q., Wang Z., Zhao Y., Zhang X., Zhang S., Bo L., Wang Y., Ding Y., An L. Putrescine protects hullless barley from damage due to UV-B stress via H₂S- and H₂O₂-mediated signaling pathways. *Plant Cell Reports.* 2016. 35 (5) : 1155-1168. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-1952-8>
- Mostofa M.G., Yoshida N., Fujita M. 2014. Spermidine pretreatment enhances heat tolerance in rice seedlings through modulating antioxidative and glyoxalase systems. *Plant Growth Regul.* 73 (1) : 31-44.
- Nayyar H., Chander S. 2004. Protective effects of polyamines against oxidative stress induced by water and cold stress in chickpea. *J. Agron. Crop Sci.* 190 : 355-365. doi: [org/10.1111/j.1439-037X.2004.00106.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2004.00106.x)
- Pal M., Szalai G., Janda T. 2015. Speculation: Polyamines are important in abiotic stress signaling. *Plant Sci.* 237 : 16-23. doi: [10.1016/j.plantsci.2015.05.003](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.05.003)
- Palavan-Unsal N., Arisan D. 2009. Nitric oxide signaling in plants. *Bot Rev.* 75 : 203-229. Doi: [org/10.1007/s12229-009-9031-2](https://doi.org/10.1007/s12229-009-9031-2)
- Pang X.M., Zhang Z.Y., Wen X.P., Ban Y., Moriguchi T. 2007. Polyamines, all-purpose players in response to environment stresses in plants. *Plant Stress.* 1 (2) : 173-188.
- Peeynevandi K.M., Razavi S.M., Zahri S. 2018. The ameliorating effects of polyamine supplement on physiological and biochemical parameters of *Stevia rebaudiana* Bertoni under cold stress. *Plant Production Sci.* 21 (2) : 123-131. Doi: [org/10.1080/1343943X.2018.1437756](https://doi.org/10.1080/1343943X.2018.1437756)
- 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.* Vol. 57 (7) : 628-640. <https://doi.org/10.1111/jipb.12302>
- Shi H., Chan Z. 2014. Improvement of plant abiotic stress tolerance through modulation of the polyamine pathway. *J. Integr. Plant Biol.* 56 (2) : 114-121. doi: [10.1111/jipb.12128](https://doi.org/10.1111/jipb.12128)
- Takahashi T., Kakehi J. 2010. Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses. *Ann Bot.* 105 (1) : 1-6.
- Tanou G., Ziogas V., Belghazi M., Christou A., Filippou P., Job D., Fotopoulos V., Molassiotis A. 2014. Polyamines reprogram oxidative and nitrosative status and the proteome of citrus plants exposed to salinity stress. *Plant Cell Environ.* 37 (4) : 864-885. doi: [10.1111/pce.12204](https://doi.org/10.1111/pce.12204)

Поступила в редакцию
12.01.2020 г.

ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ СЕРОВОДОРОДА

POSSIBLE ROLE OF HYDROGEN SULFIDE IN INDUCTION OF ACTIVITY OF ANTIOXIDATIVE ENZYMES AND HEAT RESISTANCE OF WHEAT SEEDLINGS BY PUTRESCINE

