

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ  
УНІВЕРСИТЕТ ІМ. В.В. ДОКУЧАЄВА  
ІНСТИТУТ БОТАНІКИ ІМ. М.Г. ХОЛОДНОГО НАН УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**ШКЛЯРЕВСЬКИЙ МАКСИМ АНАТОЛІЙОВИЧ**

УДК 581.1:577.13

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**ФУНКЦІОНАЛЬНА ВЗАЄМОДІЯ ФІТОГОРМОНІВ І ГАЗОТРАНСМІТЕРІВ  
ПРИ АДАПТАЦІЇ РОСЛИН ДО АБІОТИЧНИХ СТРЕСОРІВ**

091 Біологія

09 Біологія


Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

 М.А. Шкляревський

Науковий керівник: Карпець Юрій Вікторович, доктор біологічних наук

Київ – 2021

*Всі примірники ідентичні* 

## АНОТАЦІЯ

**Шклярєвський М.А. Функціональна взаємодія фітогормонів і газотрансмітерів при адаптації рослин до абіотичних стресорів.** – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія». – Харківський національний аграрний університет ім. В.В. Докучаєва, Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, Київ, 2021.

Останніми роками значна увага приділяється з'ясуванню функцій газотрансмітерів (сигнальних газоподібних молекул) у рослин. Основними газотрансмітерами вважаються оксид азоту (NO), сірководень (H<sub>2</sub>S) і монооксид вуглецю (CO). Особливо важливі вони для передачі в генетичний апарат клітини стресових сигналів. Проте роль функціональних зв'язків газотрансмітерів між собою та з іншими сигнальними посередниками і стресовими фітогормонами у регуляції адаптивних процесів у рослин дотепер малодосліджена.

Дисертаційна робота присвячена вивченню ефектів функціональної взаємодії ключових газотрансмітерів (NO, H<sub>2</sub>S, CO) між собою, з іншими сигнальними посередниками та окремими компонентами гормональної системи рослин у зв'язку з їх адаптацією до гіпертермії і сольового стресу. Основними завданнями роботи було дослідити вплив донора монооксиду вуглецю геміну на теплостійкість проростків пшениці та функціонування їх антиоксидантної системи і встановити участь активних форм кисню, іонів кальцію та оксиду азоту у реалізації стрес-протекторної дії CO; довести участь сірководню у реалізації стрес-протекторної дії саліцилової кислоти на проростки пшениці за умов гіпертермії; дослідити можливість модифікації впливу брасиностероїду

24-епібрасиноліду на стійкість проростків пшениці до гіпертермії дією донора оксиду азоту; з використанням мутантних ліній арабідопсису *coil* та *jin1* встановити роль компонентів жасмонатного сигналіngu в реалізації стрес-протекторних ефектів газотрансмітерів за дії на рослини арабідопсису сольового стресу.

У дослідженнях використовували рослини пшениці озимої м'якої (*Triticum aestivum* L.) сорту Досконала і арабідопсису (*Arabidopsis thaliana* L.) дикого типу (Col-0) та мутантних ліній *coil* і *jin1*, дефектних за жасмонатним сигналіngом.

Чотиридобові етіюльовані проростки пшениці використовували для дослідження впливу донорів газотрансмітерів та стресових фітогормонів на теплостійкість і функціонування стрес-протекторних систем. Як донор СО використовували гемін у кінцевих концентраціях діапазону 0,05-50 мкМ, донором сірководню слугував гідросульфід натрію – NaHS (0,025-1 мМ), а донором NO – нітропрурид натрію (НПН – 0,1-5 мМ). Вказані сполуки вносили у середовище інкубації проростків і витримували зразки на ньому протягом 24 год.

При дослідженні дії стресових фітогормонів 24-епібрасиноліду (24-ЕБЛ – 5-200 нМ) та саліцилової кислоти (СК – 0,1-50 мкМ) на теплостійкість проростків пшениці та їх біохімічні показники вказані фітогормони також вносили у середовище інкубації і витримували зразки 24 год.

Для оцінки участі сигнальних посередників у реалізації фізіологічних ефектів досліджуваних газотрансмітерів і фітогормонів використовували скавенджер СО гемоглобін (10 мкМ), скавенджери NO РТЮ (0,1 мМ) і метиленовий синій (10 мкМ), скавенджер пероксиду водню диметилтіосечовину (ДМТС, 150 мкМ), інгібітор пероксидази азид натрію (NaN<sub>3</sub>, 1 мМ), інгібітор НАДФН-оксидази імідазол (10 мкМ), хелатор кальцію ЕГТА (500 мкМ), інгібітор утворення інозитол-1,4,5-фосфату неоміцин (200 мкМ), інгібітор нітратредуктази вольфрамат натрію (2 мМ) та інгібітор NO-синтази і діаміноксидази аміногуанідин (1 мМ). Також в експериментах

використовували антагоністи  $H_2S$  (інгібітори L-цистеїндесульфгідрази) 0,3 мМ гідроксиламін і 0,3 мМ піруват калію.

Після обробки досліджуваними сполуками або їх комбінаціями проростки пшениці піддавали ушкоджувальному прогріву у водяному термостаті за температури  $45^{\circ}C$  протягом 10 хв. Через 3 доби після прогріву визначали їх виживаність.

Під час інкубації проростків пшениці на розчинах досліджуваних сполук, а в окремих експериментах і після стресового впливу високої температури визначали біохімічні показники: вміст у коренях проростків пероксиду водню, оксиду азоту, сірководню, малонового діальдегіду (МДА), активність ферментів – супероксиддисмутази (СОД), каталази, внутрішньоклітинної та позаклітинної пероксидази, нітратредуктази.

При дослідженні ролі компонентів жасмонатного сигналіngu у реалізації стрес-протекторних ефектів газотрансмітерів ( $H_2S$ , NO, CO) за дії сольового стресу використовували 4-тижневі рослини арабідопсису дикого типу (Col-0) та лінії, дефектні за жасмонатним сигналіngом – *coil* (мутант за геном, що кодує білок COI1, який бере участь у видаленні білків-репресорів транскрипційних факторів жасмонатного сигналіngu) і *jin1* (мутант за геном JIN1, що кодує білок транскрипційний фактор JIN1/MYC2, необхідний для трансдукції сигналу жасмонової кислоти). Досліджувані сполуки – донор сірководню NaHS (50 мкМ), донор NO НПН (500 мкМ) та донор CO гемін (2 мкМ) – вносили у поживне середовище відповідних варіантів та інкубували на ньому рослини протягом 24 годин. Після цього рослини переносили на поживне середовище без донорів газотрансмітерів, але з додаванням 150 або 175 мМ NaCl. Після 24-годинної інкубації рослин в присутності хлориду натрію середовище змінювали на звичайне.

У зрілих розеткових листках арабідопсису під час експерименту визначали цілісність мембран (за виходом електролітів), водний дефіцит, вміст МДА, вміст хлорофілів і каротиноїдів, кількість осмолітів – проліну і цукрів, активність антиоксидантних ферментів – СОД, каталази і гваяколпероксидази.

При дослідженні впливу екзогенного монооксиду вуглецю на теплостійкість встановлено, що обробка проростків пшениці донором СО геміном індукувала розвиток їх теплостійкості. Однією з причин стрес-протекторної дії донора СО на проростки пшениці, ймовірно, є активація ферментативної антиоксидантної системи. Встановлено, що донор СО підвищував активність СОД, каталази та гваяколпероксидази у коренях проростків пшениці.

Ймовірними посередниками у реалізації стрес-протекторного впливу донора СО на проростки пшениці є іони кальцію, АФК і NO. Ефекти індукування обробкою геміном теплостійкості проростків та підвищення в них активності антиоксидантних ферментів усувалися антагоністами кальцію (ЕГТА і неоміцином) та скавенджером пероксиду водню ДМТС. Також спричинюване донором СО підвищення виживаності проростків після теплового стресу усувалося скавенджером NO РТЮ.

Посилення утворення пероксиду водню в коренях проростків пшениці за дії геміну мало транзиторний характер. Його максимум спостерігався після попереднього підвищення активності позаклітинної пероксидази. Зростання вмісту  $H_2O_2$ , спричинюване донором СО, усувалося інгібітором пероксидази азидом натрію. Підвищення активності пероксидази і вмісту пероксиду водню, індуковане дією геміну, не проявлялося у присутності антагоністів кальцію (ЕГТА і неоміцину) і NO (РТЮ і вольфрамату натрію). Це вказує на роль кальцію і оксиду азоту в посиленні утворення пероксиду водню пероксидазою за дії донора СО на клітини коренів проростків пшениці.

Вміст NO за обробки коренів проростків пшениці геміном також транзиторно зростав. Цей ефект усувався інгібітором нітратредуктази вольфраматом натрію, що свідчить про роль нітратредуктази як основного ферментативного джерела NO, яке активується за дії геміну на клітини коренів проростків пшениці. Водночас процес утворення NO, активований донором СО, виявився залежним від кальцієвого гомеостазу, оскільки усувався дією антагоністів кальцію ЕГТА і неоміцину. З іншого боку, індуковане донором

монооксиду вуглецю підвищення активності нітратредуктази і зростання вмісту NO в коренях проростків пшениці не усувалося антиоксидантом ДМТС. Це свідчить про те, що у сигнальному ланцюгу, активованому монооксидом вуглецю, NO розташований вище від пероксиду водню.

В цілому ймовірний розвиток сигнальних подій у клітинах проростків пшениці у присутності донора CO геміну можна представити так: вплив CO → підвищення  $[Ca^{2+}]_{цит}$  → активація НР → підвищення вмісту NO → активація позаклітинної пероксидази → підвищення вмісту  $H_2O_2$  → активація антиоксидантної та інших протекторних систем → розвиток теплостійкості.

Одним із завдань роботи було дослідження можливої ролі газотрансмітера сірководню як посередника в реалізації протекторного впливу саліцилової кислоти (СК) на проростки пшениці за умов теплового стресу. Встановлено, що обробка проростків СК або NaHS викликала підвищення їх стійкості до ушкоджуючого прогріву. При цьому, під впливом СК відбувалося транзиторне збільшення вмісту сірководню у коренях з максимальним ефектом через 2-3 години після початку обробки. Обробка коренів СК викликала підвищення в них активності СОД, каталази і гваяколпероксидази. Інгібітори синтезу сірководню гідроксиламін та піруват калію частково усували викликані СК ефекти підвищення активності антиоксидантних ферментів і розвитку теплостійкості проростків. У той же час комбінована обробка СК і NaHS сприяла додатковому збільшенню активності антиоксидантних ферментів і підвищенню виживаності проростків пшениці після прогріву.

Для дослідження можливості посилення стрес-протекторної дії 24-ЕБЛ на проростки пшениці за умов гіпертермії оцінювали вплив комбінованої обробки проростків 24-ЕБЛ і донора NO нітропрусиду натрію (НПН) в різних концентраціях. Комбінована обробка 24-ЕБЛ і НПН в оптимальних концентраціях викликала більш істотну захисну дію у порівнянні з обробкою кожною сполукою окремо. У той же час спільна дія високих концентрацій знижувала теплостійкість проростків. Під впливом 24-ЕБЛ і НПН у концентраціях, що чинили захисний вплив, а також їх комбінацій,

підвищувалася активність СОД у коренях. Після прогріву найвищі значення активності СОД зберігалися у варіанті з комбінованою обробкою проростків пшениці 24-ЕБЛ і НПН у низьких концентраціях.

Отже, стрес-протекторна дія фітогормонів СК і БС може бути підсилена їх застосуванням у поєднанні з донорами газотрансмітерів – сірководню і оксиду азоту, відповідно. При цьому донори газотрансмітерів у низьких концентраціях разом з фітогормонами посилювали вплив останніх на одну з ключових захисних систем клітин – антиоксидантну. Це робить перспективною для практичного застосування обробку рослин комбінацією стресових фітогормонів і донорів газотрансмітерів.

Для з'ясування участі ключових білкових компонентів жасмонатного сигналіngu (рецептора жасмонату COI1 і транскрипційного фактора JIN1/MYC2) у реалізації стрес-протекторних ефектів газотрансмітерів порівнювали реакції на сольовий стрес рослин арабідопсису дикого типу (Col-0) і дефектних за жасмонатним сигналіngом мутантів *coil* і *jin1* при їх обробці донорами газотрансмітерів – НПН (NO), NaHS (H<sub>2</sub>S) і геміном (CO).

Донори NO і H<sub>2</sub>S чинили схожий позитивний вплив на солестійкість рослин дикого типу, що виявлялося у зниженні під їх впливом водного дефіциту листків, зменшенні окиснювальних пошкоджень, стабілізації проникності мембран і вмісту хлорофілу за дії 175 мМ NaCl. Також під впливом обробки NaHS і НПН при засоленні у рослин Col-0 підвищувалася активність супероксиддисмутази і каталази, але зменшувалося стрес-індуковане накопичення проліну. Попередня обробка мутантів *coil* і *jin1* донорами NO і H<sub>2</sub>S не запобігала спричинюваному дією NaCl посиленню пероксидного окиснення ліпідів, не сприяла зменшенню проникності мембран і збереженню пулу хлорофілів в стресових умовах. Також в обох мутантів, оброблених NaHS або НПН, не відзначалося підвищення активності СОД і каталази за дії солі. Обробка донорами NO і H<sub>2</sub>S не чинила впливу на величину водного дефіциту і вміст проліну в листках мутанта *jin1*, хоча дещо зменшувала прояв даних показників у мутанта *coil*.

Обробка рослин арабідопсису 2 мкМ геміном пом'якшувала ефект сольового стресу у генотипу дикого типу, але не у *coil* і *jin1*. Також під впливом донора СО відзначалася стабілізація вмісту фотосинтетичних пігментів в умовах сольового стресу у рослин Col-0, але не мутантів за жасмонатним сигналінгом. У рослин арабідопсису дикого типу, оброблених геміном, у відповідь на дію хлориду натрію накопичувалася більша кількість проліну і цукрів порівняно з рослинами генотипів *coil* і *jin1*. Обробка геміном стабілізувала активність каталази і підвищувала активність гваяколпероксидази в стресових умовах у рослин дикого типу.

Отримані результати вказують на залучення компонентів жасмонатного сигналінгу (білків COI1 і JIN1/MYC2) в реалізацію стрес-протекторної дії сірководню, оксиду азоту та монооксиду вуглецю на рослини арабідопсису при сольовому стресі. Водночас механізми їх участі у процесах сигналінгу газотрансмітерів потребують спеціальних досліджень.

Дисертаційне дослідження істотно доповнює фундаментальні знання про механізми функціональної взаємодії між сигнальними посередниками-газотрансмітерами (СО, NO, H<sub>2</sub>S) та окремими стресовими фітогормонами (жасмоновою і саліциловою кислотами та брасиностероїдами). Отримані результати можуть стати теоретичним підґрунтям для розробки нових методів підвищення стійкості рослин пшениці до несприятливих чинників навколишнього середовища, зокрема, високих температур і засолення.

**Ключові слова:** газотрансмітери, монооксид вуглецю, оксид азоту, сірководень, активні форми кисню, кальцій, фітогормони, антиоксидантна система, теплостійкість, солестійкість, *Triticum aestivum*, *Arabidopsis thaliana*

## SUMMARY

**Shkliarevskyi M.A. Functional interaction of phytohormones and gasotransmitters during adaptation of plants to abiotic stressors. – Qualifying scientific work as manuscript.**



Thesis for PhD in Biology for specialty 091 «Biology». – Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University, M.G. Kholodny Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021.

In recent years, much attention has been paid to elucidating the functions of gasotransmitters (signal gaseous molecules) in plants. The main gasotransmitters are nitric oxide (NO), hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S), and carbon monoxide (CO). They are especially important for the transmission of stress signals to a cell's genetic apparatus. However, the role of functional connections of gasotransmitters with each other and with other signaling mediators and stress phytohormones in regulating adaptive processes in plants has been poorly understood.

PhD thesis is devoted to the study of the effects of functional interaction of key gas transmitters (NO, H<sub>2</sub>S, CO) with each other, with other signaling mediators and individual components of the hormonal system of plants in connection with their adaptation to hyperthermia and salt stress. The main objectives of the work were to study the effect of carbon monoxide donor hemin on the heat resistance of wheat seedlings and the functioning of their antioxidant system and to establish the participation of reactive oxygen species, calcium ions, and nitric oxide in implementing stress-protective action of CO; to prove the participation of hydrogen sulfide in implementing the stress-protective effect of salicylic acid on wheat seedlings under conditions of hyperthermia; to study the possibility of modifying the effect of brassinosteroid 24-epibrasinolide on the resistance of wheat seedlings to hyperthermia by the action of nitric oxide donor; using the mutant lines of *Arabidopsis coi1* and *jin1*, to establish the role of jasmonate signaling components in implementing stress-protective effects of gasotransmitters under the action of salt stress on *Arabidopsis* plants.

The studies used wheat plants (*Triticum aestivum* L.) of the Doskonala variety, and wild-type *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana* L.) (Col-0), and mutant lines *coi1* and *jin1*, defective in jasmonate signaling.

Four-day etiolated wheat seedlings were used to study the effect of donors of gasotransmitters and stress phytohormones on heat resistance and the functioning of stress-protective systems. Hemin was used as a CO donor in final concentrations in the range of 0,05-50  $\mu\text{M}$ , sodium hydrosulfide - NaHS (0,025-1 mM) served as a hydrogen sulfide donor, and sodium nitroprusside (SNP – 0,1-5 mM) served as a NO donor. These compounds were added to the incubation medium of seedlings, and the incubation term was 24 hours.

In the effect's study of stress phytohormones 24-epibrasinolide (24-EBL – 5-200 nM) and salicylic acid (SC – 0,1-50  $\mu\text{M}$ ) on the heat resistance of wheat seedlings and their biochemical parameters, these phytohormones were also added to the incubation medium and kept samples for 24h.

To assess the participation of signaling mediators in implementing physiological effects of the studied gasotransmitters and phytohormones used scavenger CO hemoglobin (10  $\mu\text{M}$ ), NO scavengers PTIO (0,1  $\mu\text{M}$ ) and methylene blue (10  $\mu\text{M}$ ), scavenger of hydrogen peroxide dimethylthiourea (DMTU, 150  $\mu\text{M}$ ), peroxidase inhibitor sodium azide ( $\text{NaN}_3$ , 1 mM), NADPH oxidase inhibitor imidazole (10  $\mu\text{M}$ ), calcium chelator EGTA (500  $\mu\text{M}$ ), an inhibitor of inositol-1,4,5-phosphate production neomycin (200  $\mu\text{M}$ ), nitrate reductase inhibitor sodium tungstate (2 mM), NO-synthase and diamine oxidase inhibitor aminoguanidine (1 mM).  $\text{H}_2\text{S}$  antagonists (L-cysteine disulfide inhibitors) 0,3 mM hydroxylamine and 0,3 mM potassium pyruvate were also used in the experiments.

After treatment with the studied compounds or their combinations, wheat seedlings were subjected to damaging heating in a water thermostat at a temperature of 45°C for 10 minutes. Their survival was determined 3 days after heating.

During incubation of wheat seedlings in solutions of studied compounds, and in some experiments after stress exposure to high temperatures, determined biochemical parameters: the content in seedlings' roots of hydrogen peroxide, nitric oxide, hydrogen sulfide, malonic dialdehyde (MDA), enzymes activity – superoxide dismutase, catalase, intracellular and extracellular peroxidase, nitrate reductase.

In the study of the role of jasmonate signaling components in implementing stress-protective effects of gasotransmitters ( $\text{H}_2\text{S}$ , NO, CO) under the action of salt stress used 4-week-old wild-type plants of arabidopsis (Col-0) and lines defective in jasmonate signaling – *coi1* (mutant by gene, encoding the protein COI1, which is involved in the removal of repressor proteins of jasmonate signaling transcription factors) and *jin1* (mutant in the gene JIN1, encoding the protein transcription factor JIN1/MYC2, required for transduction of jasmonic acid signal). Studied compounds – hydrogen sulfide donor NaHS (50  $\mu\text{M}$ ), NO donor SNP (500  $\mu\text{M}$ ), and CO donor hemin (2  $\mu\text{M}$ ) - were introduced into the nutrient medium of the respective variants and the plants were incubated on it for 24 hours. After that, the plants were transferred to a nutrient medium without gasotransmitters donors, but with the addition of 150 or 175 mm NaCl. After 24 hours of incubation of plants in the presence of sodium chloride, the medium was changed to normal.

During the experiment in mature rosette leaves of arabidopsis determined the integrity of membranes (electrolyte yield), water deficiency, MDA content, chlorophylls and carotenoids content, amount of osmolites – proline and sugars, the activity of antioxidant enzymes – SOD, catalase, and guaiacol peroxidase.

In the study of the effect of exogenous carbon monoxide on heat resistance, it was found that treatment of wheat seedlings with CO donor hemin induced the development of their heat resistance. One reason for the stress-protective effect of the CO donor on wheat seedlings is probably the activation of the enzymatic antioxidant system. It was found that the CO donor increased the activity of SOD, catalase, and guaiacol peroxidase in the roots of wheat seedlings.

Probable mediators in implementing the stress-protective effect of the CO donor on wheat seedlings are calcium ions, ROS, and NO. The effects of inducing heat resistance of seedlings by hemin treatment and increasing the activity of antioxidant enzymes in them were eliminated by calcium antagonists (EGTA and neomycin) and hydrogen peroxide scavenger DMTU. The CO donor-induced increase in seedlings' survival after heat stress was also eliminated by the NO scavenger PTIO.

Increased formation of hydrogen peroxide in roots of wheat seedlings under the action of hemin was transient. Its maximum was observed after a previous increase in extracellular peroxidase activity. The increase in  $H_2O_2$  caused by the CO donor was eliminated by the peroxidase inhibitor sodium azide. The increase in peroxidase activity and hydrogen peroxide content induced by the action of hemin was not manifested in the presence of antagonists of calcium (EGTA and neomycin) and NO (PTIO and sodium tungstate). This shows the role of calcium and nitric oxide in enhancing the formation of hydrogen peroxide by peroxidase under the action of the CO donor on wheat seedlings root cells.

The NO content during treatment of wheat seedling roots with hemin also increased transiently. This effect was eliminated by nitrate reductase inhibitor sodium tungstate that shows the role of nitrate reductase as the main enzymatic source of NO, which is activated by the action of hemin on root cells of wheat seedlings. At the same time, the process of NO formation activated by the CO donor turned out to be dependent on calcium homeostasis, as it was eliminated by the action of calcium antagonists EGTA and neomycin. On the other hand, the carbon monoxide donor-induced increase in nitrate reductase activity and increase in NO content in wheat seedling roots was not eliminated by the antioxidant DMTU. This shows that in the signal chain activated by carbon monoxide, NO is located above hydrogen peroxide.

In general, the probable development of signaling events in wheat seedling cells in the presence of a CO donor hemin can be represented as follows: CO effect  $\rightarrow$  increase in  $[Ca^{2+}]_c \rightarrow$  NR activation  $\rightarrow$  increase in NO content  $\rightarrow$  activation of extracellular peroxidase  $\rightarrow$  increase in  $H_2O_2$  content  $\rightarrow$  activation of anti-oxidative and other protective systems  $\rightarrow$  development of heat resistance.

One of the tasks of the work was to study the possible role of the hydrogen sulfide gasotransmitter as a mediator in implementing the protective effect of salicylic acid (SA) on wheat seedlings under heat stress. It was found that the treatment of seedlings with SA or NaHS caused an increase in their resistance to damaging heating. At the same time, under the influence of SA, there was a transient increase in the hydrogen sulfide content in roots with the maximum effect in 2-3

hours after the start of treatment. Treatment of roots with SA caused an increase in the activity of SOD, catalase, and guaiacol peroxidase. Hydrogen sulfide synthesis inhibitors hydroxylamine and potassium pyruvate partially eliminated the SA-induced effects of increasing the activity of antioxidant enzymes and the development of heat resistance of seedlings. At the same time, the combined treatment with SA and NaHS contributed to an additional increase in the activity of antioxidant enzymes and increase the survival of wheat seedlings after heating.

To study the possibility of enhancing the stress-protective effect of 24-EBL on wheat seedlings under conditions of hyperthermia, the effect of combined treatment of seedlings with 24-EBL and NO donor sodium nitroprusside (SNP) in different concentrations was evaluated. The combined treatment of 24-EBL and SNP in optimal concentrations caused a more significant protective effect compared to the treatment of each compound separately. At the same time, the combined effect of high concentrations reduced the heat resistance of seedlings. Under the influence of 24-EBL and SNP in concentrations that had a protective effect, as well as their combinations, the activity of SOD in roots increased. After heating, the highest values of SOD activity were maintained in the variant with the combined treatment of wheat seedlings with 24-EBL and SNP in low concentrations.

Therefore, the stress-protective effect of phytohormones SA and BS can be enhanced by their use in combination with donors of gasotransmitters - hydrogen sulfide and nitric oxide, respectively. At the same time, donors of gasotransmitters in low concentrations together with phytohormones increased the influence of the latter on one of the key protective systems of cells - antioxidant. This makes the treatment of plants with a combination of stress phytohormones and gasotransmitter donors promising for practical use.

In order to study the participation of key protein components of jasmonate signaling (COI1 jasmonate receptor and JIN1/MYC2 transcription factor) in implementing stress-protective effects of gasotransmitters, reactions to salt stress of wild-type *Arabidopsis* plants (Col-0), *coil* and *jin1* mutants under the treatment with

donors of gasotransmitters - SNP (NO), NaHS (H<sub>2</sub>S) and hemin (CO), were compared.

NO, and H<sub>2</sub>S donors had a similar positive effect on the salt resistance of wild-type plants, which was manifested in the reduction under their influence of water deficiency of leaves, reduction of oxidative damage, stabilization of membrane permeability, and chlorophyll content during the influence of 175 mM NaCl. Also under the influence of NaHS and SNP treatment during salinization in Col-0 plants, the activity of superoxide dismutase and catalase increased, but the stress-induced accumulation of proline decreased. Pre-treatment of *coil* and *jin1* mutants with NO and H<sub>2</sub>S donors did not prevent NaCl-induced enhancement of lipid peroxidation, did not reduce membrane permeability, and preserve the chlorophyll pool under stress. Also in both mutants treated with NaHS or SNP, there was no increase in the activity of SOD and catalase under the action of salt. Treatment with NO and H<sub>2</sub>S donors did not affect the amount of water deficiency and the content of proline in leaves of *jin1* mutant, although it somewhat reduced the manifestation of these indicators in *coil* mutant.

The treatment of Arabidopsis plants with 2 μM hemin reduced the effect of salt stress in wild-type genotype, but not in *coil* and *jin1*. Also under the influence of the CO donor, there was a stabilization of the content of photosynthetic pigments under salt stress in Col-0 plants, but not in mutants by jasmonate signaling. Hemin-treated wild-type Arabidopsis plants accumulated more proline and sugars in response to sodium chloride than *coil* and *jin1* genotype plants. Hemin treatment stabilized catalase activity and increased guaiacol peroxidase activity under stress conditions in wild-type plants.

The obtained results indicate the involvement of jasmonate signaling components (COI1 and JIN1/MYC2 proteins) in implementing the stress-protective effect of hydrogen sulfide, nitric oxide, and carbon monoxide on Arabidopsis plants under salt stress. At the same time, the mechanisms of their participation in the signaling processes of gasotransmitters require special studies.

The dissertation research significantly complements the fundamental knowledge about the mechanisms of functional interaction between signaling mediators-gasotransmitters (CO, NO, H<sub>2</sub>S) and separate stress phytohormones (jasmonic and salicylic acids and brassinosteroids). The obtained results can become a theoretical basis for the development of new methods to increase the resistance of wheat plants to adverse environmental factors, in particular, high temperatures and salinity.

**Keywords:** gasotransmitters, carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen sulfide, reactive oxygen species, calcium, phytohormones, antioxidant system, heat resistance, salt resistance, *Triticum aestivum*, *Arabidopsis thaliana*

## ПЕРЕЛІК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Статті у наукових виданнях, що індексовані

#### у наукометричній базі даних Scopus:

1. **Shkliarevskiy, M. A.**, Karpets, Yu. V., Kolupaev, Yu. E., Lugovaya, A. A., & Dmitriev, A. P. (2020). Calcium-Dependent Changes in Cellular Redox Homeostasis and Heat Resistance of Wheat Plantlets under Influence of Hemin (Carbon Monoxide Donor). *Cytology and Genetics*, 54(6), 522–530. (Особистий внесок дисертанта: проведенні експериментів, обробка та інтерпретація результатів, участь у підготовці тексту статті)

2. Karpets, Yu. V., **Shkliarevskiy, M. A.**, Khripach, V. A., & Kolupaev, Yu. E. (2021). State of enzymatic antioxidative system and heat resistance of wheat plantlets treated by combination of 24-epibrassinolide and NO donor. *Cereal Research Communications*, 49, 207–216. DOI: 10.1007/s42976-020-00090-5 (Особистий внесок дисертанта: участь у проведенні експериментів, обробці результатів, підготовці тексту статті)

3. Yastreb, T. O., Kolupaev, Yu. E., **Shkliarevskiy, M. A.**, Dyachenko, A. I., & Dmitriev, A. P. (2020). Involvement of Jasmonate Signaling Components in Salt Stress-Induced Stomatal Closure in *Arabidopsis thaliana*. *Cytology and Genetics*,

54(4), 318–323. (Особистий внесок дисертанта: участь у проведенні експериментів, обробка результатів)

**Статті у наукових фахових виданнях України:**

1. **Шкляревський, М.А.**, Карпець, Ю.В., Лугова, Г.А., & Горелова, О.І. (2019). Комбінована дія нітропрусиду натрію та 24-епібрасиноліду на редокс-гомеостаз і теплостійкість проростків пшениці. *Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія*, 2(47), 71–81. (Особистий внесок дисертанта: участь у проведенні експериментів, обробці та інтерпретації результатів, підготовці тексту статті)

2. **Шкляревський, М. А.**, Тарабан, Д. А., Павлов, Ю. П., & Карпець, Ю. В. (2019). Індукування неспецифічної стійкості сіянців сосни звичайної дією 24-епібрасиноліду. *Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія*, 3(48), 75–86. (Особистий внесок дисертанта: проведення експериментів, обробка та інтерпретація результатів, участь у підготовці тексту статті)

3. **Шкляревський, М. А.**, Колупаєв, Ю. Є., Карпець, Ю. В., Швиденко, М. В., & Дмитрієв, О. П. (2020). Вплив донора монооксиду вуглецю (CO) на теплостійкість проростків пшениці та генерацію ними активних форм кисню. *Доповіді Національної академії наук України*, 8, 73–80. (Особистий внесок дисертанта: проведення експериментів, обробка результатів, участь в їх інтерпретації та підготовці тексту статті)

4. Ястреб, Т. О., **Шкляревський, М. А.**, Колупаєв, Ю. Є., Карпець, Ю. В., & Дяченко, А. І. (2021). *Arabidopsis thaliana* у водній культурі як модельний об'єкт для досліджень фізіологічних ефектів сигнальних посередників і стресових фітогормонів. *Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія*, 1(52), 89–97. (Особистий внесок дисертанта: участь у проведенні експериментів, обробці та інтерпретації результатів)

5. Колупаєв, Ю.Е., Бесчасный, С.П., **Шкляревский, М.А.**, & Карпец, Ю.В. (2020). Монооксид углерода (CO) у растений: участие в клеточном сигналинге и адаптивных реакциях. *Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія*, 2(50), 35–53. (Особистий внесок дисертанта: аналіз і узагальнення даних літератури, участь у підготовці тексту статті)



### Матеріали конференцій:

1. **Shkliarevskiy, M. A.**, Karpets, Yu. V., Kolupaev, Yu. E., Lugova, G. A., & Bessonova, V. P. (2020). Nitric oxide as mediator in induction of heat resistance of wheat seedlings by donor of carbon monoxide hemine. *Сучасні проблеми генетики, біотехнології і біохімії сільськогосподарських рослин. Тези доповідей Міжнародної наукової конференції (Одеса, Україна, 21 жовтня 2020 р.)* (С. 136–137). Одеса: СГІ–НЦНС.

2. **Shkliarevskiy, M. A.**, Kolupaev, Yu. E., Yastreb, T. O., Karpets, Yu. V., & Dmitriev, A. P. (2021). Participation of the jasmonate signaling transcription factor JIN1/MYC2 in implementing protective effects of NO, H<sub>2</sub>S, and CO on Arabidopsis plants under salt stress. *Plants stress and adaptation. Proceedings of the International scientific conference (Kharkiv, Ukraine, February 25-26, 2021)* (pp. 24–25). Kharkiv: KhNAU.

3. **Шкляревский, М. А.**, Карпец, Ю. В., Швиденко, Н. В., & Колупаев, Ю. Е. (2020). Сероводород как возможный посредник индуцирования теплоустойчивости проростков пшеницы экзогенной салициловой кислотой. *Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем. Тезисы докладов Международной научной конференции (Минск, Беларусь, 17–19 июня 2020 г.)* (С. 100). Минск: БГУ.

4. Kolupaev, Yu. E., Karpets, Yu. E., **Shkliarevskiy, M. A.**, & Svidenko, M. V. (2019). Nitric oxide, synthesized by nitrate reductase, as participant of transduction of hydrogen sulphide signal at induction of heat resistance of wheat plantlets. *Proceedings of 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation (Yaremche, Ukraine, June 18-21, 2019)* (P. 126). Lviv: IFNMU.

5. Kolupaev, Yu. E., Karpets, Yu. V., **Shkliarevskiy, M. A.**, Yemets, A. I., & Blume, Ya. B. (2021). Gasotransmitters and plant adaptation to hyperthermia. *Plants stress and adaptation. Proceedings of the International scientific conference (Kharkiv, Ukraine, February 25-26, 2021)* (pp. 14–15). Kharkiv: KhNAU.

## ЗМІСТ

<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ</b>	21
<b>ВСТУП</b>	22
<b>РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ</b>	29
1.1. Функціонування сигнальної мережі рослинних клітин при адаптації до стресових чинників	30
1.2. Газотрансмітери і їх роль в адаптації рослин до абіотичних стресорів	34
1.2.1. Оксид азоту	34
1.2.2. Монооксид вуглецю	38
1.2.3. Сірководень	44
1.3. Гормональна система рослин за дії стресорів	50
1.4. Ключові стресові фітогормони	52
1.4.1. Саліцилова кислота	52
1.4.2. Жасмонова кислота	54
1.4.3. Брасиностероїди	57
Висновки до розділу 1	58
<b>РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛ, УМОВИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ</b>	60
2.1. Матеріал для досліджень, його характеристика і підготовка до експериментів	60
2.1.1. Дизайн експериментів з використанням етіольованих проростків пшениці	60
2.1.2. Дизайн експериментів з використанням рослин <i>Arabidopsis thaliana</i> L.	62
2.2. Визначення фізіологічних і біохімічних показників	64
2.2.1. Вживаність проростків пшениці після ушкоджуючого прогріву	64

2.2.2. Оцінка стану біомембран клітин коренів пшениці після теплового стресу	64
2.2.3. Водний дефіцит листків рослин арабідопсису за умов сольового стресу	64
2.2.4. Вміст фотосинтетичних пігментів у листках арабідопсису	65
2.2.5. Генерація АФК рослинними об'єктами	65
2.2.6. Вміст оксиду азоту	66
2.2.7. Вміст сірководню	66
2.2.8. Активність нітратредуктази	66
2.2.9. Активність позаклітинної пероксидази	67
2.2.10. Активність антиоксидантних ферментів	67
2.2.11. Вміст проліну	68
2.2.12. Вміст цукрів	68
2.2.13. Супутні аналізи	68
2.3. Повторення і статистична обробка результатів	69
<b>РОЗДІЛ 3. МОНООКСИД ВУГЛЕЦЮ І АДАПТАЦІЯ РОСЛИН ДО ГІПЕРТЕРМІЇ</b>	<b>70</b>
3.1. Феноменологія впливу донора CO геміну на теплостійкість проростків пшениці	71
3.2. Вплив донора CO на стан ферментативної антиоксидантної системи	73
3.3. АФК та іони кальцію як посередники у реалізації стрес-протекторного впливу екзогенного CO	75
3.4. Роль оксиду азоту та його взаємодії з іншими посередниками у реалізації стрес-протекторної дії донора CO	88
Висновки до розділу 3	98
<b>РОЗДІЛ 4. УЧАСТЬ ГАЗОТРАНСМІТЕРІВ У РЕАЛІЗАЦІЇ СТРЕС-ПРОТЕКТОРНОЇ ДІЇ НА РОСЛИНИ САЛІЦИЛОВОЇ КИСЛОТИ І 24-ЕБЛ ЗА УМОВ ГІПЕРТЕРМІЇ</b>	<b>101</b>

4.1. Участь сірководню в індукованні теплостійкості проростків пшениці екзогенною саліциловою кислотою	102
4.2. Посилення стрес-протекторної дії на проростки пшениці 24-ЕБЛ донором оксиду азоту за умов гіпертермії	111
Висновки до розділу 4	121
<b>РОЗДІЛ 5. РОЛЬ КОМПОНЕНТІВ ЖАСМОНАТНОГО СИГНАЛІНГУ В РЕАЛІЗАЦІЇ СТРЕС-ПРОТЕКТОРНИХ ЕФЕКТІВ ГАЗОТРАНСМІТЕРІВ ЗА ДІЇ СОЛЬОВОГО СТРЕСУ НА РОСЛИНИ АРАБІДОПСИСУ</b>	123
5.1. Вплив донорів NO і H <sub>2</sub> S на солестійкість рослин арабідопсису, дефектних за компонентами жасмонатного сигналіngu	124
5.2. Вплив геміну на солестійкість рослин арабідопсису дикого типу і мутантів <i>coi1</i> та <i>jin1</i>	133
Висновки до розділу 5	139
<b>УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ</b>	141
<b>ВИСНОВКИ</b>	149
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ</b>	151

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

24-ЕБЛ – 24-епібрасинолід

НО1 – гемоксигеназа-1

L-NAME – N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester

РТЮ – 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide

АБК – абсцизова кислота

АФК – активні форми кисню

БС – брасиностероїди

БТШ – білки теплового шоку

ДМТС – диметилтіосечовина

ДТНБК – 5,5'-дітіобіс-2-нітробензойна кислота

ЕГТА – етиленглікольтетраоцтова кислота

ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота

ЖАК – жасмонова кислота

КФ – класифікація ферментів

МДА – малоновий діальдегід

Ме-ЖАК – метилжасмонат

МС – метиленовий синій

НПН – нітропрусид натрію

НР – нітратредуктаза

НСТ – нітросиній тетразолій

ПО – пероксидаза

ПОЛ – пероксидне окиснення ліпідів

СК – саліцилова кислота

СОД – супероксиддисмутаза

ТХО – трихлороцтова кислота

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Адаптація рослин до дії стресових чинників включає в себе складну функціональну взаємодію між мережею сигнальних посередників і фітогормонів. Нині вважається загально визнаним, що фізіологічні ефекти фітогормонів реалізуються з участю сигнальних посередників (Petrov, Breusegem, 2012; Bartoli et al., 2013). При цьому компоненти сигнальної мережі беруть участь як у передачі первинного (стресового) сигналу, так і в трансдукції в генетичний апарат клітини сигналів фітогормонів (Колупаєв, Косаківська, 2008).

Поряд з іонами кальцію і активними формами кисню (АФК) до посередників з потужним сигнальним потенціалом відносять газотрансмітери – невеликі за розміром газоподібні молекули, що синтезуються ферментними системами і здатні досить легко проникати через мембрани (Peers, Lefter, 2011; Колупаєв et al., 2019d). Ключовими газотрансмітерами вважаються оксид азоту (NO), сірководень ( $H_2S$ ) і монооксид вуглецю (CO). Для рослинних клітин відносно детально досліджена лише роль NO як сигнального посередника.

Водночас відомості стосовно ролі монооксиду вуглецю в регуляції функцій рослинного організму поки що дуже фрагментарні. Описані ефекти посилення його синтезу у рослин в умовах дії деяких стресових чинників, зокрема, зневоднення і засолення (Wei et al., 2013; Verma et al., 2015). Також показані ефекти підвищення стійкості рослин до різних несприятливих дій при обробці газоподібним CO або його донорами (Liu et al., 2010; Zang et al., 2012; Cheng et al., 2018). Проте роль CO в адаптації рослин до стресових температур досліджена дуже слабо. Показано збільшення ендogenous вмісту CO у клітинах тютюну при гіпертермії а також підвищення їх виживаності при додаванні в середовище гематину (Li, Gu, 2016; Cheng et al., 2018). Дані ж про вплив донорів CO на теплостійкість інтактних рослин до теперішнього часу були взагалі відсутні. Відкритим залишається питання про роль інших

компонентів сигнальної мережі в реалізації стрес-протекторної дії монооксиду вуглецю. Поодинокі дослідження вказують на залучення іонів кальцію, АФК і оксиду азоту як посередників у реалізацію ефектів CO (She, Song, 2008; Xie et al., 2008). Однак зв'язки між цими посередниками при індукуванні стійкості рослин дією монооксиду вуглецю дотепер майже не досліджені.

Функціональні зв'язки між фітогормонами і газотрансмітерами, ймовірно, полягають не лише у залученні останніх в передачу в генетичний апарат гормональних сигналів. Є також окремі дані, що вказують на залучення специфічних білкових компонентів гормонального сигналіngu в регуляторні процеси, пов'язані з дією газотрансмітерів. Так, на підставі даних, отриманих методами біоінформатики, зроблено висновок про участь в трансдукції сигналів оксиду азоту білків сімейства MYC, до яких належить ключовий транскрипційний фактор жасмонатного сигналіngu MYC2 (Palmieri et al., 2008). Молекулярно-генетичними методами отримані дані, що вказують на можливість впливу сірководню на експресію гена, що кодує білок-рецептор жасмонату COI1 (Li et al., 2017). Дія гіпертермії на рослини тютюну викликала посилення синтезу CO, що, в свою чергу, посилювало утворення жасмонової кислоти, і, як наслідок, активацію транскрипційного фактора жасмонатного сигналіngu NtMYC2a (Cheng et al., 2018). Таким чином, окремі дані свідчать про функціональні зв'язки білків жасмонатного сигналіngu і газотрансмітерів. Однак спеціальних досліджень ролі жасмонатного сигналіngu в прояві стрес-протекторної дії на рослини газотрансмітерів дотепер не проводилося.

Як зазначалося, газотрансмітери можуть брати участь як посередники в реалізації ефектів фітогормонів, зокрема, саліцилової кислоти і брасиностероїдів (Li et al., 2015b; Gupta, Seth, 2020). Зважаючи на це, можна очікувати, що за певних умов комбінований вплив на рослини фітогормонів і донорів газотрансмітерів призводитиме до прояву ефектів синергізму. Це може бути підґрунтям для створення нових практичних прийомів індукування стійкості рослин комбінованою дією фітогормонів і газотрансмітерів.

З урахуванням викладеного, дослідження, спрямовані на з'ясування ролі функціональних зв'язків газотрансмітерів між собою та з іншими сигнальними посередниками і стресовими фітогормонами у регуляції адаптивних процесів у рослин важливі як для нових фундаментальних знань у галузі стресології, так і для вирішення практичних завдань підвищення стійкості рослин фізіологічно активними речовинами та їх композиціями.

**Мета і завдання досліджень.** Основною метою роботи було дослідити ефекти функціональної взаємодії ключових газотрансмітерів (NO, H<sub>2</sub>S, CO) між собою, з іншими сигнальними посередниками та окремими компонентами гормональної системи рослин у зв'язку з їх адаптацією до двох поширених несприятливих абіотичних чинників – гіпертермії і сольового стресу.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

- Дослідити вплив донора монооксиду вуглецю геміну на теплостійкість проростків пшениці та функціонування їх антиоксидантної системи.
- Встановити участь активних форм кисню, іонів кальцію та оксиду азоту у реалізації стрес-протекторної дії CO.
- Встановити участь сірководню у реалізації стрес-протекторної дії саліцилової кислоти на проростки пшениці за умов гіпертермії.
- Дослідити можливість модифікації впливу брасиностероїду 24-ЕБЛ на редокс-гомеостаз проростків пшениці і їх стійкість до гіпертермії дією донора оксиду азоту.
- З використанням мутантних ліній арабідопсису *coil* та *jin1* встановити роль компонентів жасмонатного сигналінгу в реалізації стрес-протекторних ефектів газотрансмітерів за дії на рослини арабідопсису сольового стресу.

**Об'єкт досліджень:** функціональні зв'язки між газотрансмітерами CO, H<sub>2</sub>S, NO і стресовими фітогормонами – саліциловою і жасмоновою кислотами та брасиностероїдами при формуванні адаптивних реакції рослин на дію абіотичних стресорів.



**Предмет досліджень:** утворення сигнальних посередників (активних форм кисню, оксиду азоту, сірководню), функціонування антиоксидантної та осмопротекторної систем, стійкість рослин до гіпертермії та сольового стресу.