A. I. Kokorev¹, M. A. Shkliarevskiy¹, N. V. Shvydenko¹, Yu. E. Kolupaev^{1,2}

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

E-mail: plant_biology@ukr.net

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

Polyamines in plant cells are considered as stress metabolites that perform not only protective, but also regulatory functions. In particular, they are involved in general regulation of redox homeostasis and activity of antioxidant enzymes. The role of signaling mediators, including hydrogen sulfide, in the implementation of polyamines' physiological effects remains insufficiently explored. The possible participation of endogenous hydrogen sulfide in the protective effect of diamine putrescine on wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.) under heat stress and activity of antioxidant enzymes in their roots were investigated. Incubation of the roots of intact seedlings in a medium containing 1 mM putrescine caused a transient increase in the hydrogen sulfide generation. The most noticeable effect was observed 2 hours after start of treatment; by 24 hours of incubation, the content of hydrogen sulfide in the roots decreased almost to the control level. Treatment of the roots of seedlings with an inhibitor of the main enzyme for H₂S synthesis L-cysteinylsulfhydrylase, 0,3 mM potassium pyruvate, partially neutralized the putrescine-induced increase in resistance of the seedlings to damaging heating (10 min at 45°C). A day after heat stress, the content of lipid peroxidation product in the roots increased. This stress effect was attenuated by treatment of the seedlings with putrescine and hydrogen sulfide donor and was enhanced by the inhibitor of H₂S synthesis. Under the influence of putrescine, an increase in the activity of superoxide dismutase and catalase in the roots occurred. This effect of polyamine was eliminated by treating seedlings with potassium pyruvate. At the treatment of seedlings with combination of 1 mM putrescine and 0,1 mM hydrogen sulfide donor NaHS an additional increase in the heat resistance of seedlings was noted and also increase in antioxidant enzyme activities. The conclusion is made about the possible participation of hydrogen sulfide as a mediator in the induction by putrescine of the heat resistance of wheat seedlings and their antioxidant system.

Key words: *Triticum aestivum, putrescine, hydrogen sulfide, signaling, heat resistance, antioxidant system*

МОЖЛИВА РОЛЬ СІРКОВОДНЮ В ІНДУКУВАННІ ПУТРЕСЦИНОМ АКТИВНОСТІ АНТИОКСИДАНТНИХ ФЕРМЕНТІВ І ТЕПЛОСТІЙКОСТІ ПРОРОСТКІВ ПШЕНИЦІ

О. І. Кокорев¹, М. А. Шклярєвський¹, М. В. Швиденко¹, Ю. Є. Колупаєв^{1,2}

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

E-mail: plant_biology@ukr.net

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

Поліаміни в рослинних клітинах розглядаються як стресові метаболіти, що виконують не тільки протекторні, а й регуляторні функції. Зокрема, вони задіяні в регуляції редокс-гомеостазу в цілому і активності антиоксидантних ферментів. Роль сигнальних посередників, в тому числі сірководню, в реалізації фізіологічних ефектів поліамінів залишається маловивченою. Досліджували можливу участь ендогенного сірководню в прояві протекторної дії діаміну путресцину на проростки пшениці (*Triticum aestivum* L.) при тепловому стресі і активність антиоксидантних ферментів в їх коренях. Інкубація коренів інтактних проростків в се-

редовищі з додаванням 1 мМ путресцину, спричиняла транзиторне посилення генерації сірководню. Найбільш помітний ефект спостерігався через 2 год після початку обробки, до 24 год інкубації вміст сірководню в коренях знижувався майже до рівня контролю. Обробка коренів проростків інгібітором основного ферменту синтезу H_2S L-цістеїндисульфгідрази 0,3 мМ пируватом калію частково нівелювала спричинюване путресцином підвищення стійкості проростків до ушкоджувального прогріву (10 хв при $45^\circ C$). Через добу після теплового стресу в коренях підвищувався вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів. Такий ефект стресу пом'якшувався обробкою проростків путресцином і донором сірководню і посилювався інгібітором синтезу H_2S . Під впливом путресцину відбувалося підвищення активності супероксиддисмутази і каталази в коренях. Цей ефект поліаміну усувався обробкою проростків пируватом калію. При комбінованій обробці проростків 1мМ путресцином і 0,1 мМ донором сірководню NaHS відзначалося додаткове підвищення теплостійкості проростків і збільшення активності антиоксидантних ферментів. Зроблено висновок про можливу участь сірководню як посередника при індукуванні путресцином теплостійкості проростків пшениці та їх антиоксидантної системи.

Ключові слова: *Triticum aestivum*, путресцин, сірководень, сигналінг, теплостійкість, антиоксидантна система