**Методи досліджень:** фізіологічні (кількісна оцінка стану рослин, інгібіторний аналіз), біохімічні (визначення генерації сигнальних посередників – АФК,  $H_2S$ ,  $NO$ , активності ферментів, вмісту пігментів та осмолітів, продуктів ПОЛ МДА), генетичні (використання мутантних ліній арабідопсису *coi1* та *jin1*), статистичні (аналіз і візуалізація результатів з використанням статистичних критеріїв і тестів).

**Наукова новизна.** Вперше встановлено ефект індукування розвитку теплостійкості інтактних рослин (проростків пшениці) дією донора монооксиду вуглецю (геміну) і досліджено участь АФК, іонів кальцію та оксиду азоту в реалізації стрес-протекторних ефектів  $CO$ . Встановлено, що найбільш раннім ефектом, який відбувається за впливу донора  $CO$  на клітини коренів проростків, є кальційзалежне зростання вмісту  $NO$ , асоційоване зі збільшенням активності нітратредуктази. Подальшим сигнальним ефектом  $CO$  є зростання вмісту пероксиду водню в клітинах коренів, пов'язане з підвищенням активності позаклітинної пероксидази.

Показано участь сірководню як сигнального посередника у реалізації стрес-протекторних ефектів саліцилової кислоти на клітини коренів пшениці за впливу гіпертермії. Доведено причинно-наслідковий зв'язок між зростанням вмісту  $H_2S$  і підвищенням активності антиоксидантних ферментів (СОД, каталази, гваяколпероксидази) в коренях проростків пшениці за дії саліцилової кислоти.

Вперше досліджено комбінований вплив стресового фітогормону 24-ЕБЛ і донора сигнальної молекули  $NO$  нітропрусиду натрію (НПН) на теплостійкість проростків пшениці і стан їх антиоксидантної системи. Встановлено, що посилення стрес-протекторної дії 24-ЕБЛ при використанні в комбінації з донором  $NO$  у низьких концентраціях зумовлено стабілізацією про-/антиоксидантної рівноваги у клітинах.

З використанням мутантів арабідопсису *coi1* і *jin1* вперше експериментально доведено, що ключові білки жасмонатного сигналіngu залучені в реалізацію протекторної дії донорів сірководню, оксиду азоту та монооксиду вуглецю за умов сольового стресу.

**Практичне значення.** Дисертаційне дослідження розширює фундаментальні знання про механізми функціональної взаємодії між сигнальними посередниками-газотрансмітерами та окремими стресовими фітогормонами. Отримані результати можуть стати теоретичним підґрунтям для розробки нових методів підвищення стійкості рослин пшениці до несприятливих чинників навколишнього середовища, зокрема, високих температур і засолення. Практичний інтерес становить передусім комбіноване застосування саліцилової кислоти і донорів сірководню, а також брасиностероїдів і донорів оксиду азоту, яке дозволяє посилити стрес-протекторний вплив екзогенних фітогормонів на рослини.

Істотно модифіковано протокол вирощування рослин арабідопсису у малооб'ємній водній культурі з метою її використання для вивчення стрес-протекторної дії фізіологічно активних речовин, що може бути цінним для фундаментальних досліджень та практичного скринінгу біологічної активності природних і синтетичних сполук різної природи.

Результати досліджень використовуються при викладанні загальних і спеціальних курсів з фізіології і біохімії рослин в ХНАУ ім. В.В. Докучаєва і ХНУ ім. В.Н. Каразіна. Вони можуть бути використані при викладанні відповідних курсів в інших класичних, аграрних і педагогічних ЗВО, а також при проведенні досліджень у галузі фізіології стійкості рослин.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертантом самостійно опрацьовано джерела літератури, освоєно відповідні методи досліджень та проведено всі необхідні експерименти. Отримані результати інтерпретовані, узагальнені і підготовлені до публікації за участю наукового керівника. Частина експериментів проведена спільно зі співробітниками кафедри ботаніки та фізіології рослин ХНАУ ім. В.В.Докучаєва д.б.н. Ю.Є. Колупаєвим, к.б.н. Т.О.

Ястреб і Г.А. Луговою, к.с.-г.н. М.В. Швиденком. Експерименти з вивчення участі компонентів жасмонатного сигналінгу у реалізації стрес-протекторної дії газотрансмітерів проводилися спільно з чл.-кор. НАН України О.П. Дмитрієвим (Інститут клітинної біології і генетичної інженерії НАН України). Частка особистої участі здобувача становить понад 70%.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційні дослідження виконувалися в межах двох науково-дослідних тем кафедри ботаніки і фізіології рослин Харківського національного аграрного університету ім. В.В.Докучаєва – «Роль сигнальних посередників і сполук з гормональною активністю у формуванні адаптивних реакцій рослин на абіотичні стресори» (№ держреєстрації 0117U002427; Згідно з наказом Міністерство освіти і науки України № 198 від 10.02.2017) та «Механізми індукування компонентів стрес-протекторної системи рослин» (2016-2020 рр.) (№ держреєстрації 0117U002514), а також гранту за програмою «Grants for Multidisciplinary research teams 2020 of Ministry of Foreign Affairs of the Czech Republic. Direction curator – Czech University of Life Science, Prague» (проєкту Czech Republic Development Cooperation «Платформа AgriSciences для розвитку науки у вищих навчальних закладах України»).

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати дисертаційних досліджень були представлені на 6-му Українському конгресі клітинної біології (Яремче, 2019), Міжнародній науковій конференції «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» (Мінськ, 17-19 липня 2020 р.); Міжнародній науковій конференції «Сучасні проблеми генетики, біотехнології і біохімії сільськогосподарських рослин» (Одеса, 21 жовтня 2020 р.); Міжнародній науковій конференції «Стрес і адаптація рослин» (Харків, 25-26 лютого 2021 р.).

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 13 наукових праць, у тому числі 8 статей у фахових виданнях України та інших країн, з них 3 у журналах, що входять до наукометричної бази SCOPUS.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається зі вступу, п'яти розділів (огляд літератури, опис методів досліджень та використаних об'єктів, три експериментальні розділи), висновків та списку використаних джерел. Робота викладена на 185 сторінках, містить 31 рисунок, 3 таблиці і 2 схеми. Список цитованої літератури нараховує 314 джерел.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Абіотичні стресові чинники є основними обмеженнями для росту і розвитку рослин (Ashraf et al., 2018). Вплив на рослини екстремальних температур, засолення, посухи, важких металів призводить до значних втрат в сільськогосподарській сфері. У зв'язку з глобальними кліматичними змінами та впливом антропогенних факторів актуальність проблеми стійкості рослин дедалі зростає. Як відомо, серед шляхів підвищення стійкості культурних рослин є генетико-селекційний (включно з трансгенезом) та агротехнічний, пов'язаний із застосуванням фізіологічно активних речовин та інших засобів, що індукують фізіологічні механізми стійкості. Для ефективного використання обох підходів необхідне постійне поглиблення фундаментальних знань у галузі стресу і адаптації рослин.

Формування адаптивних реакцій рослин на дію стресорів відбувається за участю мережі сигнальних посередників, серед яких особливу роль відіграють кальцій і активні форми кисню (Kwak et al., 2006; Bartoli et al., 2013). В останні роки до ключових сигнальних речовин відносять і газотрансмітери (He, He, 2014; Kolupaev et al., 2019d; Yao et al., 2019), передусім монооксид азоту (NO), сірководень (H<sub>2</sub>S) і монооксид вуглецю (CO; Wang, Liao, 2016).

Крім сигнальної мережі центральне місце в регуляції адаптивних процесів у рослин посідає гормональна система (Hartung et. al., 1998; Титов, Таланова, 2009). Найчастіше під впливом стресорів в тканинах рослин знижується вміст гормонів стимуляторів росту (ауксинів, гібереліни, цитокініни) і підвищується концентрація гормонів, які вважаються інгібіторами росту (абсцизової кислоти – АБК, етилену, жасмонової кислоти – ЖАК). Ці фітогормони поряд з брасиностероїдами (БС) і саліциловою кислотою (СК) в останні роки називають стресовими гормонами рослин (Колупаев и др., 2016).

Регуляторні процеси, що забезпечують адаптивну відповідь рослинного організму, є результатом складної взаємодії сигнальної мережі і гормональної системи (Bartoli et al., 2013).

В передачі сигналу стресових фітогормонів важливе місце посідають такі посередники як іони кальцію та активні форми кисню (Kwak et al., 2006; Bajguz, Nayat, 2009; Petrov, Breusegem, 2012; Bartoli et al., 2013). Також, останнім часом з'являється все більше даних про участь в цих процесах газотрансмітерів. Однак механізми їх функціональної взаємодії з фітогормонами залишаються слабо вивченими.

### **1.1. Функціонування сигнальної мережі рослинних клітин при адаптації до стресових чинників**

Ключовими сигнальними посередниками, які беруть участь у регуляції фізіологічних процесів, у тому числі адаптивних реакцій, є активні форми кисню (АФК), іони кальцію ( $\text{Ca}^{2+}$ ), цАМФ, компоненти ліпідного сигналінгу (зокрема фосфатидна кислота, діацилгліцерол та ін.; Trewavas et al., 2002; Kaur, Gupta, 2005; Jeandroz et al., 2013; Kolupaev et al., 2015).

Іонізований кальцій є універсальним сигнальним посередником, що бере участь в передачі позаклітинних сигналів до внутрішньоклітинних структур і молекул, а також в генетичний апарат клітин рослин і тварин. За допомогою  $\text{Ca}^{2+}$  забезпечується регуляція безлічі клітинних процесів, включаючи експресію генів, складання та розбирання елементів цитоскелету (Helper, 2016; Bürstenbinder et al., 2017; Medvedev, 2018), поділ клітин, диференціювання, секрецію і апоптоз. Причина таких множинних відповідей клітини полягає, ймовірно, в складній проросторово-часовій організації підйому вмісту внутрішньоклітинного кальцію ( $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал), який, діючи на певні ефектори, ініціює конкретні сигнальні події в клітині (Семенова, 2020). Також кальцієвий сигналінг є головним елементом і в регуляції процесів, що відбуваються на організмовому рівні, таких як ріст і диференціювання (Matschi et al., 2013),

гравітропізм (Tatsumi et al., 2014) і фототропізм (Pedmale et al., 2010), проведення ендосимбіотичних сигналів (Singh, Parniske, 2012; Miller et al., 2013), реакціях, індукованих патогенами (Seybold et al., 2014; Romeis, Herde, 2014; Medvedev, 2018), руху замикаючих клітин продихів (Brandt et al., 2015; Voss et al., 2016; Yang et al., 2017), а також полярний ріст клітин і тканин рослин (Konrad et al., 2011; Helper et al., 2012; Gao et al., 2016; Medvedev, 2017). Зрештою, особливе значення належить кальцію у забезпеченні процесів адаптації рослин практично до всіх стресових впливів (Zeng et al., 2015; Wilkins et al., 2016).

Цитозольний кальцій може слугувати центральною ланкою сигнальної мережі рослинної клітини (Kaur, Gupta, 2005; Johnson et al., 2014). Іони  $\text{Ca}^{2+}$  потрапляють в цитозоль завдяки кальцієвим каналам різних типів. Кальцієві канали поділяються на дві основні групи: потенціалзалежні та ліганд-керовані. Серед перших виділяють  $\text{Ca}^{2+}$ -канали рослин, що активуються при гіперполяризації мембрани (hyperpolarization-activated calcium channels, HACCs) і активуються при деполяризації (depolarization-activated calcium channels, DACCs) (Medvedev, 2018). Кальційпроникні канали, що активуються при гіперполяризації, знайдені в плазмалемі, клітинах корневих волосків, ендодерми, епідерми і кори кореня арабідопсису. Важливою властивістю HACC є їх стимуляція. Критичною особливістю ряду HACC є також їх активація такими АФК, як  $\text{H}_2\text{O}_2$  і гідроксильний радикал ( $\text{HO}\cdot$ ) (Demidchik, Shabala, 2017).  $\text{Ca}^{2+}$ -канали, що активуються деполяризацією, відкриваються, коли мембранний потенціал стає нижчим 100 мВ (Swarbreck et al., 2013). При цьому ефективним механізмом деполяризації часто служить потік аніонів з клітини через аніонні канали плазмалеми (Medvedev, 2018).  $\text{Ca}^{2+}$ -канали, що активуються при деполяризації, мають важливе значення в реакціях-відповідях рослин на зовнішні впливи. Ліганд-керовані канали відкриваються внаслідок взаємодії певного ліганду (вторинного посередника, гормону) зі специфічним рецептором, що входить (або не входить) до складу каналу. У рослинних клітинах знайдені ліганд-керовані кальцієві канали, які активуються

циклічними нуклеотидами, глутаматом, АФК, АДФ,  $IP_3$  і АБК (Ordonez et al., 2014; Medvedev, 2018). У геномі арабідопсису виявлено близько 20 генів, що кодують неселективні канали, активовані циклічними нуклеотидами. Показано, що ці канали залучені в реакції рослин на патогени, адаптацію до абіотичних і біотичних чинників (Medvedev, 2018). Відомі два типи цих каналів - CNG (cyclic nucleotide-gated) і HCN (Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated). Обидва типи алостерично активуються циклічними нуклеотидами, при цьому для активації HCN-каналів необхідна ще і деполяризація мембрани (Medvedev, 2018). Через потенціалзалежні канали зазвичай відбувається швидкий, але короткочасний транспорт іонів кальцію. Ліганд-залежні ж забезпечують більш довготривалу зміну концентрації цитозольного кальцію (Крутецкая, Лебедев, 2001).

Специфічність в кодуванні кальцієвих сигналів відбувається завдяки тому, що різні зовнішні стимули спричиняють різні коливання вмісту іонізованого кальцію в цитоплазмі (за локалізацією, амплітудою і частотою) (McAinsh, Pittman, 2009). Визначальну роль при цьому відіграють кальцій-проникні канали та  $Ca^{2+}$ -АТФази рослинної клітини, які беруть участь і в кодуванні, і в передачі кальцієвих сигналів. Наявність різних типів кальцій-проникних каналів передбачає різноманіття способів регуляції надходження іонів кальцію в цитоплазму (Medvedev, 2018).

Після збільшення концентрації цитозольного кальцію відбувається передача сигналу на кальцієві білки-рецептори (CaM, CML, CDPK, CBL) і  $Ca^{2+}$ -залежні протеїнкінази (CaMK, CIPK), які взаємодіють з ними і здійснюють декодування та подальшу трансдукцію кальцієвого сигналу. До білків-мішеней, активність яких специфічно регулюється кальцієвими білками-рецепторами, належать транскрипційні фактори, іонні помпи, обмінники і канали, ферменти вуглецевого і азотного метаболізму, протеїнкінази і протеїнофосфатази, а також білки цитоскелету (Medvedev, 2018). Ці білки разом з  $Ca^{2+}$ -регульованими сенсорами відображають складність і варіативність кальцієвого сигналінгу



рослинних організмів, що допомагає їм динамічно і ефективно адаптуватися до змін умов зовнішнього середовища.

Іони  $\text{Ca}^{2+}$  як сигнальні посередники перебувають у тісній взаємодії з іншими медіаторами, зокрема активними формами кисню (див. нижче) та газотрансмітерами (оксидом азоту, сірководнем, монооксидом вуглецю). Також іони кальцію є обов'язковими учасниками трансдукції сигналів стресових фітогормонів (Kwak et al., 2006). Відомо про участь кальцію в передачі сигналів абсцизової, саліцилової і жасмонової кислот, а також брасиностероїдів (див. нижче).

Іншою важливою групою сигнальних посередників, задіяних в адаптації рослин до дії широкого спектру стресорів є АФК, які включають в себе взаємно перетворювані форми кисню з коротким терміном існування. До АФК відносять вільнорадикальні частинки – супероксидний аніон-радикал ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), гідроксильний радикал ( $\text{OH}^{\cdot}$ ), пероксидні радикали ( $\text{RO}_2^{\cdot}$  та ін.), а також нейтральні молекули – пероксид водню ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), синглетний кисень ( $^1\text{O}_2$ ). Основними компартментами генерації АФК є клітинні стінки, плазматична мембрана, хлоропласти, пероксисоми та мітохондрії (Foyer, Noctor, 2009). Найбільш важливим для клітинного сигналіngu вважається пероксид водню, адже його молекули мають довгий термін життя та здатні проникати через мембрани (Pitzschke, Hirt, 2006).

Посилення генерації АФК у відповідь на дію стресорів може відбуватися внаслідок стохастичних процесів у клітинних мембранах, які особливо чутливі до флуктуації температур та впливу інших несприятливих факторів. Відомо, що при порушенні процесів, які проходять на внутрішніх мембранах, матриксі мітохондрій, а також в стромах хлоропластів, зростає ймовірність акцептування електронів від переносників електрон-транспортного ланцюга молекулярним киснем з утворенням АФК (Gill, Tuteja, 2010). Також вміст АФК в клітинах може збільшуватися внаслідок активації АФК-генеруючих ферментативних систем, в першу чергу НАДФН-оксидази. Більше того, НАДФН-оксидаза може активуватись самими АФК, що лежить в основі концепції сигнальної хвилі

АФК, яка передається від клітини до клітини шляхом активації НАДФН-оксидази під впливом  $H_2O_2$  (Mittler et al., 2011).

Особлива роль в регуляції активності НАДФН-оксидази належить іонам кальцію, які можуть активувати фермент або через кальцій-залежну протеїнкіназу, або шляхом безпосередньої взаємодії з каталітичною субодиницею (Wong et al., 2007; Oda et al., 2010). Фосфатидна кислота (ФК) – важливий посередник ліпідного сигналіngu – розглядається як активатор НАДФН-оксидази (Marino et al., 2012).

Кальцій і АФК, які є ключовими сигнальними посередниками, функціонально пов'язані з іншими сигнальними молекулами, зокрема, з газотрансмітерами.

## **1.2. Газотрансмітери і їх роль в адаптації рослин до абіотичних стресорів**

**1.2.1. Оксид азоту.** Нині NO вважається одним з найважливіших компонентів сигнальної мережі клітин рослин і тварин (Mur et al., 2013). NO у рослин може утворюватися відновним або окиснювальним шляхами (Cognas, Barros, 2017). Відновний шлях передбачає використання як субстратів нітрату або нітриту в реакціях, що каталізуються нітратредуктазою, зв'язаною з мембраною нітрит-NO-редуктазою і локалізованою в пероксисомах ксантиноксидоредуктазою (Gupta, Kaiser, 2010; Farnese et al., 2016). Припускають, що саме залежний від нітратредуктази синтез NO відіграє роль в адаптації рослин до стресорів, зокрема, низьких температур, зневоднення і гіпоксії (Jeandroz et al., 2016).

У рослин механізм утворення оксиду азоту окиснювальним шляхом з L-аргініну дотепер залишається предметом дискусії, оскільки гомологи NO-синтази (NOS) тварин виявлені тільки у зелених водоростей, але не у вищих рослин (Li, Lancaster, 2013). Вважається, що наземні рослини не мають типової NOS тварин. Припускають, що під час еволюції сталася втрата цього гена

(Jeandroz et al., 2016). У зв'язку з цим питання про механізми L-аргінін-залежного синтезу NO у вищих рослин залишається відкритим (Kolbert et al. 2019). Однак не виключено, що у вищих рослин в пероксисомах є білки, відмінні від NOS, але здатні генерувати NO, використовуючи L-аргінін як субстрат. Ця реакція, як і каталізована NO-синтазою тварин, може відбуватися за наявності НАДФН, ФМН, ФАД, кальмодуліну та іонів кальцію (Cognas, Barroso, 2017; Gupta et al., 2020). Як основні субстрати для утворення NO в окиснювальному шляху останнім часом розглядають не тільки L-аргінін, а й поліаміни та гідроксиламін (Hancock, Whiteman, 2014; Liu et al., 2019).

Оксид азоту задіяний у формуванні багатьох адаптивних реакцій рослин до дії стресорів різної природи. Одним з важливих механізмів стрес-протекторної дії оксиду азоту є його вплив на про-/антиоксидантну рівновагу. Ці ефекти можуть бути результатом як прямої модифікації молекул антиоксидантних ферментів, так і впливу на експресію їх генів (Mamaeva et al., 2015). Також оксид азоту може впливати на синтез низькомолекулярних антиоксидантів (Siddiqui et al., 2017). Всі ці ефекти, мабуть, слід розглядати в контексті складної функціональної взаємодії NO і АФК як сигнальних посередників (Yemets et al., 2019).

Оксид азоту модифікує активність НАДФН-оксидази. Повідомляється про посилення залежної від НАДФН-оксидази генерації АФК рослинними клітинами за впливу на них донора NO НПН (Karpets et al., 2012). Такий ефект пригнічувався антагоністами кальцію та інгібітором утворення фосфатидної кислоти. Це вказує на їх роль у змінах активності НАДФН-оксидази, спричинюваних дією донора NO.

З іншого боку, є дані про те, що NO може пригнічувати НАДФН-оксидазу за рахунок S-нітрозилювання цистеїну (Cys 890) (Yun et al., 2011). Таким чином, лише за рахунок модуляції активності НАДФН-оксидази можливий різний за характером вплив оксиду азоту на генерацію АФК.

Іншою складовою впливу NO на про-/антиоксидантну систему є модифікація антиоксидантних ферментів. Модифікації білків, спричинювані

NO, включають в себе, головним чином S-нітрозилювання, нітрування залишків тирозину, і метал-нітрозилювання (Astier, Lindermaur, 2012). S-нітрозилювання є вибірковою (і, як правило, обмеженою конкретними залишками цистеїну) посттрансляційною модифікацією білків (Yemets et al., 2019). Вважається, що вона є одним з механізмів швидкого сприйняття клітинних сигналів і адаптації до змін сигналів навколишнього середовища (Arora, Bhatla, 2015).

Нітрування білків за тирозином полягає у включенні нітрогрупи (-NO<sub>2</sub>) до залишку тирозину, що призводить до утворення 3-нітротирозину (Radi, 2004) (рис. 1.1). Агентом нітрування є пероксинітрит, що утворюється при взаємодії оксиду азоту з супероксидним аніон-радикалом (Freschi, 2013). Нітрування білків за тирозином може приводити як до їх активації, так і до інгібування (Arora et al., 2016).

Нітрозилювання металовмісних білків відбувається при взаємодії NO з іонами перехідних металів, що входять до складу металопротеїнів, і призводить до утворення метало-нітрозильних комплексів (рис. 1.1). NO може зв'язуватися з різними металевими центрами (Fe, Cu, Zn) металопротеїнів (Ford, 2010; Arora et al., 2016). Формування метало-нітрозильних комплексів викликає оборотні конформаційні зміни білків і змінює їх структуру та функціональну активність (Cooper, 1999).

Описані вище механізми впливу оксиду азоту на білки значною мірою стосуються і антиоксидантних ферментів, активність яких змінюється внаслідок взаємодії NO з тільними групами або перехідними металами, що входять до складу активних центрів, особливо з гемом (Brown, 1995). Схематично шляхи впливу NO (у т.ч. кальційзалежні) на редокс-гомеостаз наведені на рис. 1.1.

Зміни редокс-гомеостазу і пов'язані з ними підвищення активності і експресії генів антиоксидантних ферментів, а також посилення синтезу різноманітних низькомолекулярних антиоксидантів та мультифункціональних

захисних сполук (наприклад, проліну) можуть бути однією з основних причин стрес-протекторної дії оксиду азоту (Yemets et al., 2019).

Також є відомості про участь оксиду азоту в індукованні накопичення стресових білків. Так, оксид азоту впливав на ДНК-зв'язуючу активність транскрипційних факторів теплового шоку, що зумовлювало, зокрема, накопичення HSP18.2, що корелювало з розвитком теплостійкості арабідопсису (Xuan et al., 2010). Також в експериментах з рослинами томатів показано участь NO у поєднанні з АФК в накопиченні HSP70 (Piterkova et al., 2013).

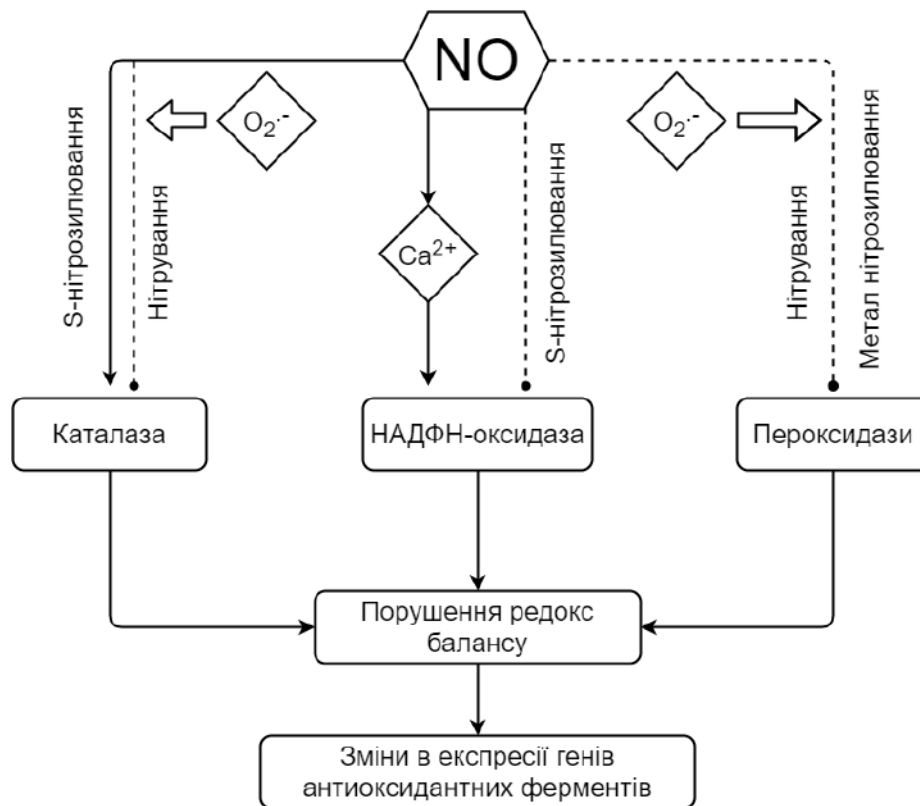


Рис. 1.1. Можливі шляхи впливу NO на редокс-гомеостаз (за Yemets et al., 2019, зі змінами).

Ймовірно, переліченими вище механізмами можна пояснити чисельні феномени підвищення стійкості рослин до стресорів різної природі (гіпо- і гіпертермії, зневоднення, засолення, впливу важких металів, ультрафіолету та

інших чинників). Феноменологія таких ефектів відома досить давно і узагальнена у низці оглядів (Kolupaev et al., 2019c).

**1.2.2. Монооксид вуглецю.** Монооксид вуглецю до цього часу залишається одним з найменш вивчених газотрансмітерів рослинних клітин. В цілому можна вважати доведеним індукування синтезу CO дією стресових та інших факторів на рослини. Основний механізм цього явища, ймовірно, пов'язаний з активністю гемоксигенази-1, аналогічної відповідному ферменту тварин. Проте, згідно з деякими експериментальними даними, може бути досить істотним також внесок інших, маловивчених механізмів, пов'язаних з руйнуванням гем-метиленових містків неферментативним шляхом, а також з пероксидним окисленням ліпідів та метаболізмом уреїдів (Zilli et al., 2014).

Монооксид вуглецю як сигнальна молекула, що взаємодіє з іншими посередниками і фітогормонами, бере участь в регуляції росту і розвитку рослин (Santa-Cruz et al., 2010; Lin et al., 2014; Xie et al., 2014), зокрема, активує проростання насіння (Dekker, Hargrove, 2002), розвиток кореневої системи (Cui et al., 2015; Chen et al. 2017), регулює продихові рухи (Cao et al., 2007), уповільнює старіння листя і плодів (Huang et al., 2011; Zhang et al., 2014). Особливо динамічно в останні роки накопичуються відомості про роль CO у розвитку адаптивних реакцій рослин на дію стресорів різної природи, його перехресну взаємодію з іншими сигнальними молекулами, а також фітогормонами, що відбувається у відповідь на дію несприятливих факторів (Wang, Liao, 2016). Проте, феноменологія таких ефектів до теперішнього часу недостатньо узагальнена. Залишаються відкритими питання про те, чи можна вважати монооксид вуглецю самостійною сигнальною молекулою та які саме стрес-протекторні системи знаходяться під контролем CO.

Найбільше вивчено вплив екзогенного монооксиду вуглецю або його донорів на стійкість рослин до осмотичного стресу, викликаного дією ПЕГ або солей. Показано, що обробка гематином підвищувала проростання насіння пшениці за впливу 25% ПЕГ-6000 (Liu et al., 2010). Цей ефект усувався в присутності інгібітору гемоксигенази Zn-протопорфірину IX, що доводить роль

цього ферменту в реалізації ефектів гематину. При обробці гематином відбувалося підвищення активності амілази, також відзначалося підвищення активності антиоксидантних ферментів у проростків.

Проростання насіння рису при засоленні посилювалося обробкою 1 мМ гематином або 5% розчином монооксиду вуглецю. Під впливом СО або його донора підвищувалася активність амілази, збільшувалася кількість цукрів в проростках (Liu et al., 2007). Така обробка викликала підвищення активності і посилення експресії гена Cu/Zn-супероксиддисмутази (Cu/Zn-SOD), а також пом'якшувала викликані стресом окислювальні пошкодження. Схожі ефекти зареєстровані під впливом гематину та газоподібного СО і при проростанні насіння пшениці в умовах сольового стресу (Xu et al., 2006). Також екзогенний монооксид вуглецю чинив позитивний вплив на іонний гомеостаз коренів проростків пшениці, сприяючи збільшенню співвідношення  $K^+/Na^+$ . Крім того, під його впливом відзначалося підвищення активності антиоксидантних ферментів і зменшення окиснювальних пошкоджень (Xie et al., 2008).

Гематин викликав підвищення солестійкості *Cassia obtusifolia*, що виражалося в збереженні за стресових умов пулу хлорофілів, високій фотохімічній ефективності фотосистеми II, пом'якшенні окислювальних пошкоджень, посиленні накопичення проліну і цукрів, а також підвищенні активності ключових антиоксидантних ферментів (Zhang et al., 2012).

У деяких роботах вдалося показати роль синтезу СО в стійкості рослин до дії стресорів шляхом генетичних трансформацій. Так, надекспресія гена гемоксигенази-1 у трансформантів ріпаку призводила до підвищення їх стійкості до ртуті, знижувала її накопичення в тканинах і пом'якшувала окислювальні пошкодження (Shen et al., 2011). З іншого боку, мутанти арабідопсису *hyl*, дефектні за синтезом СО, виявилися більш чутливими до стресу, зумовленого нестачею заліза, у порівнянні з рослинами дикого типу (Yang et al., 2016a).

Слабо вивченим залишається вплив екзогенного монооксиду вуглецю на стійкість рослин до дії стресових температур. На прикладі клітинної культури тютюну показано підвищення під впливом гематину виживаності клітин після

прогріву при 43°C (Li, Gu, 2016). Такий ефект супроводжувався зменшенням накопичення в клітинах малонового діальдегіду. При проростанні насіння бірманського винограду за умов низьких температурах обробка гематином знімала стрес-індуковане накопичення пероксиду водню в проростках, сприяла підвищенню активності аскорбатпероксидази, монодегідроаскорбатредуктази, збільшенню вмісту відновленого глутатіону (Bai et al., 2012)

Зафіксовані ефекти закривання продихів у рослин при обробці індукторами утворення CO, що може бути корисним при стресах, пов'язаних з порушенням водного режиму (посусі, засоленні, дії важких металів) (She, Song, 2008). Крім того, встановлено, що монооксид вуглецю може бути посередником у реалізації продихових ефектів АБК (Cao et al., 2007).

В цілому можна констатувати, що за участі CO відбувається індукування загальних протекторних систем рослин, зокрема антиоксидантної та осмопротекторної. З іншого боку, ймовірно, CO може чинити і досить специфічну дію на окремі процеси, пов'язані зі стійкістю, наприклад, на іонний гомеостаз, стан продихів, тощо. Цілком природньо, що реалізація ефектів CO відбувається за рахунок його взаємодії з багатьма іншими компонентами сигнальної мережі.

Водночас питання про безпосередні молекули-рецептори CO в рослинних клітинах поки що залишається відкритим. Досить давно відомо, що монооксид вуглецю проявляє здатність зв'язуватися з атомом заліза гемового фрагмента розчинної гуанілатциклази, тим самим активуючи фермент і збільшуючи вироблення вторинного внутрішньоклітинного месенджера цГМФ (He, He, 2014). Наявність в клітинах гуанілатциклазної активності і цГМФ в останні роки була виявлена у ряду видів рослин. При цьому, існування цього ферменту у рослин досі не отримало молекулярно-генетичного підтвердження. Гомолог розчинної гуанілатциклази був виявлений у зеленої водорості *Chlamydomonas reinhardtii*, однак його пошуки у вищих рослин поки що не принесли результату (Baudouin, 2011). Проте, в ряді досліджень, зокрема, виконаних з використанням інгібіторного аналізу, показано зв'язок між



монооксидом вуглецю і цГМФ як компонентами трансдукції сигналів у рослин (Baudouin, 2011). Так, отримані дані про те, що інгібітор синтезу цГМФ (LY83583) усував вплив індуктора гемоксигенази гематину на ріст коренів пшениці (Xuan et al., 2007). Також є відомості, що вказують на участь цГМФ в СО-індукованому закриванні продихів у бобів (Cao et al., 2007). Однак механізми зв'язку між монооксидом вуглецю і цГМФ залишаються поки нез'ясованими.

Слід зазначити, що при дії екзогенного монооксиду вуглецю в рослинних об'єктах зафіксовано збільшення вмісту NO. При цьому скавенджери або інгібітори синтезу NO нівелювали вплив СО на ріст коренів і апертуру продихів (Cao et al., 2007; Xuan et al., 2007; Song et al., 2008). У той же час індукування закривання продихів, спричинюване донором NO нітропрусидом натрію, не усувалося інгібітором гемоксигенази Zn-протопорфірином IX. Це свідчить про те, що у сигнальному ланцюгу, що регулює стан продихів, оксид азоту розташований після СО, а не навпаки (Cao et al., 2007).

В роботі Хіе і співавт. (2008) показано, що в умовах сольового стресу екзогенний СО посилював синтез оксиду азоту в коренях проростків пшениці, а інгібітор NO-синтази N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) і скавенджер оксиду азоту метиленовий синій пригнічували підвищення вмісту NO і знімали захисну дію СО. На роль NO як посередника в реалізації стрес-протекторних ефектів СО вказує і нівелювання позитивної дії індуктора гемоксигенази-1 гематину на проростки пшениці за дії осмотичного стресу при їх обробці скавенджером оксиду азоту 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (PTIO) (Liu et al., 2010). Обробка проростків *Baccaurea ramiflora* розчином СО або геміну викликала підвищення в них вмісту NO. Такий ефект усувався PTIO або інгібітором нітратредуктази вольфраматом, але не інгібітором NO-синтази L-NAME (Bai et al., 2012). Таким чином, ймовірно, залежно від об'єкта і умов, монооксид вуглецю може індукувати утворення NO різними шляхами, як окиснювальним (залежним від L-аргініну), так і відновним (пов'язаним з перетворенням нітрату/нітриту).

В цілому, наведені вище результати вказують на те, що NO в сигнальному шляху може перебувати нижче монооксиду вуглецю (рис. 1.2). У зв'язку з цим не виключено, що з гуанілатциклазою, як потенційно можливим учасником сигнального ланцюга, зв'язується не CO, а NO. У літературі обговорюється питання конкуренції між CO і NO за зв'язування з активним центром гуанілатциклази (He, He, 2014). З іншого боку, слід зазначити, що функціональна взаємодія між NO і CO, мабуть, дуже складна і може бути пов'язана не тільки з гіпотетичним білком з гуанілатциклазною активністю. Так, якщо при реалізації продигових реакцій у *Vicia faba* припускають, що NO в сигнальному ланцюгу розташований нижче, ніж CO (Cao et al., 2007), то у рослин сої (*Glycine max*) за впливу опромінення УФ-В, донор NO нітропрурид натрію викликав посилення експресії гена гемоксигенази-1, при цьому інгібування ферменту знімало захисну дію донора NO, яка виявлялася в зменшенні наслідків окиснювального стресу, спричиненого опроміненням (Santa-Cruz et al., 2010). Крім того, низькі дози УФ-В самі по собі викликали посилення експресії гена *HO1*. Даний ефект усувався інгібітором NO-синтази L-NAME, але не інгібітором нітратредуктази вольфраматом натрію. Автори роблять висновок про роль залежного від L-аргініну синтезу NO в індукуванні експресії гена гемоксигенази-1 за дії УФ-В на рослини сої (Santa-Cruz et al., 2010).

Таким чином, очевидно, між NO і CO в сигнальних мережах існують прямі і зворотні зв'язки, а також конкуренція за загальні мішені, серед яких багато гемовмісних білків (Kolupaev et al., 2019d), в тому числі гіпотетичний білок з гуанілатциклазною активністю. Спричинюване дією CO та/або NO підвищення в клітинах вмісту цГМФ, в свою чергу, шляхом активації АДФ-рибозилциклази може викликати збільшення в клітинах вмісту ще одного сигнального посередника – цАДФ-рибози. Її дія пов'язана зі стимулюванням внутрішньоклітинних кальцієвих каналів і посиленням надходження кальцію в цитозоль (рис. 1.2), що призводить до активації кальційзалежних протеїнкіназ і відповідних кальційзалежних фізіологічних відповідей (Neill et al., 2008). Добре

відомо, що донори оксиду азоту сприяють збільшенню вмісту цитозольного кальцію в рослинних клітинах (Lamotte et al., 2004). Однак це не єдиний можливий шлях впливу CO/NO на кальцієвий гомеостаз. Повідомляється також про можливість прямого впливу CO на білки іонних каналів клітин рослин, в тому числі кальцієвих каналів L-типу (Wilkinson, Kemp, 2011). Показано, що при індукуванні утворення латеральних коренів у рису обробкою хлоридом кобальту, іони  $\text{Ca}^{2+}$  діють нижче гемоксигенази (Hsu et al., 2013b). Ростові ефекти гематину усувалися антагоністами кальцію ЕГТА і рутенієвим червоним (Sa et al., 2007).

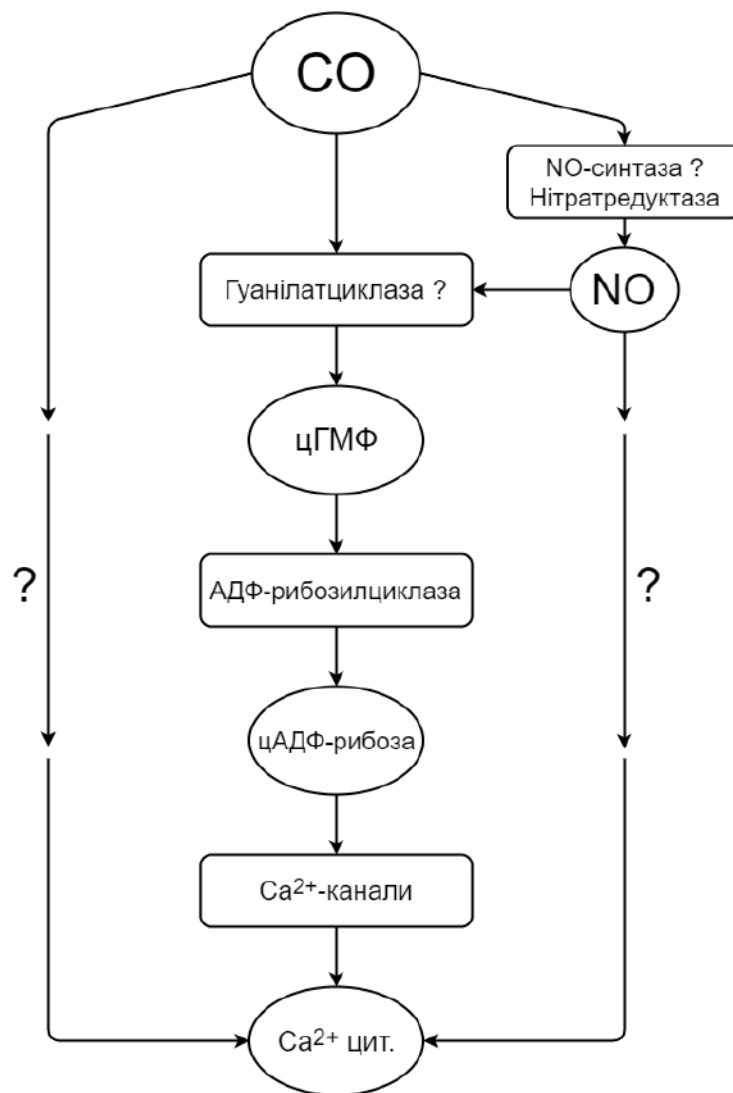


Рис. 1.2. Гіпотетичні механізми зв'язку CO з NO і  $\text{Ca}^{2+}$  як сигнальними посередниками. Пояснення в тексті.

Зрештою, учасниками трансдукції сигналу CO можуть бути і активні форми кисню (АФК), в першу чергу, пероксид водню. Так, спричинюваний гематином або газоподібним CO ефект закривання продохів у бобів пригнічувався антиоксидантом аскорбатом та інгібітором НАДФН-оксидази дифеніленіодоніумом (She, Song, 2008). Стимульоване гематином або гемином подовження коренів усувалося скавенджером пероксиду водню йодидом калію та інгібітором пероксидази саліцилгідроксамовою кислотою (Xuan et al., 2007). Таким чином, монооксид вуглецю прямо або опосередковано може активувати різні ферменти, що генерують АФК.

У той же час зафіксовано і абсолютно протилежні ефекти монооксиду вуглецю. Так, показано, що обробка розчином CO коренів проростків пшениці пригнічувала ефекти посилення експресії гена і підвищення активності НАДФН-оксидази, спричинювані сольовим стресом (Ling et al., 2009).

Отже, вивчення ефектів монооксиду вуглецю як фізіологічно активної молекули, встановлення його місця і ролі у сигнальній мережі рослинних клітин має сприяти розумінню нових аспектів механізмів адаптації рослин до дії несприятливих факторів навколишнього середовища, зокрема абіотичних стресорів.

**1.2.3. Сірководень.** Щонайменше шість ферментативних систем, ймовірно, можуть бути задіяні у біосинтезі сірководню ( $H_2S$ ) (Li, 2013; Rudenko et al., 2015). Одним з основних шляхів синтезу  $H_2S$  у рослин вважається перетворення L-цистеїну на піруват з вивільненням сірководню і амонію (Romero et al., 2013). Ця реакція каталізується L-цистеїндесульфгідразою (КФ 4.4.1.1), яка може бути локалізована в цитоплазмі, пластидах і мітохондріях (Li, 2013; Riemenschneider et al., 2005). Також можливе утворення сірководню з D-цистеїну під дією D-цистеїндесульфгідрази, що міститься в цитоплазмі (КФ 4.4.1.15) (Riemenschneider et al., 2005; Guo et al., 2016). Крім того, сірководень може синтезуватися шляхом відновлення сульфїту за участю сульфїтредуктази (КФ 1.8.7.1) (Li, 2013).

Утворення сірководню у рослин може відбуватися і за участю  $\beta$ -ціаноаланінсинтази (К.Ф. 4.1.1.9) (Li et al., 2016). Цей мітохондріальний фермент каталізує реакцію конденсації L-цистеїну і ціаніду з виділенням сірководню (Li, 2015b). Вважається, що його основна функція пов'язана з контролем вмісту в клітинах токсичного  $\text{CN}^-$ . Цистеїнсинтаза (К.Ф. 2.5.1.47), локалізована в цитоплазмі, мітохондріях і хлоропластах, також може вносити вклад в синтез сірководню. Вона каталізує оборотну реакцію між L-цистеїном і ацетатом з утворенням O-ацетил-L-серину і  $\text{H}_2\text{S}$  (Wirtz, Hell, 2006; Li, 2015b). Нарешті, можливий синтез сірководню за участю карбоангідрази (К.Ф. 4.2.1.1) (Wang et al., 2012a), яка каталізує розкладання карбонілсульфіду на вуглекислий газ і сірководень.

Поряд з ферментами синтезу сірководню, в рослинах виявлено ензим, що спеціалізується на його деградації – O-ацетилсеринліаза (Lisjak et al., 2013).

Показано посилення синтезу сірководню у рослин при дії стресорів різної природи (Singh et al., 2020), а також можливість індукування стійкості екзогенним  $\text{H}_2\text{S}$ . Так, у відповідь на дію низьких температур у рослин арабідопсису відбувалося посилення експресії генів L/D-цистеїндесульфгідраз і підвищення вмісту  $\text{H}_2\text{S}$  в листі (Shi et al., 2015). Такий же ефект виявлений і в листках огірка у відповідь на дію температури  $4^\circ\text{C}$  (Liu et al., 2019). Повідомляється також про посилення синтезу сірководню у винограду при адаптації до холоду (Fu et al., 2013).

Виявлено й ефекти підвищення стійкості рослин до низьких температур донорами сірководню. Так, під впливом обробки NaHS підвищувалася морозостійкість бермудської трави (*Cynodon dactylon* L.) (Shi et al., 2014). При цьому в листках відзначалося збільшення активності антиоксидантних ферментів. Передобробка гідросульфідом натрію в звичайних умовах і на тлі холодого загартування викликала підвищення морозостійкості проростків пшениці і жита (Kolupaev et al., 2019a). При цьому вона сприяла зростанню активності гваяколпероксидази і каталази, вмісту цукрів і проліну.

Підвищення вмісту сірководню у відповідь на дію високої температури виявлено у рослин тютюну (Chen et al., 2016). На ряді об'єктів показано підвищення теплостійкості під впливом екзогенного  $H_2S$ . Наприклад, обробка проростків кукурудзи розчином NaHS підвищувала їх виживаність після дії потенційно летальної температури (Li et al., 2014a; Li, Zhu, 2015). Обробка проростків пшениці NaHS, що спричиняла підвищення їх теплостійкості, супроводжувалася посиленням експресії генів антиоксидантних ферментів аскорбатпероксидази і каталази (Yang et al., 2016b). Індукування донором сірководню теплостійкості колеоптилів пшениці викликало підвищення активності СОД, каталази і гваяколпероксидази (Kolupaev et al., 2017a; 2017b).

Встановлено посилення експресії генів L- і D-цистеїндесульфгідрази у рослин арабідопсису в умовах посухи. При цьому збільшувалося продукування рослинами сірководню (Jin et al., 2011). У проростках пшениці у відповідь на обробку ПЕГ також зареєстровано підвищення вмісту сірководню (Shan et al., 2018b). У оброблених гідросульфідом натрію етіюльованих проростках пшениці показано посилення експресії генів і підвищення активності аскорбатпероксидази, глутатіонредуктази і монодегідроаскорбатредуктази при осмотичному стресі (Shan et al., 2018b). При цьому інгібування синтезу сірководню обробкою амінооксиоцтовою кислотою усувало спричинюване осмотичним стресом підвищення активності антиоксидантних ферментів.

Показано також підвищення активності пероксидази, каталази і глутатіонредуктази у рослин бермудської трави при їх обробці донором сірководню NaHS перед осмотичним стресом, створюваним дією ПЕГ 6000. Така обробка також стабілізувала пул відновленого глутатіону (Shi et al., 2013). Підвищення змісту аскорбата і відновленого глутатіону, а також збільшення співвідношення GSH / GSSG під впливом обробки рослин донором сірководню відзначалося в умовах осмотичного і сольового стресів у рослин полуниці (*Fragaria* × *ananassa* cv. Camarosa) (Christou et al., 2013).

Позитивний вплив екзогенного сірководню при сольовому стресі виявлено в експериментах з рослинами різних таксономічних груп. Виявлена

активація СОД, каталази, аскорбатпероксидази і гваяколпероксидази донором сірководню у рослин пшениці при сольовому стресі (Shan et al., 2018b; da-Silva, Modolo, 2018). Обробка рослин арабідопсису NaHS викликала підвищення їх виживаності при тривалому сольовому стресі і збільшення активності СОД, глутатіоредуктази і неспецифічної пероксидази (Shi et al., 2015). Обробка рослин люцерни і огірка позитивно впливала на іонний гомеостаз, збільшуючи співвідношення  $K^+/Na^+$  в тканинах (Wang et al., 2012b; Jiang et al., 2019).

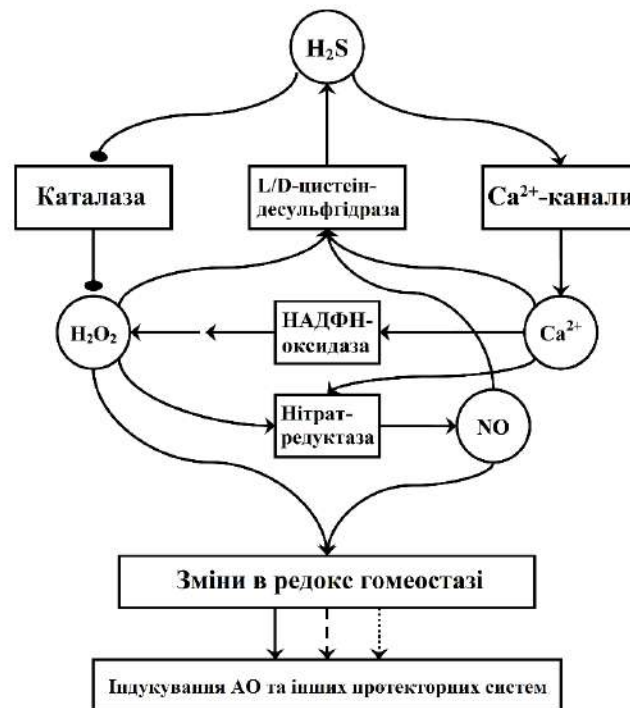


Рис. 1.3. Можливі шляхи функціональної взаємодії сірководню з іонами кальцію, АФК та оксидом азоту. Пояснення в тексті.

У реалізації стрес-протекторної дії  $H_2S$  беруть участь інші компоненти сигнальної мережі, зокрема, іони кальцію, активні форми кисню (АФК) і оксид азоту (NO) (Li et al., 2016; Fang et al., 2017; Kolupaev et al., 2019d). Зокрема, кальцій причетний як до регуляції синтезу сірководню, так і до трансдукції його сигналів (рис. 1.3). Встановлено, що екзогенний кальцій в концентраціях, що підвищують теплостійкість клітин суспензійної культури тютюну, викликав

збільшення вмісту сірководню, пов'язане зі зростанням активності L-цистеїндесульфгідрази (Li et al., 2015a).

Кальцій задіяний і в передачі сигналів  $H_2S$ . Так, захисна дія гідросульфиду натрію на рослини могора в умовах токсичного впливу на них  $Cr^{6+}$ , посилювалося при їх обробці екзогенним кальцієм (Fang et al., 2014). У той же час вплив хелатора позаклітинного кальцію, ЕГТА, навпаки, нівелював прояв фізіологічного впливу сірководню. Рослини арабідопсису, мутантні за геном L-цистеїндесульфгідрази, відрізнялися слабким виходом кальцію в цитозоль у відповідь на дію посухи (Jin et al., 2013). Авторами зроблено висновок, що сірководень впливає на стан кальцієвих каналів.

Вплив сірководню на стан продихів епідермісу листків арабідопсису також опосередкований кальцієм. У роботі Honda і співавт. (2015) показано, що обробка листків арабідопсису проникним для клітин хелатором кальцію усувала закривання продихів, спричинюване органічним донором сірководню СУУ4137 (morpholin-4-ium-4-methoxyphenyl [morpholino] phosphinodithioate).

Ймовірно, важливими посередниками у реалізації сигнальних процесів, в яких задіяний сірководень, є АФК (рис. 1.3). Так, спричинюване донором сірководню гідросульфідом натрію підвищення теплостійкості клітин колеоптилів пшениці, якому передувало транзиторне посилення генерації АФК, усувалося під дією антиоксидантів бутилгідрокситолуолу і диметилтіосечовини (Kolupaev et al., 2017a). Інгібіторними методами показано, що екзогенний сірководень в клітинах колеоптилів пшениці викликає залежне від НАДФН-оксидази, але не від позаклітинної пероксидази, посилення генерації клітинною поверхнею супероксидного аніон-радикала і подальше його перетворення на пероксид водню за допомогою супероксиддисмутази (СОД) (Kolupaev et al. 2017b).

Ймовірно, що індукування НАДФН-оксидази – не єдиний механізм посилення накопичення пероксиду водню під впливом сірководню. Показано, що сірководень в досить високих концентраціях міститься в пероксисомах і може пригнічувати локалізовану там каталазу, що призводить до збільшення в



клітинах кількості  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Corpas et al., 2019a). Авторами також показано зниження сірководнем активності каталази, виділеної з різних, як рослинних, так і тваринних об'єктів. Такий ефект може бути пов'язаний з персульфидуванням тіолових груп молекул ферменту (Corpas et al., 2019a).

Сірководень перебуває у дуже тісній функціональній взаємодії з оксидом азоту. Одним з таких механізмів є пряма взаємодія молекул. Сірководень може реагувати з NO і пероксинітритом ( $\text{ONOO}^-$ ) (Lisjak et al., 2013; Carballal et al., 2011). Наслідком такої взаємодії буде їх взаємна нейтралізація і ослаблення сигналів, а також поява нових сполук, нітрозотіолів, які самі можуть виявляти сигнальні ефекти (Whiteman et al., 2006).

Взаємодія між  $\text{H}_2\text{S}$  і NO може бути зумовлена і наявністю у них спільних сайтів зв'язування з білковими мішенями. В першу чергу мова йде про тіолові групи. Оксид азоту здатний змінювати стан цих груп шляхом S-нітрозилування, а сірководень - шляхом персульфидування (Hancock, 2019). Також можливе транс-персульфидування або транс-нітрозилування тіолових груп (Corpas et al., 2019a).

Ще одним і, мабуть, більш вивченим в фізіологічних експериментах, механізмом взаємодії між сірководнем і оксидом азоту є їх вплив на синтез одне одного (рис. 1.3). У ряді робіт повідомляється про те, що фізіологічні ефекти сірководню можуть бути опосередковані оксидом азоту і навпаки. Так, позитивний вплив донора сірководню NaHS на солестійкість рослин люцерни і експресію генів антиоксидантних ферментів усувався скевенджером оксиду азоту РТІО (2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide) (Wang et al., 2012b).

Індукування гідросульфідом натрію теплостійкості проростків пшениці супроводжувалося транзиторним збільшенням в них вмісту пероксиду водню та оксиду азоту. При цьому скевенджер пероксиду водню диметилтіосечовина (ДМТС) і інгібітор НАДФН-оксидази імідазол повністю усували вплив сірководню на вміст NO, а антагоністи оксиду азоту слабо впливали на кількість  $\text{H}_2\text{O}_2$  у тканинах (Karpets et al., 2020). Спричинюване донором

сірководню підвищення вмісту NO в коренях проростків супроводжувалося збільшенням активності нітратредуктази і майже повністю усувалося її інгібітором вольфраматом натрію, в той час як інгібітор NO-синтази L-NAME ( $N^G$ -nitro-L-arginine methyl ester) практично не впливав на цей ефект (Karpets et al., 2020). При цьому спричинюване донором  $H_2S$  підвищення активності нітратредуктази усувалося скавенджером пероксиду водню ДМТС та інгібітором НАДФН-оксидази імідазолом. Мабуть, в сигнальному шляху сірководню, що індукує розвиток теплостійкості, оксид азоту розташований нижче пероксиду водню.

В останні роки з'являються відомості про участь  $H_2S$  в трансдукції сигналів фітогормонів. Так, показано, що стрес-протекторний вплив абсцизової кислоти на рослини арабідопсису за дії посухи реалізується з участю сірководню (Shi et al., 2015). Індукування метилжасмонатом стійкості рослин проса до токсичної дії кадмію залежало від синтезу  $H_2S$  і пригнічувалося інгібіторами L-цистеїндесульфгідрази (Tian et al., 2017). Також встановлено, що індукування теплостійкості проростків кукурудзи екзогенною СК супроводжувалося підвищенням вмісту сірководню в пагонах (Li et al., 2015a). З використанням проростків кукурудзи також показаний синергічний ефект активації антиоксидантної системи при спільній дії СК і донора сірководню гідросульфїду натрію (NaHS) (Li, 2015a). У той же час зв'язок між станом стрес-протекторних систем рослин і змінами ендogenous вмісту  $H_2S$  при дії на рослини СК спеціально не досліджували, хоча отримання таких відомостей представляє інтерес для практичного використання донорів сигнальних молекул для посилення фізіологічних ефектів фітогормонів.

### **1.3. Гормональна система рослин за дії стресорів**

Як вже було зазначено, формування стійкості рослин до дії несприятливих чинників є складним процесом, в якому задіяні різні компоненти сигнальної мережі.

Всі фітогормони є важливими компонентами регуляторної системи рослин. Вони відіграють ключову роль не тільки в процесах росту та розвитку, але і адаптації рослин до дії несприятливих чинників (Шакирова, 2001; Титов, Таланова, 2009; Веденічова, Косаківська, 2020). Зниження концентрації гормонів стимуляторів та підвищення гормонів інгібіторів є важливою адаптивною реакцією при дії стресорів різної природи, яка призводить до зниження інтенсивності метаболізму та переходу рослинного організму в стан спокою, завдяки чому енергетичні запаси клітини витрачаються на підтримку структури та розвиток стійкості до несприятливого фактору.

Добре вивченою є роль співвідношення цитокінінів і АБК у рослинах, які є природними антагоністами. Обробка цими фітогормонами, відповідно, індукувала або пригнічувала синтез ферментів диференціації хлоропластів у фотосинтезуючих сім'ядолях (Кулаєва и др., 1979). В еквімолярних концентраціях ці фітогормони повністю знімали ефекти один одного. Співвідношення цитокінінів і абсцизової кислоти грає важливу роль в адаптації рослин до дії низьких і високих температур, осмотичного, сольового та інших стресів (Huang, 2006).

Відомо про транзиторне підвищення вмісту АБК, СК, ЖАК і БС під дією широкого спектра стресорів (див. нижче). Деякі літературні джерела вказують на взаємозв'язок між динамікою вмісту стресових фітогормонів і розвитком стійкості рослин до дії несприятливих чинників. Важливими посередниками у передачі сигналу стресових фітогормонів є іони кальцію, активні форми кисню, цАМФ, оксид азоту (Trewavas et al., 2002; Kaur, Gupta, 2005; Jeandroz et al., 2013; Kolupaev et al., 2015). Проте в цілому, сигнальна мережа, через яку реалізуються фізіологічні ефекти фітогормонів, а особливо роль у ній газотрансмітерів як важливих посередників, до цього часу вивчені недостатньо.

Серед стресових фітогормонів найбільший практичний інтерес становлять саліцилова кислота, жасмонати і брасностероїди. На відміну від АБК вони не спричиняють істотного інгібування росту рослин, але виявляють помітний захисний ефект за дії стресорів найрізноманітнішої природи.

## 1.4. Ключові стресові фітогормони

**1.4.1. Саліцилова кислота.** Саліцилова кислота (СК) є одним з фітогормонів, задіяних у формуванні стійкості рослин до стресорів різної природи (Shakirova et al., 2013). Саліцилова кислота є однією з ключових молекул, що беруть участь у формуванні набутої стійкості рослин (Васюкова, Озерецковская, 2007; Klessig et al., 2018). Водночас у досить численних роботах показана можливість індукування стійкості рослин до стресових температур (Kolupaev et al., 2012; Esim, Atici, 2015), зневоднення (Alavi et al., 2014), засолення (Sakhabutdinova et al., 2004) та важких металів (Rodriguez-Serrano et al., 2006) під дією екзогенної СК.

Синтез саліцилової кислоти у рослин відбувається щонайменше двома шляхами в результаті перетворення шикімової кислоти. Основний шлях – фенілпропаноїдний – пов'язаний з перетворенням фенілаланіну в *транс*-коричну кислоту фенілаланінамонійліазою (Васюкова, Озерецковская, 2007; Chen et al., 2009; Vogt et al., 2010). *Транс*-корична кислота перетворюється в бензойну, з якої потім під дією бензоат-2-гідроксилази і утворюється СК (Васюкова, Озерецковская, 2007; Chen et al., 2009). Ген, що кодує цей фермент ще не ідентифікований у рослин, проте активність ферменту виявлена у тютюну і рису (Chen et al., 2009). Внесок кожного з двох шляхів синтезу СК може відрізнятися залежно від видових особливостей рослин та їх фізіологічного стану (Lefevere et al., 2020).

Зареєстровано підвищення вмісту ендогенної СК у рослин різних видів за впливу гіпо- та гіпертермії, сольового, осмотичного та інших стресорів (Shakirova et al., 2003; Hamayun et al., 2010; Kim et al., 2013). Слід також зазначити, що ендогенний вміст цього фітогормону в листках ячменю підвищувався при обробці рослин екзогенними саліцилатами (Евдокимова и др., 2014). Вважається, що основні механізми СК-індукованого розвитку стійкості рослин до абіотичних стресорів зумовлені СК-опосередкованим

накопиченням осмолітів, таких як гліцинбетаїн, пролін, цукри і аміни, регуляцією засвоєння мінеральних речовин, посиленням синтезом вторинних метаболітів, регуляцією вмісту інших фітогормонів (Koo et al., 2020). Також досить добре відомим ефектом СК є активація у рослин ферментативної антиоксидантної системи (Peleg-Grossman, 2012; Hashempour et al., 2014; Wang et al., 2018). Останнім часом індукований СК синтез ряду захисних білків, у тому числі PR-білків, вважається важливим для стійкості рослин не лише до патогенів, а й до абіотичних стресорів (Kim et al., 2013; Shakirova et al., 2016; Koo et al., 2020). Проте молекулярні механізми участі PR-білків у розвитку стійкості рослин до абіотичних чинників дотепер залишаються невідомими (Koo et al., 2020). В цілому, СК може індукувати дуже істотні зміни в спектрі білків органів рослин. Так, при вивченні впливу екзогенної СК на білковий спектр листків і коренів рослин гороху було виявлено 15 СК-індукованих білків, які відіграють роль як у формуванні імунітету до патогенів, так і у стійкості рослин до несприятливих кліматичних факторів, беручи участь в сигнальних та енергетичних процесах, а також в синтезі, рефолдингу і деградації інших білків (Tarchevsky et al., 2010). Обробка СК рослин огірка на тлі дії низької позитивної температури спричиняла посилення експресії гена і підвищення активності альтернативної оксидази (Lei et al., 2010), що може як зменшувати ймовірність окиснювальних пошкоджень в стресових умовах, так і зумовлювати ефект термогенезу (Van Aken et al., 2009).

Встановлено роль сигнальних посередників (зокрема, АФК і NO) (Kolupaev et al., 2012; Tewari, Paek, 2011) в реалізації стрес-протекторних ефектів саліцилової кислоти. Зокрема, пероксид водню розглядається як важливий учасник в реалізації фізіологічних ефектів СК (Saleem et al., 2020). З іншого боку, СК вважається ключовим компонентом в системі трансдукції і ампліфікації сигналів АФК (Quan et al., 2008). Між газотрансмітером оксидом азоту та СК як сигнальними молекулами також існують складні функціональні зв'язки. З одного боку, оксид азоту, поряд з АФК, розглядається як посередник в реалізації фізіологічних ефектів СК (Mur et al., 2006). У той же час реалізація

окремих ефектів оксиду азоту як сигнальної молекули також може відбуватися за посередництва СК. Дуже слабо дослідженими залишаються зв'язки СК з газотрансмітером сірководнем. На участь  $H_2S$  як посередника фізіологічної дії СК вказують лише поодинокі експериментальні дані, отримані на проростках кукурудзи (Li et al., 2015a).

**1.4.2. Жасмонова кислота.** Жасмонова кислота (ЖАК), а також її похідні – метилжасмонат, ізoleyцинжасмонат – є однією з ключових груп стресових фітогормонів, задіяних в регуляції адаптивних реакцій рослин на дію стресорів різної природи. Жасмонати здатні індукувати як відносно специфічні адаптивні реакції, так і досить універсальні: впливати на активність антиоксидантних ферментів, редокс-гомеостаз, метаболізм хлорофілів (Syvash, Zolotareva, 2017).

Синтез жасмонової кислоти може відбуватися різними шляхами при деградації мембранних ліпідів. Один з найбільш досліджених починається з окислення ліпоксигеназою  $\alpha$ -ліноленової кислоти до 13-гідропероксиліноленової (Sembdner, Pathier, 1993; Agrawal et al., 2004). Ця жирна кислота дегідується аленоксидсинтазою з утворенням нестабільної 12,13-епоксиоктадекатриєнової кислоти, а та в свою чергу перетворюється на 12-оксофітодієнову кислоту. За допомогою 12-оксо-ФДК-редуктази ця сполука перетворюється на 12-оксофітоєнову кислоту. Після трьох послідовних реакцій  $\beta$ -окислення, що призводить до вкорочення бічного ланцюга, утворюється жасмонова кислота.

ЖАК виступає у ролі фактору регуляції росту і розвитку рослин (Ali, Baek, 2020; Jang et al., 2020), а також сигналу, що активує експресію захисних генів під час патогенезу (Vasyukova, Ozeretskovskaya, 2009). Менш дослідженою є роль ЖАК при адаптації рослин до абіотичних стресорів: посухи, засолення, високих та низьких температур. Показано швидке підвищення вмісту жасмонової кислоти в листках ячменю при дії осмотичного стресу (Kramell et al., 2000). У рослин арабідопсису під час посухи відзначалося транзиторне підвищення вмісту ЖАК (Ali, Baek, 2020; Ruan et al., 2019). Підвищення вмісту ендогенної ЖАК спостерігалось в листках сої у відповідь на

дегідратацію (Савченко и др., 2014). Характерно, що цей ефект по часу випереджав накопичення абсцизової кислоти, що може вказувати на первинність сигналу ЖАК щодо АБК при осмотичному стресі. Також підвищення вмісту ЖАК при сольовому стресі спостерігалось у рослин томату, картоплі, рису та інших видів (Ali, Baek, 2020; Kang et al., 2005; Ryu, Cho, 2015). Подібні ефекти зміни вмісту ЖАК спостерігалися у рослин арабідопсису, банану та рису у відповідь на дію холоду (Du et al., 2013; Hu et al., 2013; Wang et al., 2020; Ruan et al., 2019). У рослин *Aquilaria sinensis* спостерігалось значне підвищення вмісту ЖАК за впливу теплового стресу (Xu et al., 2020).

Екзогенні ЖАК та Me-ЖАК сприяли підвищенню стійкості рослин різних видів до дії низьких позитивних та негативних (Hu et al., 2017; Игнатенко и др., 2020), а також високих температур (Karpets et al., 2014), дегідратації (Wang, 1999), засолення (Yastreba et al., 2015; 2016; 2018). В багатьох роботах досліджено вплив ЖАК на стійкість рослин до дії важких металів, зокрема знижувала негативний вплив токсичних доз міді на рослини *Cajanus cajan* (Poopam et al., 2013), та іонів  $Cd^{2+}$  на корені рослин *Solanum nigrum* (Yan et al., 2015).

Реалізація впливу жасмонату на експресію генів відбувається з участю специфічних білків жасмонатного сигналінгу. Встановлено, що у цитоплазмі рослинних клітин найбільш біологічно активною формою жасмонату є ізолейцинжасмонат (Ali, Baek, 2020; Fonseca et al., 2009). За відсутності дії на рослини стрес-факторів або інших стимулів його вміст низький, через що транскрипційні фактори жасмонатного сигналінгу перебувають в репресованому стані (Ali, Baek, 2020). Під впливом стресорів чи інших стимулів посилюється утворення жасмонової кислоти та її перетворення на ізолейцинжасмонат – єдину форму жасмонату, здатну до зв'язування з F-box-білком (COI1), який вважається рецептором жасмонату (Thines et al., 2007). Після взаємодії ізолейцинжасмонату з комплексом SCF/COI1 останній набуває здатності до убіквітинування білків сімейства JAZ (Jasmonate-Zim-Domain) – репресорів жасмонатного сигналінгу. Протеасомна деградація JAZ призводить

до вивільнення транскрипційного фактора MYC2 з JAZ-MYC2 комплексу (Jang et al., 2020). Таким чином, стає можливою активація експресії жасмонатзалежних генів, що перебувають під контролем транскрипційного фактора MYC2. З використанням мутантів арабідопсису за жасмонатним сигналігом (*jin1* і *coi 1*) показано участь жасмонат-залежних сигнальних шляхів в індукованому сольовим стресом закриванні продихів (Yastreb et al., 2020).

Ймовірно, з процесами сигналіngu жасмонатів тісно пов'язані газотрансмітери. З одного боку, вони беруть участь в трансдукції гормональних сигналів в генетичний апарат рослинної клітини (Shan et al., 2018a), з іншого - зміна концентрації газотрансмітерів може впливати на гормональний комплекс (Maslennikova et al., 2017; Huang et al., 2004; Banerjee et al., 2018), в тому числі вміст жасмонатів (Huang et al., 2004). Так, показано, що оксид азоту може брати участь в трансдукції сигналу жасмонової кислоти при реакції рослин на поранення (Huang et al., 2004). Спричинюване жасмоновою кислотою пригнічення подовження коренів і посилення їх латерального росту у арабідопсису супроводжувалося підвищенням вмісту NO в кореневій системі рослин дикого типу (Barrera-Ortiz et al., 2018). У той же час екзогенний оксид азоту слабо впливав на архітектуру коренів мутантів *coi1*, дефектних за геном, що кодує білок COI1, котрий, як зазначалося вище, вважається рецептором жасмонату і бере участь у видаленні білків-репресорів транскрипційних факторів жасмонатного сигналіngu. Це вказує на роль компонентів жасмонатного сигналіngu та (або) самої жасмонової кислоти в реалізації фізіологічних ефектів оксиду азоту (Barrera-Ortiz et al., 2018).

Сірководень, поряд з оксидом азоту, також задіяний в прояві фізіологічних ефектів жасмонату. Показано підвищення вмісту сірководню у рослин арабідопсису при їх обробці жасмоновою кислотою (Shan et al., 2018a). З іншого боку, молекулярно-генетичними методами отримані дані, що вказують на можливість впливу сірководню на експресію гена, що кодує білок-рецептор жасмонату COI1 (Li et al., 2017).



**1.4.3. Брасиностероїди.** Брасиностероїди (БС) – клас фітогормонів, що беруть участь в процесах адаптації рослин до стресорів різної природи, зокрема, до екстремальних температур, зневоднення, засолення (Khrirach et al., 2000, Singh, Shono, 2005; Efimova et al., 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 (Bajguz, Nayat, 2009).

На сьогодні, шляхи синтезу брасиностероїдів у рослин добре вивчені (Chung, Choe, 2013). Першим специфічним продуктом, з якого синтезуються брасиностероїди є 24-метиленхолестерол, який потім перетворюється на кампестерол та кампестанол. З кампестанолу подальший синтез БС відбувається двома паралельними шляхами, з раннім та пізнім окисненням в С-6 позиції. Це призводить до утворення кастастерона, з якого потім і синтезується брасинолід, який є найбільш активною та розповсюдженою в природі формою брасиностероїдів (Chung, Choe, 2013).

У трансдукції сигналу БС, очевидно, задіяні універсальні сигнальні посередники, такі як активні форми кисню, оксид азоту та іони кальцію. Так, на рослинах огірка показана здатність БС посилювати генерацію АФК – супероксидного 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, фенілаланінамонійліазу, PR-білки та ін. Вказані фізіологічні ефекти БС пригнічувалися обробкою рослин скавенджером АФК диметилтіосечовиною або інгібітором НАДФН-оксидази дифеніленіодоніумом (Xia et al., 2011).

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). При цьому стимульоване БС посилення генерації оксиду азоту відбувалося за посередництва АФК, оскільки усувалося антиоксидантом та інгібітором НАДФН-оксидази.

Функціональна взаємодія між NO і БС має значення для формування адаптивних реакцій рослин. Так, показано, що розвитку посухостійкості рослин кукурудзи, оброблених 24-ЕБЛ, передувало посилення генерації NO, яке в свою чергу викликало накопичення АБК (Zhang et al., 2011). При цьому спричинювані обробкою БС ефекти підвищення вмісту АБК і розвитку посухостійкості рослин усувалися скавенджером NO РТЮ та інгібітором NO-синтази L- NAME. Розвиток посухостійкості перцю під впливом 24-ЕБЛ також відбувається за участю NO, оскільки пригнічувався його скавенджером РТЮ (Кауа et al., 2019). При обробці колеоптилів пшениці 24-ЕБЛ, яка викликала підвищення їх теплостійкості, відзначалося збільшення вмісту NO. При цьому антагоністи NO нівелювали розвиток теплостійкості відрізків колеоптилів (Karpetz, Kolupaev, 2018). Також показано, що протекторна дія епібрасиноліду на рослини *Brassica juncea* L. при сольовому стресі була опосередкована залежним від нітратредуктази синтезом NO (Gupta, Seth, 2020). Таким чином, практичний інтерес становлять дослідження можливості посилення стрес-протекторних ефектів БС на рослини за їх використання в комплексі з донорами NO.

### **Висновки до розділу 1**

Адаптивні реакції рослин відбуваються завдяки функціонуванню пов'язаних між собою сигнальних мереж і системи гормональної регуляції. За стресових умов особливого значення набувають процеси, які індукуються або опосередковуються такими фітогормонами, як АБК, СК, ЖАК, БС. Їх участь в процесах активації загальних і специфічних захисних реакцій рослин різних видів доведена багатьма дослідженнями.

Універсальні сигнальні посередники, в першу чергу іони кальцію і АФК, задіяні як у трансдукції стресових сигналів, що спричиняють синтез відповідних гормонів, так і в передачі гормональних сигналів.

Іншою важливою групою посередників, які беруть участь в багатьох фізіологічних процесах рослин, є газотрансмітери – NO, H<sub>2</sub>S і CO. Роль цих молекул в адаптації рослин до дії несприятливих факторів підтверджена багатьма дослідженнями. В літературі показано підвищення ендogenous вмісту газотрансмітерів під дією стресорів різної природи, а також позитивний вплив їх донорів на стійкість рослин різних видів, який повністю або частково усувався дією відповідних антагоністів.

Найбільш вивченим газотрансмітером є оксид азоту. Менш дослідженими є сірководень і особливо монооксид вуглецю. Так, відкритим залишається питання участі інших сигнальних посередників та їх розташування в сигнальних ланцюгах, що активуються під дією монооксиду вуглецю. Наприклад, відсутні відомості про роль різних пулів кальцію в реалізації стрес-протекторних ефектів донорів CO на рослини. Не ясно, чи задіяні у цих процесах АФК і оксид азоту, і якими шляхами вони можуть утворюватися під впливом на клітини CO.

Малодослідженими є і питання функціональних зв'язків газотрансмітерів з фітогормонами, особливо у частині участі білкових компонентів гормонального сигналінгу в реалізації стрес-протекторних ефектів на рослини NO, H<sub>2</sub>S і CO. При цьому, однак, дані, отримані методами біоінформатики вказують на можливе залучення білків родин COI, MYC та інших в реалізацію фізіологічної дії оксиду азоту, монооксиду вуглецю та інших сигнальних молекул. Слабо вивчена також феноменологія комбінованої дії на рослини екзогенних стресових фітогормонів (наприклад, саліцилової кислоти, брасиностероїдів) у поєднанні з донорами газотрансмітерів – оксиду азоту і сірководню. Водночас за оптимального поєднання цих сполук можливий їх синергічний стрес-протекторний ефект, що може бути важливим для ефективного практичного застосування вказаних сполук.

На з'ясування окреслених питань і була спрямована переважна частина дисертаційного дослідження.

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛ, УМОВИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 2.1. Матеріал для досліджень, його характеристика і підготовка до експериментів

У дослідженнях використовували рослини пшениці озимої м'якої (*Triticum aestivum* L.) сорту Досконала і арабідопсису (*Arabidopsis thaliana* L.) дикого типу (Col-0) та мутантних ліній *coil* і *jin1*.

Вибір етіолованих проростків пшениці як модельного об'єкта зумовлений їх зручністю порівняно із зеленими фотосинтезуючими рослинами для досліджень процесів, пов'язаних з редокс-регуляцією, що є складовою дії більшості сигнальних посередників (Minibayeva et al., 2009; Kolupaev et al., 2013). Особливо зручними для оцінки ефектів екзогенної дії сигнальних сполук (Minibayeva et al., 2001) і стресових чинників, наприклад, гіпертермії (Kolupaev et al., 2013) є корені інтактних проростків.

Для дослідження ролі специфічних білків жасмонатного сигналінгу (COI1 JIN1/MYC2) у реалізації фізіологічних (стрес-протекторних) ефектів газотрансмітерів NO, CO і H<sub>2</sub>S як модель використовували мутантні лінії, дефектні за відповідними білками жасмонатного сигналінгу – *coil* і *jin1* (Yastreb et al., 2018).

**2.1.1. Дизайн експериментів з використанням етіолованих проростків пшениці.** Насіння пшениці сорту Досконала генерації 2018-2019 рр. було надано для експериментів співробітниками Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України (оригіатор сорту). Зернівки незаражували 6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> протягом 30 хв, потім промивали дистильованою водою і пророщували у темряві за температури 20°C впродовж чотирьох діб на водопровідній воді, очищеній за допомогою системи водопідготовки, що включає в себе фільтр

механічного очищення, вугільний фільтр і напівпроникну зворотноосмотичну мембрану з розміром комірки 1 нм.

Чотиридобові етіольовані проростки використовували для дослідження впливу донорів газотрансмітерів та стресових фітогормонів на теплостійкість і функціонування стрес-протекторних систем. Як донор CO використовували гемін у кінцевих концентраціях діапазону 0,05-50 мкМ, донором сірководню слугував гідросульфід натрію – NaHS (0,025-1 мМ), а донором NO – нітропрусид натрію (НПН – 0,1-5 мМ). Вказані сполуки вносили у середовище інкубації проростків і витримували зразки на ньому протягом 24 год.

При дослідженні дії стресових фітогормонів 24-епібрасинолід (24-ЕБЛ – 5-200 нМ) та саліцилової кислоти (СК – 0,1-50 мкМ) на теплостійкість проростків і біохімічні показники вказані фітогормони також вносили у середовище інкубації проростків і витримували зразки 24 год.

В окремих серіях дослідів вивчали вплив комбінованої обробки проростків 24-ЕБЛ і НПН та СК і NaHS на їх теплостійкість і біохімічні показники.

Для оцінки участі сигнальних посередників у реалізації фізіологічних ефектів досліджуваних газотрансмітерів і фітогормонів використовували скавенджер CO гемоглобін (10 мкМ), скавенджери NO РТЮ (0,1 мМ) і метиленовий синій (10 мкМ), скавенджер пероксиду водню диметилтіосечовину (ДМТС, 150 мкМ), інгібітор пероксидази азид натрію ( $\text{NaN}_3$ , 1 мМ), інгібітор НАДФН-оксидази імідазол (10 мкМ), хелатор кальцію ЕГТА (500 мкМ), інгібітор утворення інозитол-1,4,5-фосфату неоміцин (200 мкМ), інгібітор нітратредуктази вольфрамат натрію (2 мМ) та інгібітор NO-синтази і діаміноксидази аміногуанідин (1 мМ). Також в експериментах використовували антагоністи  $\text{H}_2\text{S}$  (інгібітори L-цистеїндесульфгідрази; Li et al., 2015b) 0,3 мМ гідроксиламін і 0,3 мМ піруват калію. Концентрації усіх вказаних сполук, які найбільшою мірою модифікували досліджувані ефекти донорів газотрансмітерів та фітогормонів, але не чинили видимого токсичного впливу на проростки, вибирали на підставі попередніх дослідів. Інкубація

проростків на середовищі з усіма досліджуваними антагоністами сигнальних сполук становила 26 год. При вивченні впливу вказаних сполук у поєднанні з газотрансмітерами або фітогормонами їх вносили у середовище інкубації проростків за 2 год до початку обробки донорами газотрансмітерів або фітогормонами. При цьому загальний час інкубації проростків варіантів з комбінованою обробкою становив 26 год.

Оскільки при розкладанні геміну утворюються редокс-активні іони  $\text{Fe}^{2+}$  (Shekhawat et. al., 2010), для доказу специфічності його дії як донора CO в спеціальній серії експериментів порівнювали ефекти геміну з дією сульфату заліза (II) в концентрації 5 мкМ. Для доведення специфічності дії НПН як донора NO в окремій серії дослідів його вплив на теплостійкість проростків порівнювали з дією неактивної координаційної сполуки фериціаніду калію –  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ .

Під час інкубації проростків на досліджуваних розчинах визначали генерацію коренями супероксидного аніон-радикала, вміст у них пероксиду водню, активність антиоксидантних ферментів – супероксиддисмутази, каталази, розчинної і позаклітинної пероксидази, а також вміст сірководню, оксиду азоту та активність нітратредуктази. Після закінчення інкубації на розчинах проростки піддавали ушкоджуючому прогріву та відрощували протягом трьох діб для оцінки виживаності. Через певний час після ушкодувального прогріву проростків також визначали вихід з коренів речовин, що поглинають в УФ частині спектра, та вміст продукту пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) малонового діальдегіду (МДА).

**2.1.2. Дизайн експериментів з використанням рослин *Arabidopsis thaliana* L.** При дослідженні ролі компонентів жасмонатного сигналінгу у реалізації стрес-протекторних ефектів газотрансмітерів ( $\text{H}_2\text{S}$ , NO, CO) за дії сольового стресу використовували 4-тижневі рослини дикого типу (Col-0) та ліній, дефектних за жасмонатном сигналінгом – *coi1* (мутант за геном, що кодує білок COI1, який бере участь у видаленні білків-репресорів транскрипційних

факторів жасмонатного сигналінгу) і *jin1* (мутант за геном JIN1, що кодує білок транскрипційний фактор JIN1/MYC2, необхідний для трансдукції сигналу ЖАК) (Lorenzo et. al., 2004). Насіння мутантних рослин було люб'язно надано проф. J.M. Neuhaus (Університет Нашатель, Швейцарія).

Насіння висівали у пластикові циліндри з мінеральною ватою, після чого кювети з циліндрами, наповнені очищеною водопровідною водою, витримували протягом чотирьох діб у холодильнику за температури 10°C для синхронізації сходів, та впродовж ще двох діб у темряві за кімнатної температури. Надалі рослини вирощували на модифікованому середовищі Хогланда (Semchuk et. al., 2012) протягом 4-х тижнів при температурі 22/16°C (день/ніч), освітленні 6000 лк і фотоперіоді 10 год (Kolupaev, Yastreb, 2021). За таких умов рослини ще не переходили у фазу цвітіння, але накопичували достатню біомасу розетки.

Досліджувані сполуки – донор сірководню NaHS (50 мкМ), донор NO НПН (500 мкМ) та донор СО гемін (2 мкМ) – вносили у поживне середовище відповідних варіантів та інкубували на ньому рослини протягом 24 годин. Після цього рослини переносили на поживне середовище без донорів газотрансмітерів, але з додаванням 150 або 175 мМ NaCl. Після 24-годинної інкубації рослин в присутності хлориду натрію середовище змінювали на звичайне. У попередніх дослідах було встановлено, що такий вплив солі не призводив до втрати тургору, але викликав підвищення водного дефіциту і зниження вмісту хлорофілу у листках при подальшому рості рослин на середовищі без NaCl. Оптимальні концентрації NaHS, НПН та геміну були встановлені у попередніх дослідах.

Для усіх біохімічних аналізів використовували розвинуті розеткові листки 5-6 ярусів. Всі показники, за винятком вмісту фотосинтетичних пігментів – водний дефіцит, суха маса, проникність мембран, кількість продуктів ПОЛ (в основному МДА), активність антиоксидантних ферментів (СОД, каталази, гваяколпероксидази), вміст низькомолекулярних протекторних сполук (проліну, цукрів) та білку – визначали відразу після закінчення

стресового впливу. Вміст пігментів визначали через 2 доби після впливу солі. Як показали попередні дослідження, саме через такий час спостерігалось найбільш помітне зниження вмісту хлорофілу в листках.

## **2.2. Визначення фізіологічних і біохімічних показників**

**2.2.1. Вживаність проростків пшениці після ушкоджуючого прогріву.** Проростки піддавали ушкоджуючому прогріву у водяному ультратермостаті за температури 45°C протягом 10 хв (Kolupaev et. al., 2013). Далі їх переносили на очищену водопровідну воду і витримували протягом трьох діб за температури 20–22°C та освітлення 6000 лк для оцінки відносної кількості проростків, що вижили. До таких відносили проростки, що не мали виражених ознак некрозу на листках і зберігали здатність до росту. Температуру і час прогріву проростків вибирали у попередніх дослідженнях таким чином, щоб у контрольному варіанті вживаність становила близько 50%.

**2.2.2. Оцінка стану біомембран клітин коренів пшениці після теплового стресу.** Стан мембран клітин коренів оцінювали через 24 год після ушкоджуючого прогріву по виходу речовин, що поглинають в ультрафіолетовій (УФ-В) частині спектру (переважно вільних нуклеотидів; Melekhov, Efremova, 1990). Корені інтактних проростків занурювали у стаканчики з дистильованою водою на 1 год, після чого відокремлювали від проростків і зважували. Оптичну густину інкубаційного розчину визначали при  $A_{252}$  і  $A_{264}$ . Вихід речовин оцінювали в умовних одиницях як співвідношення усередненої величини, виміряної при вказаних довжинах хвилі, до маси коренів і виражали у відсотках до величин, розрахованих для коренів проростків, що не зазнали ушкоджуючого прогріву.

**2.2.3. Водний дефіцит листків рослин арабідопсису за умов сольового стресу.** Водний дефіцит оцінювали за насиченням зрізаних інтактних листків.



Вміст води у рослинному матеріалі визначали шляхом зважування, висушуючи зразки до сталої маси за температури 102-104°C. Показник виражали у відсотках від загального вмісту води в стані повного насичення (Goncharova, 2005).

#### **2.2.4. Вміст фотосинтетичних пігментів у листках арабідопсису.**

Хлорофіли та каротиноїди екстрагували з листків 96% етанолом, з додаванням невеликої кількості  $\text{CaCO}_3$  для нейтралізації кислот. Вміст пігментів визначали спектрофотометричним методом за довжин хвиль 665, 649 і 440,5 нм відповідно (Шлык, 1971). Кількість виражали в мг/г сухої маси.

**2.2.5. Генерація АФК рослинними об'єктами.** Генерацію коренями супероксидного аніон-радикалу визначали за відновленням нітросинього тетразолію (НСТ) з подальшим перетворенням його на формазан за методикою (Шорнинг и др., 2000) з модифікаціями (Колупаев и др., 2013). Інтактні проростки з попередньо відділеним ендоспермом ретельно промивали дистильованою водою і занурювали на 20 хв у 0,1 М  $\text{K}_2\text{Na}$ -фосфатний буфер (рН 7,6), який містив 0,05% НСТ, 10 мкМ ЕДТА і 0,1% Triton X100. Оптичну густину інкубаційних розчинів визначали при довжині хвилі 530 нм. Показник виражали у відсотках до величини у першій точці спостережень у контрольному варіанті.

Для визначення вмісту  $\text{H}_2\text{O}_2$  корені проростків пшениці гомогенізували на льоду в 5%-й ТХО. Проби центрифугували при 8000 g протягом 10 хв при температурі 2-4°C і в супернатанті визначали концентрацію пероксиду водню за феротіоціанатним методом, з використанням солі Мора і тіоціанату амонію. Світлопоглинання забарвленого комплексу вимірювали при 480 нм (Sagisaka, 1976). Вміст  $\text{H}_2\text{O}_2$  виражали в нмоль/г сирої маси.

Для визначення продуктів ПОЛ, що реагують з 2-тіобарбітуровою кислотою (переважно МДА), корені проростків пшениці або листки арабідопсису гомогенізували в реакційному середовищі, що містило 0,25%-ву

2-тіобарбітурову кислоту в 10%-й ТХО, гомогенат витримували на киплячій бані протягом 30 хв. Після цього проби різко охолоджували і центрифугували 15 хв при 10000 g. Оптичну густина супернатанту визначали при 532 нм (максимум світлопоглинання МДА) і 600 нм (для поправки на неспецифічне світлопоглинання) (Fazlieva et. al., 2012). Показник виражали у нмоль/г сирої маси.

**2.2.6. Вміст оксиду азоту.** Вміст NO у коренях проростків пшениці визначали за методом (Zhou et. al., 2005) з деякими модифікаціями. Метод базується на перетворенні ендогенного NO на нітрит, концентрація якого визначається за реакцією Грісса. Рослинний матеріал гомогенізували на льоду в 50 мМ ацетатному буфері (рН 3,6) з додаванням 2%-го ацетату цинку. Гомогенат центрифугували при 8000 g протягом 15 хв при температурі 2-4°C, після чого до 10 мл супернатанту додавали 250 мг деревного вугілля. Після фільтрації суміші, 2 мл фільтрату змішували з 1 мл 1%-го реактиву Грісса в 12%-й оцтовій кислоті. Світлопоглинання розчину визначали через 30 хв при довжині хвилі 530 нм. Як стандарт використовували розчини нітриту натрію. Вміст NO виражали у нмоль/г сирої маси.

**2.2.7. Вміст сірководню.** Вміст сірководню у коренях проростків пшениці визначали по реакції з 5,5'-дітіобіс-2-нітробензойною кислотою (ДТНБК; Li et al., 2014b). Наважки рослинного матеріалу гомогенізували на льоду при повному зануренні у реакційну суміш, що містила 0,4 мМ ДТНБК, 0,15 М К,Na-фосфатний буфер (рН 7,0) і 10 мМ ЕДТА. Гомогенат центрифугували на холоді при 10000 g протягом 15 хв. Оптичну густина супернатанту визначали при 412 нм. Як стандарт використовували розчини NaHS. Показник виражали у мкмоль/г сирої маси.

**2.2.8. Активність нітратредуктази.** Активність НР (КФ 1.7.1.1) визначали *in vitro* за кількістю накопиченого продукту реакції нітриту (Галеєва

и др., 2012). Корені проростків пшениці на льоду гомогенізували в 0,05 М К,Na-фосфатному буфері з рН 7,8, гомогенат центрифугували при 4000 g протягом 15 хв при температурі 2-4°C. До супернатанту додавали 0,1 М KNO<sub>3</sub> і 5 мМ НАД·Н. Контрольна проба замість НАД·Н містила дистильовану воду. Реакцію проводили при 25°C протягом 30 хв, після чого зупиняли льодяною оцтовою кислотою. Для осадження білків проби центрифугували протягом 10 хв при 8000 g. До супернатанту додавали 1%-й реактив Грісса в 12%-й оцтовій кислоті. Оптичну густину розчину вимірювали через 30 хв при 527 нм. Активність ферменту виражали в нмоль нітриту/(г сирої маси хв).

**2.2.9. Активність позаклітинної пероксидази.** Активність позаклітинної ПО (КФ 1.11.1.7) визначали у коренях проростків пшениці, як описано в (Minibayeva et. al., 2001) з модифікаціями. Корені інтактних проростків занурювали у дистильовану воду, рН якої доводили до 6,2 за допомогою NaOH. Через 20 хв проростки обережно діставали з інкубаційного розчину, корені відсікали, обсушували фільтрувальним папером і зважували, а в інкубаційному середовищі визначали активність ферменту за реакцією окислення гваяколу пероксидом водню. Активність ферменту виражали в мкмоль гваяколу/(г сирої маси хв).

**2.2.10. Активність антиоксидантних ферментів.** При визначенні активності антиоксидантних ферментів – супероксиддисмутази (СОД, КФ 1.15.1.1), каталази (КФ 1.11.1.6) і гваяколпероксидази (КФ 1.11.1.7) – наважки коренів пшениці або листків арабідопсису гомогенізували на холоді в 0,15 М К,Na-фосфатному буфері (рН 7,8), що містив ЕДТА (0,1 мМ) і дітіотрейтол (1мМ) (Karpets et. al., 2015). Для аналізу використовували супернатант після центрифугування гомогенату при 8000 g протягом 10 хв при 4°C.

Активність цитозольної СОД визначали при рН 7,8, використовуючи метод, що базується на здатності ферменту конкурувати з нітросинім тетразолієм за супероксидні аніони, які утворюються за аеробної взаємодії

НАД·Н і феназинметосульфату. Оптичну густина вимірювали за довжини хвилі 540 нм й виражали в умовних одиницях/(г сирої маси хв). Активність каталази аналізували при рН 7,0 за кількістю пероксиду водню, розкладеного за одиницю часу і виражали в ммоль  $\text{H}_2\text{O}_2$ /(г сирої маси хв). Активність розчинної внутрішньоклітинної пероксидази визначали, використовуючи як донора водню гваякол, а як субстрат – пероксид водню. Виражали показник в ммоль гваяколу/(г сирої маси хв).

**2.2.11. Вміст проліну.** Вміст проліну визначали за методом Bates і співавт. (1973) з модифікаціями. Сполуку екстрагували з листків арабідопсису дистильованою водою при 10 хв кип'ятінні у водяній бані, після чого екстракт фільтрували і в рівних пропорціях додавали льодяну оцтову кислоту та нінгідринний реактив. Проби витримували у киплячій водяній бані протягом 1 год. Оптичну густина визначали при довжині хвилі 520 нм. Як стандарт використовували L-пролін. Показник виражали в ммоль/г сухої маси.

**2.2.12. Вміст цукрів.** Сумарний вміст цукрів у листках арабідопсису визначали за методом Моріса-Рое (Zhao et. al., 2003) з модифікаціями. Для їх екстракції рослинний матеріал гомогенізували у дистильованій воді і надалі гомогенат кип'ятили протягом 10хв. Для осадження білків до екстракту додавали однакові об'єми розчинів сульфату цинку (30%) і жовтої кров'яної солі (15%). Проби фільтрували й за необхідності розбавляли дистильованою водою у декілька разів, після чого додавали 1 мл у реакційні пробірки з 3 мл антронового реактиву. У контрольну пробірку замість фільтрату додавали 1 мл дистильованої води. Проби кип'ятили на водяній бані протягом 7 хв, охолоджували й визначали світлопоглинання при 610 нм. Як стандарт використовували D-глюкозу. Показник виражали в мг/г сухої маси.

**2.2.13. Супутні аналізи.** Масу рослин визначали ваговим методом. Для визначення сухої маси, рослинні зразки висушували до сталої маси за

температури 102-104°C. Вміст білку визначали за методом Bradford (1976) з використанням бичачого сироваткового альбуміну як стандарту.

### 2.3. Повторення і статистична обробка результатів

Всі досліди проводились в 4-5 кратному біологічному повторенні і кожен незалежно відтворювали 3-4 рази. Наважки рослинного матеріалу відбирали щонайменше з 6-7 рослин. Для оцінки виживаності рослин після дії теплового стресу, у кожному варіанті досліду було не менше 30 зразків рослинного матеріалу. У експериментах з визначення біохімічних показників використовували для кожного біологічного повторення використовували середню пробу не менш ніж з шести рослин.

Статистична обробку даних, отриманих під час експериментів, проводили за допомогою програмного середовища R (остання версія 4.0.3 від 10.10.2020) з використанням базових функцій (пакет *stats*) та спеціального статистичного пакету *psych* ('psych', 2020). Візуалізація результатів експериментів проведена з використанням *ggplot2* (пакет для створення графіки в R) або графічного функціоналу *MS Excel 2016*.

Для оцінки результатів експериментів використовувався ряд статистичних критеріїв: тест Шапіро-Вілка для перевірки нормальності розподілу, тест Бартлетта для перевірки гомогенності дисперсій, t-критерій Ст'юдента, непараметричний критерій Уїлкоксона, F-критерій Фішера а також дисперсійний аналіз. На рисунках і в таблицях наведені середні значення та їх стандартні похибки. Крім спеціально відзначених випадків, обговорюються результати, достовірні при  $P \leq 0,05$ . Однаковими латинськими літерами на рисунках позначені величини, відмінності між якими не достовірні при  $P \leq 0,05$ .

### РОЗДІЛ 3. МОНООКСИД ВУГЛЕЦЮ І АДАПТАЦІЯ РОСЛИН ДО ГІПЕРТЕРМІЇ

Монооксид вуглецю (CO) є одним із газотрансмітерів тваринних і рослинних клітин (Wang, Liao, 2016). CO як сигнальна молекула взаємодіє з іншими посередниками та фітогормонами і таким чином бере участь в регуляції ростових процесів та адаптивних реакцій рослин (Wang, Liao, 2016). Як уже зазначалося, у рослинних клітинах, як і в тваринних, монооксид вуглецю утворюється переважно за допомогою гемоксигенази, яка в присутності НАДФН/ферредоксинредуктази, ферредоксину або аскорбату перетворює молекулу гема на білівердин IX $\alpha$  з вивільненням іонів Fe<sup>2+</sup> та CO (Shekhawat, Verma, 2010). Серед чотирьох виявлених у рослин генів гемоксигеназ найбільш інтенсивно експресується *HO1*. Саме експресія гена гемоксигенази-1 зазвичай посилюється в стресових умовах, зокрема, при зневодненні (Liu et al., 2010), дії солей (Verma et al., 2015) та високих температур (Cheng et al., 2018).

Для досліджень фізіологічних ефектів CO у рослинних і тваринних клітинах зазвичай використовують його донори, які є штучними субстратами для гемоксигенази, зокрема, гематин (Li, Gu, 2016) та гемін (Chen et al., 2018). У ряді робіт показано підвищення стійкості рослин до осмотичного (Liu et al., 2010), сольового (Ling et al., 2009) стресів, іонів важких металів (Meng et al., 2011) під впливом газоподібного монооксиду вуглецю та його донорів. Проте роль CO в адаптації рослин до стресових температур досліджена дуже слабо. Є відомості про підвищення виживаності культури клітин тютюну за дії гематину (Li, Gu, 2016) та підвищення ендогенного вмісту CO в умовах гіпертермії (Cheng et al., 2018). Водночас дані про вплив донорів монооксиду вуглецю на теплостійкість інтактних рослин відсутні. Відкритим залишається і питання про участь інших молекул-посередників у реалізації стрес-протекторної дії CO на рослинні об'єкти.

Було досліджено феноменологію впливу геміну, як донора монооксиду азоту, на теплостійкість проростків пшениці, стан ферментативної антиоксидантної системи та участь інших сигнальних посередників (АФК, іонів кальцію, NO) у реалізації стрес-протекторного впливу екзогенного CO. При цьому для оцінки змін вмісту NO, АФК і редокс-гомеостазу використовували корені інтактних проростків пшениці, які є зручною моделлю для дослідження «швидких» відповідей на екзогенні впливи (Minibaeva et al., 2001; Kolupaev et al., 2013). Зокрема, ця модель широко використовується для дослідження процесів, пов'язаних з ефектами позаклітинних форм пероксидази, утворенням супероксидного аніон-радикала, оскільки дозволяє визначати ці показники методами неруйнівного контролю (Minibaeva et al., 2001).

### **3.1. Феноменологія впливу донора CO геміну на теплостійкість проростків пшениці**

Обробка геміном підвищувала виживаність проростків пшениці після ушкоджуючого прогріву (рис. 3.1, а). Тенденція до підвищення теплостійкості проростків відзначалася за впливу мінімальної досліджуваної концентрації – 0,05 мкМ. Вірогідний ефект спостерігався при використанні донора CO в концентраціях діапазону 0,5-10 мкМ. Вища концентрація геміну (50 мкМ) захисної дії не чинила. У подальших експериментах гемін використовували в концентрації 5 мкМ, яка була найбільш ефективною.

Обробка проростків 10 мкМ гемоглобіном не впливала на їх теплостійкість (рис. 3.1, б). При цьому гемоглобін, який має здатність зв'язувати CO, в комбінації з геміном повністю усував стрес-протекторну дію останнього. Це свідчить про те, що ефекти геміну спричинені його дією саме як донора CO і не пов'язані з можливим впливом інших продуктів реакції, що утворюються при перетворенні геміну гемоксигеназою-1 (іони  $Fe^{2+}$  та білівердин; Shekhawat, Verma, 2010). Для додаткового підтвердження зв'язку ефектів геміну саме з утворенням CO порівнювали його вплив з дією  $FeSO_4$ .

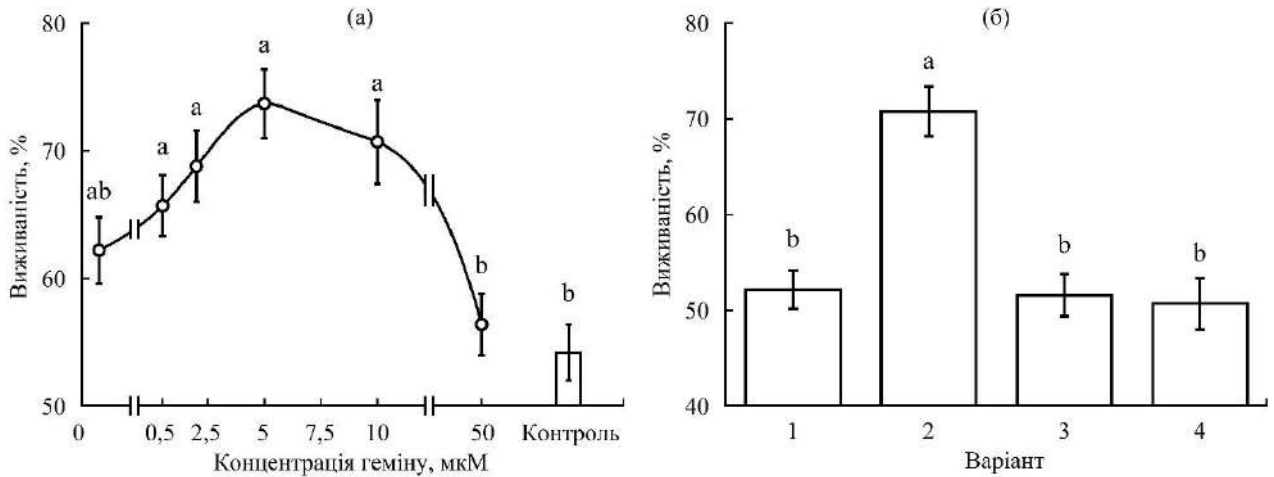


Рис. 3.1. Вплив геміну на виживаність (%): а - концентраційна залежність протекторного ефекту геміну; б - нівелювання ефекту геміну скавенджером СО гемоглобіном: 1 - контроль; 2 - гемін (5 мкМ); 3 - гемоглобін (10 мкМ); 4 - гемін (5 мкМ) + гемоглобін (10 мкМ).

Протягом першої доби після ушкоджуючого прогріву проростки залишалися живими, їх пошкодження не візуалізувалися. Однак вплив стресора більш ніж на 80% посилював вихід з коренів речовин, що поглинають в УФ-В області (див. п 3.3, рис. 3.8, а). Обробка проростків геміном зменшувала цей ефект майже на 30%, що свідчить про мембрано-протекторний вплив донору СО.

Через добу після ушкоджуючого прогріву вміст продукту ПОЛ МДА в коренях проростків у контрольному варіанті збільшувався більш ніж на 40% (див. п. 3.4, рис. 3.12, а). Обробка проростків геміном значно зменшувала окислювальні пошкодження, про що свідчить лише невелике підвищення вмісту МДА в коренях проростків відповідного варіанта.

Отримані результати свідчать про позитивний вплив обробки проростків пшениці геміном на їх теплостійкість. Цей ефект проявлявся в збереженні цілісності мембран, яка визначається за виходом речовин, що поглинають в ультрафіолетовій області спектра, зменшенні окиснювальних пошкоджень



(відсутності значного накопичення МДА) порівняно з контрольним варіантом та в підвищенні інтегрального показника – виживаності проростків через 3 доби після ушкоджуючого прогріву (рис. 3.1). Є підстави стверджувати, що стрес-протекторні ефекти геміну в умовах наших експериментів пов'язані з його дією саме як донора СО. Як зазначалося, захисний вплив на проростки при гіпертермії повністю усувався скавенджером монооксиду вуглецю гемоглобіном. Крім того, редокс-активний продукт реакції розкладання геміну -  $\text{Fe}^{2+}$ , як показали спеціальні дослідження з використанням  $\text{FeSO}_4$  у концентрації 5 мкМ (еквімолярній концентрації геміну), не впливав на стан мембран клітин коренів та виживаність проростків після прогріву (див. п. 3.2. і 3.3). Слід зазначити, що солі  $\text{Fe}^{2+}$  використовуються в експериментах як агенти окиснювального стресу. Однак, як було показано раніше, при обробці проростків пшениці  $\text{FeSO}_4$  викликав помітний прояв ефекту окиснювального стресу у концентрації 5 мМ (Xuan et al., 2007), тобто на три порядки вищій від тієї, що використовувалася в наших експериментах.

### **3.2. Вплив донора СО на стан ферментативної антиоксидантної системи**

Ефекти підвищення під впливом екзогенного монооксиду вуглецю активності антиоксидантних ферментів у рослин різних таксономічних груп, особливо у стресових умовах, виявлено у ряді досліджень (Ling et al., 2009; Zhang et al., 2012; Bai et al., 2012). Слід відзначити, що в контексті стійкості рослин до гіпертермії, вплив донорів монооксиду вуглецю на стан ферментативної антиоксидантної системи до цього часу спеціально не досліджувався. Тому було доцільним дослідити вплив геміну на активність ключових антиоксидантних ферментів в звичайних умовах і після ушкоджуючого прогріву проростків.

Обробка проростків геміном викликала підвищення активності СОД у коренях, достовірний ефект відзначався через 24 годин після початку впливу

донора СО (табл. 3.1). Після прогріву у контрольному варіанті активність ферменту істотно не змінювалася, а у варіанті з обробкою геміном знижувалася і була на рівні відповідних значень контролю.

Тенденція до підвищення активності каталази під впливом донора СО відзначалася вже через 4 години після початку обробки, а до 24 год збільшення активності ферменту було більш істотним (табл. 3.1). Ушкоджуючий прогрів викликав зниження активності каталази як в контролі, так і при обробці донором монооксиду вуглецю. Однак, у варіанті з СО абсолютна величина активності ферменту була вищою, ніж у відповідному контролі.

Активність внутрішньоклітинної розчинної пероксидази під впливом обробки коренів геміном достовірно підвищувалася через 24 год (табл. 3.1). Ушкоджуючий прогрів викликав невелике збільшення активності розчинної пероксидази в контролі. У варіанті з донором СО активність ферменту змінювалася несуттєво. При цьому абсолютні величини активності пероксидази у випадку з обробкою проростків геміном були достовірно вищі, ніж у відповідному контролі.

Таблиця 3.1. Активність антиоксидантних ферментів у коренях проростків пшениці при обробці геміном та дії теплового стресу

Варіант	Фаза експерименту			
	Через 1 год після початку обробки геміном	Через 4 год після початку обробки геміном	Через 24 год після початку обробки геміном	Через 24 год після ушкоджуючого прогріву
СОД, ум. од./г сирої речовини хв)				
Контроль	17,9 ± 0,30	18,6 ± 0,32	18,9 ± 0,33	19,2 ± 0,52
Гемін (5 мкМ)	18,9 ± 0,37	20,3 ± 0,41	24,4 ± 0,46	19,6 ± 0,60
Каталаза, ммоль Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub> /г сирої речовини хв)				
Контроль	0,693 ± 0,012	0,682 ± 0,014	0,667 ± 0,016	0,492 ± 0,010
Гемін (5 мкМ)	0,756 ± 0,014	0,779 ± 0,017	0,814 ± 0,024	0,566 ± 0,014
Гваяколпероксидаза, ум. од./г сирої речовини хв)				
Контроль	1,92 ± 0,06	2,01 ± 0,05	2,06 ± 0,08	2,34 ± 0,06
Гемін (5 мкМ)	2,12 ± 0,05	2,23 ± 0,06	2,72 ± 0,04	2,83 ± 0,06

### 3.3. АФК та іони кальцію як посередники у реалізації стрес-протекторного впливу екзогенного СО

Сигнальні молекули, як правило, реалізують свої фізіологічні ефекти не відокремлено, а як учасники сигнальної мережі. Посередниками, задіяними у реалізації фізіологічних ефектів СО як сигнальної молекули, можуть бути активні форми кисню (АФК) та іони кальцію.

Так, показано, що спричинюваний гематином або газоподібним СО ефект закривання продихів у бобів пригнічувався антиоксидантом аскорбатом і інгібітором НАДФН-оксидази діфеніленіодоніумом (She, Song, 2008). НАДФН-оксидаза є одним з основних ферментів, що генерують АФК на зовнішній поверхні клітин (Glyan'ko, Ischenko, 2010). Можна припустити, що в окремих ефектах монооксиду вуглецю бере участь і пероксидаза, яка розглядається не тільки як один з антиоксидантних ферментів, а й в якості каталітичної системи, що генерує АФК (Sharova, Medvedev, 2017). Ця функція особливо властива позаклітинним формам пероксидази (Minibayeva et al., 2009). Показано, що стимульоване гематином або геміном подовження коренів проростків пшениці супроводжувалося утворенням пероксиду водню і усувалося інгібітором пероксидази саліцилгідроксамовою кислотою (Xuan et al., 2007).

Як уже зазначалося, роль кальцію в прояві сигнальних ефектів СО у рослин вивчена поки дуже слабо. Для тваринних клітин є дані про можливість впливу СО на білки іонних каналів, в тому числі кальцієвих каналів L-типу (Wilkinson, Kemp, 2011). Однак не виключено, що ці ефекти можуть бути опосередковані дією АФК, що утворюються в клітинах під впливом СО. У деяких роботах, виконаних на рослинних об'єктах, показано усунення фізіологічної дії монооксиду вуглецю і його донорів в присутності кальцієвих антагоністів. Так, ростовий вплив гематину на проростки пшениці усувався антагоністами кальцію ЕГТА і рутенієвим червоним (Sa et al., 2007). Також показано, що при індукуванні утворення латеральних коренів у рису обробкою

метилжасмонатом (Hsu et al., 2013b) або хлоридом кобальту (Hsu et al., 2013a), іони  $\text{Ca}^{2+}$  діють нижче від гемоксигенази і СО.

Між АФК та іонами кальцію як сигнальними посередниками існує тісний функціональний зв'язок. Іони кальцію необхідні для активації НАДФН-оксидази (Ogasawara et. al., 2008) і стабілізації структури пероксидази (Gazaryan et al., 2006), яка, як зазначалося вище, може каталізувати генерацію АФК. З іншого боку, стан кальцієвих каналів різних типів залежить від утворення АФК у позаклітинному просторі (Demidchik, 2012).

Зважаючи на це, вивчали участь різних пулів кальцію в регуляції донором СО геміном утворення і знешкодження АФК в коренях проростків пшениці та індукування їх теплостійкості.

При вивченні динаміки АФК за обробки проростків донором СО вже через 1 год після початку інкубації у коренях відзначалося помітне підвищення вмісту пероксиду водню (рис. 3.2). Його кількість була максимальною через 2 год від початку спостережень, а потім поступово знижувалась і через 24 год поверталась до значень контролю.

Тенденція до збільшення активності позаклітинної ПО у коренях спостерігалася вже через 30 хв після початку інкубації (рис. 3.2), однак цей ефект не був достовірним при  $P \leq 0.05$ . Найбільш істотне підвищення активності ферменту відзначалося через 1,5 год від початку впливу геміну, потім вона дещо знижувалася, а через 24 год інкубації майже не відрізнялася від контролю. Таким чином, динаміка вмісту пероксиду водню та активності позаклітинної ПО була дуже схожою. При цьому максимальне підвищення активності ферменту трохи випереджало часовий максимум вмісту  $\text{H}_2\text{O}_2$  (рис. 3.2). Такі результати вказують на можливий причинно-наслідковий зв'язок між активацією під впливом обробки донором СО позаклітинної ПО і підвищенням вмісту пероксиду водню у коренях.

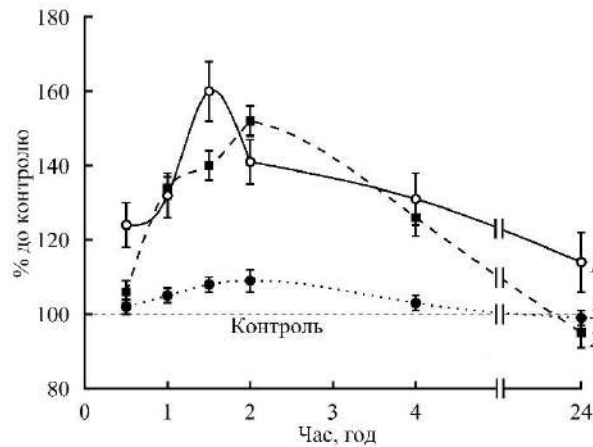


Рис. 3.2. Динаміка активності позаклітинної гваяколпероксидази (1), вмісту пероксиду водню (2) і генерації супероксидного аніон-радикала (3) у коренях проростків пшениці при обробці 5 мкМ геміном (% до контролю).

Водночас, обробка геміном слабо змінювала генерацію супероксидного аніон-радикала коренями проростків (рис. 3.2). Так, лише через 1,5–2,0 год від початку інкубації у середовищі з геміном відзначалася тенденція до посилення утворення  $O_2^{\cdot-}$  (ефект вірогідний при  $P \leq 0,1$ ).

Обробка проростків гемоглобіном істотно не впливала на вміст пероксиду водню у коренях, хоча і викликала незначне підвищення активності позаклітинної ПО (рис. 3.3). При цьому гемоглобін повністю усував спричинюваний обробкою геміном ефект підвищення вмісту  $H_2O_2$  і значною мірою нівелював підвищення активності позаклітинної ПО, що відбувалося в присутності донора CO. Сульфат заліза (II) у концентрації, еквімолярній концентрації геміну, не впливав ні на вміст  $H_2O_2$  у коренях, ні на активність позаклітинної ПО (рис. 3.3), що також свідчить про специфічність впливу геміну як донора CO.

Як і слід було очікувати, обробка проростків інгібітором ПО азидом натрію знижувала активність позаклітинної форми ферменту. При цьому під дією  $NaN_3$  повністю усувалося підвищення активності ПО, спричинюване донором CO (рис. 3.3, б). Також азид натрію знижував вміст пероксиду водню у

коренях і повністю усував його підвищення в присутності геміну (рис. 3.3, а). У той же час інгібітор НАДФН-оксидази імідазол практично не впливав на викликаний донором СО ефект підвищення вмісту  $H_2O_2$  у коренях.

У присутності скавенджера пероксиду водню ДМТС його вміст у коренях знижувався, також при обробці ДМТС не реєструвалося підвищення вмісту пероксиду водню у варіанті з геміном (рис. 3.3, а).

В цілому, отримані результати вказують, що гемін, діючи як донор СО, чинив досить специфічний вплив на генерацію пероксиду водню коренями проростків пшениці. Цей ефект, ймовірно, зумовлений підвищенням активності позаклітинної ПО, яка може генерувати АФК, в тому числі пероксид водню (рис. 3.2, 3.3).

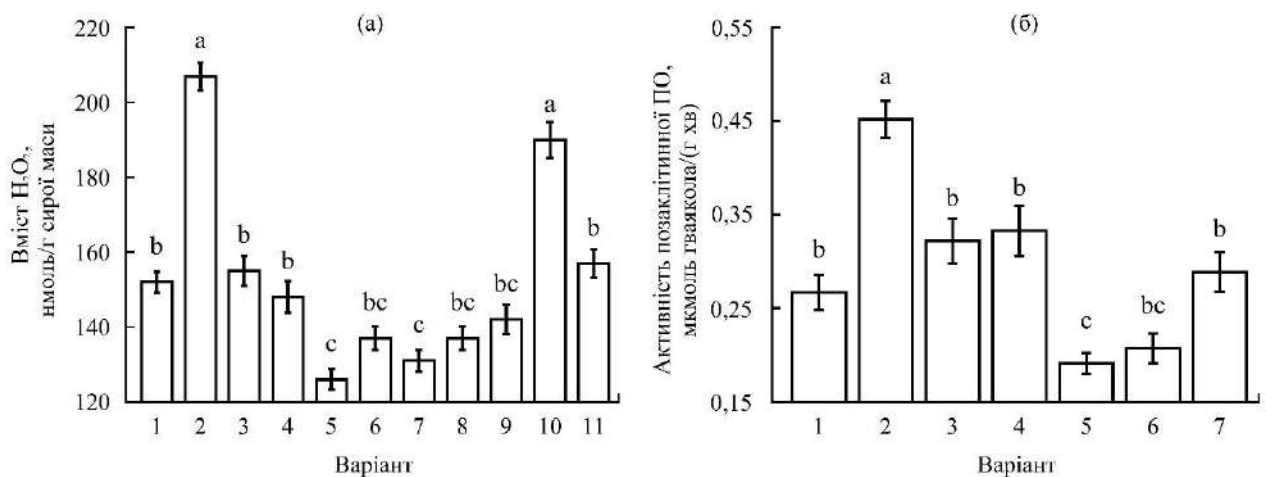


Рис. 3.3. Вплив геміну, гемоглобіну, ДМТС, азиду натрію, імідазолу і  $FeSO_4$  на вміст пероксиду водню (а) і активність позаклітинної ПО (б) у коренях пшениці. (а): 1 - контроль; 2 - гемін (5 мкМ); 3 - гемоглобін (10 мкМ); 4 - гемін (5 мкМ) + гемоглобін (10 мкМ); 5 - ДМТС (150 мкМ); 6 - гемін (5 мкМ) + ДМТС (150 мкМ); 7 - азид натрію (1 мМ); 8 - гемін (5 мкМ) + азид натрію (1 мМ); 9 - імідазол (10 мкМ); 10 - гемін (5 мкМ) + імідазол (10 мкМ); 11 -  $FeSO_4$  (5 мкМ); (б): 1 - контроль; 2 - гемін (5 мкМ); 3 - гемоглобін (10 мкМ); 4 - гемін (5 мкМ) + гемоглобін (10 мкМ); 5 - азид натрію (1 мМ); 6 - гемін (5 мкМ) + азид натрію (1 мМ); 7 -  $FeSO_4$  (5 мкМ).

Для доказу причинно-наслідкового зв'язку між викликаним обробкою геміном підвищенням вмісту пероксиду водню у коренях і збільшенням активності антиоксидантних ферментів (табл. 3.1) оцінювали вплив донора СО на їх активність у присутності скавенджера  $\text{H}_2\text{O}_2$  ДМТС. Обробка цією сполукою сама по собі не впливала на активність СОД, але усувала її підвищення, спричинюване дією геміну (рис. 3.4, а).

Через 24 години після ушкоджуючого прогріву у контролі активність СОД не змінювалась, а у варіанті з геміном дещо знижувалася. У варіантах з ДМТС і його комбінацією з геміном активність СОД після прогріву суттєво не змінювалась. Обробка проростків сульфатом заліза (II) не впливала на активність СОД як до, так і після ушкоджуючого прогріву (рис. 3.4, а).

У присутності ДМТС активність каталази у коренях не змінювалась, при цьому скавенджер пероксиду водню усував її підвищення, викликане обробкою геміном (рис. 3.4, б). Сульфат заліза (II) не впливав на активність ферменту у коренях проростків. Після ушкоджуючого прогріву активність каталази у всіх дослідних варіантах знижувалася до приблизно однакових величин, але у варіанті з геміном її абсолютні значення були дещо вищі, ніж у контролі (рис. 3.4, б).

Активність ПО в присутності ДМТС не змінювалась, проте скавенджер  $\text{H}_2\text{O}_2$  в значній мірі нівелював її підвищення, спричинюване обробкою проростків геміном (рис. 3.4, в). Під дією  $\text{FeSO}_4$  активність ферменту не змінювалась. Після ушкоджуючого прогріву активність ПО у коренях проростків контрольного варіанта дещо підвищувалася, а у варіанті з обробкою геміном не змінювалась (рис. 3.4, в). При цьому абсолютні величини у варіанті з донором СО вірогідно перевищували значення контролю. У всіх інших варіантах досліді відмінності в активності від відповідних значень контролю були несуттєвими.

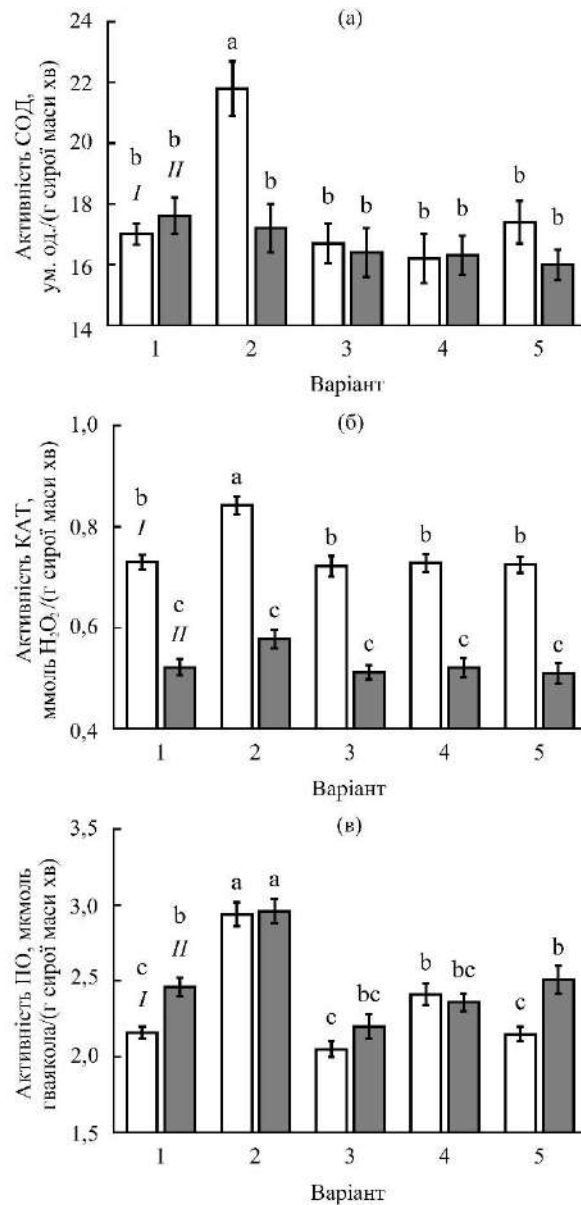


Рис. 3.4. Вплив геміну, ДМТС і FeSO<sub>4</sub> на активність СОД (а), каталази (КАТ; б) і гваяколпероксидази (ПО; в) у коренях проростків пшениці. 1 - контроль; 2 - гемін (5 мкМ); 3 - ДМТС (150 мкМ); 4 - гемін (5 мкМ) + ДМТС (150 мкМ); 5 - FeSO<sub>4</sub> (5 мкМ). I - перед ушкоджуючим прогрівом; II - через 24 годин після прогріву.

Протягом першої доби після ушкоджуючого прогріву проростки залишалися живими, їх пошкодження не візуалізувалися. Однак вихід сполук, що поглинають в ультрафіолетовій області спектра, з клітин коренів через добу після прогріву в контрольному варіанті збільшувався майже в два рази у



порівнянні з відповідним показником у проростків, які не піддавалися прогріву (рис. 3.5, а). Обробка геміном значно знижувала вихід речовин з коренів проростків після ушкоджуючого прогріву. Під впливом ДМТС, що має антиоксидантні властивості, вихід сполук, що поглинають в ультрафіолетовій області, трохи зменшувався, проте цей ефект не був достовірним при  $P \leq 0.05$ . У той же час вплив ДМТС практично повністю усував позитивний вплив геміну на стабільність мембран клітин коренів. Обробка сульфатом заліза (II) не чинила впливу на викликаний ушкоджуючим прогрівом вихід з клітин коренів сполук, що поглинають в ультрафіолетовій області спектра (рис. 3.5, а).

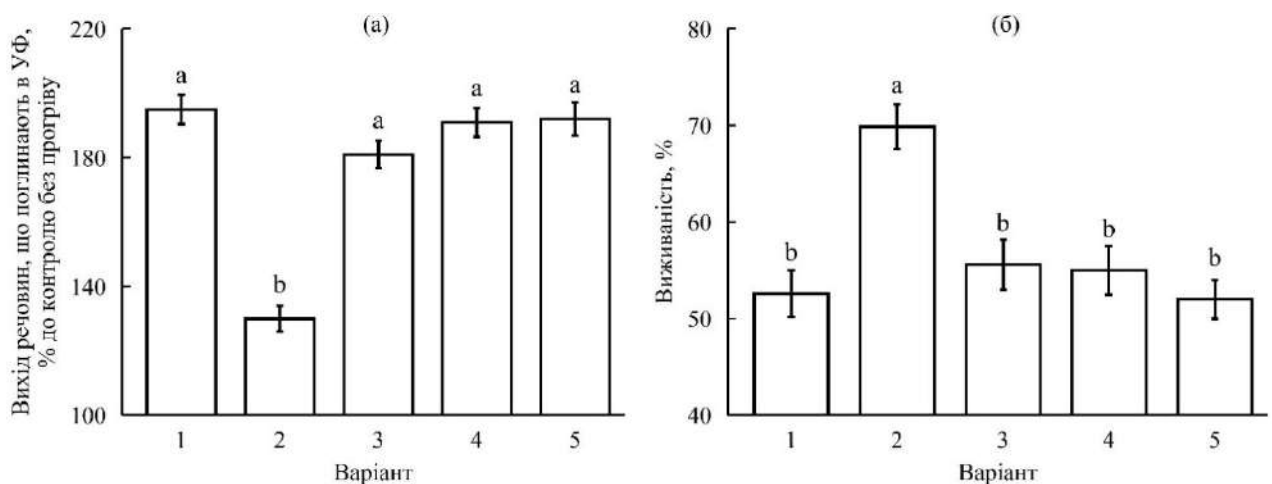


Рис. 3.5. Вихід речовин, що поглинають в ультрафіолетовій (УФ) області спектра, з коренів проростків пшениці (а) і виживаність проростків (б) після ушкоджуючого прогріву. 1 - контроль; 2 - гемін (5 мкМ); 3 - ДМТС (150 мкМ); 4 - гемін (5 мкМ) + ДМТС (150 мкМ); 5 - FeSO<sub>4</sub> (5 мкМ).

Інтегральний показник виживаність проростків через 3 доби після стресового впливу цілком відповідав показнику виходу речовин, поглинаючих в ультрафіолетовій області спектра, який визначали раніше - через 1 добу після прогріву (рис. 3.5, б). Так, під впливом геміну виживаність проростків значно збільшувалася, при обробці ДМТС майже не змінювалася, а при комбінованій дії скавенджера пероксиду водню і геміну захисна дія останнього не

проявлялася. Обробка проростків  $\text{FeSO}_4$  не чинила впливу на їх виживаність після ушкоджуючого прогріву.

Отримані дані свідчать про те, що фізіологічні ефекти донора СО геміну, ймовірно, реалізуються з участю пероксиду водню як сигнального посередника. Так, під впливом геміну відбувалося транзиторне підвищення вмісту  $\text{H}_2\text{O}_2$  у коренях проростків (рис. 3.2). Схожу динаміку мала і активність позаклітинної ПО (рис. 3.2), яку розглядають як одного з важливих продуцентів пероксиду водню (Sharova, Medvedev, 2017). Відомо, що пероксидаза при наявності достатнього пулу відновників має здатність безпосередньо генерувати пероксид водню, а не тільки супероксидний аніон-радикал, що перетворюється потім в  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Sharova, Medvedev, 2017; Bolwell, Wojtaszek, 1997). Активацію саме такого механізму утворення пероксиду водню можна вважати ймовірною при обробці коренів проростків пшениці геміном, оскільки він викликав значне підвищення вмісту пероксиду водню у коренях при слабкому посиленні генерації супероксидного аніон-радикала (рис. 3.2).

Результати інгібіторного аналізу також свідчать про участь позаклітинної ПО в утворенні АФК у коренях під впливом донорів СО. Так, інгібітор ПО азид натрію викликав пригнічення активності позаклітинної форми цього ферменту (рис. 3.3, б) та усував підвищення вмісту пероксиду водню у коренях проростків, оброблених донором СО (рис. 3.3, а). Ці результати узгоджуються з іншим ефектом, вивченим у роботі Хуан зі співавт. (2007). У ній показано усунення викликаного гематином посилення росту коренів проростків пшениці при їх обробці не тільки скавенджером пероксиду водню йодидом калію, а й інгібітором ПО саліцилгідроксамовою кислотою.

Ймовірно, посилення утворення  $\text{H}_2\text{O}_2$  у коренях проростків при обробці донором СО є процесом, важливим для активації антиоксидантної системи. Так, викликане донором СО підвищення активності СОД, катали і гваяколпероксидази у коренях практично не проявлялося при їх обробці скавенджером пероксиду водню ДМТС (рис. 3.4).

Як сигнальна молекула CO, ймовірно, перебуває у складній функціональній взаємодії не тільки з АФК, а й багатьма іншими сигнальними посередниками (Kolupaev et al., 2019d), зокрема іонами кальцію.

В окремих серіях експериментів інгібиторним методом досліджували можливу роль надходження кальцію з позаклітинного простору і внутрішньоклітинних компартментів у цитозоль в регуляції активності позаклітинної пероксидази і вмісту пероксиду водню у коренях при дії на них геміну. Обробка проростків хелатором позаклітинного кальцію ЕГТА викликала тенденцію до невеликого зниження активності позаклітинної пероксидази у коренях (рис. 3.6, а). Однак цей ефект не був достовірним при  $P \leq 0,05$ . При цьому ЕГТА повністю усував викликане донором CO підвищення активності позаклітинної пероксидази. Під впливом неоміцину також спостерігалася тенденція до незначного зниження активності ферменту. Неоміцин, як і ЕГТА, повністю нівелював підвищення активності позаклітинної пероксидази при обробці проростків геміном (рис. 3.6, а).

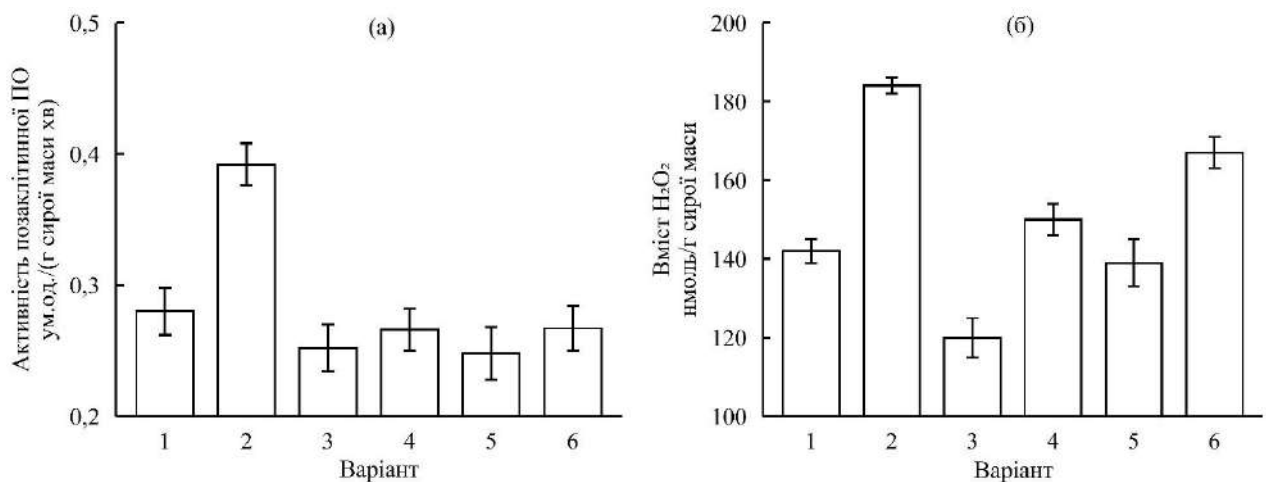


Рис. 3.6. Вплив геміну і антагоністів кальцію на активність позаклітинної гваяколпероксидази (а) і вміст пероксиду водню (б) у коренях проростків пшениці. 1 - контроль; 2 - гемін (5 мкМ); 3 - ЕГТА (500 мкМ); 4 - гемін (5 мкМ) + ЕГТА (500 мкМ); 5 - неоміцин (200 мкМ); 6 - гемін (5 мкМ) + неоміцин (200 мкМ).

Обробка ЕГТА трохи знижувала вміст пероксиду водню (рис. 3.6, б), ефект проявлявся на рівні тенденції ( $P \leq 0,1$ ). При цьому зазначений інгібітор майже повністю знімав ефект збільшення вмісту пероксиду водню, спричинюване обробкою донором СО. Інший антагоніст кальцію – неоміцин – сам по собі не впливав на вміст пероксиду водню у коренях, проте помітно, хоча і не повністю, знижував прояв ефекту підвищення вмісту  $H_2O_2$  під дією геміну (рис. 3.6, б).

Ці результати дають підстави вважати, що для спричинюваного донором СО підвищення активності позаклітинної пероксидази і накопичення пероксиду водню необхідне надходження кальцію в цитозоль, як з позаклітинного простору, так і з внутрішніх компартментів.

Як уже зазначалося, найбільш помітні зміни активності антиоксидантних ферментів проявлялися через 24 год після обробки геміном (табл. 3.1), тому саме в цій часовій точці досліджували можливе значення кальцію для реалізації впливу екзогенного СО на активність СОД, каталази і пероксидази.

Обробка проростків ЕГТА викликала деяке зниження активності СОД і усувала ефект її підвищення, який спостерігався під дією донора СО (рис. 3.7, а). Під час інкубації коренів в присутності неоміцину активність СОД не змінювалася, в той же час цей антагоніст кальцію повністю нівелював збільшення активності ферменту, яке відбувалося при обробці геміном.

Активність каталази у варіантах з обробкою проростків обома досліджуваними антагоністами кальцію (ЕГТА і неоміцином) не змінювалася (рис. 3.7, б). Однак як хелатор позаклітинного кальцію, так і інгібітор синтезу інозитол-1,4,5-фосфату повністю усували викликане донором СО підвищення активності ферменту в коренях.

У присутності в середовищі ЕГТА відзначалася тенденція до зниження активності розчинної пероксидази (рис. 3.7, в). При цьому у варіанті з поєднанням обробки коренів геміном і ЕГТА не тільки не відбувалося підвищення активності ферменту, а й спостерігалось її зниження у порівнянні з

контролем. Обробка неоміцином сама по собі викликала зниження активності розчинної пероксидази у коренях і повністю усувала її підвищення, викликане дією донора СО (рис. 3.7, в).

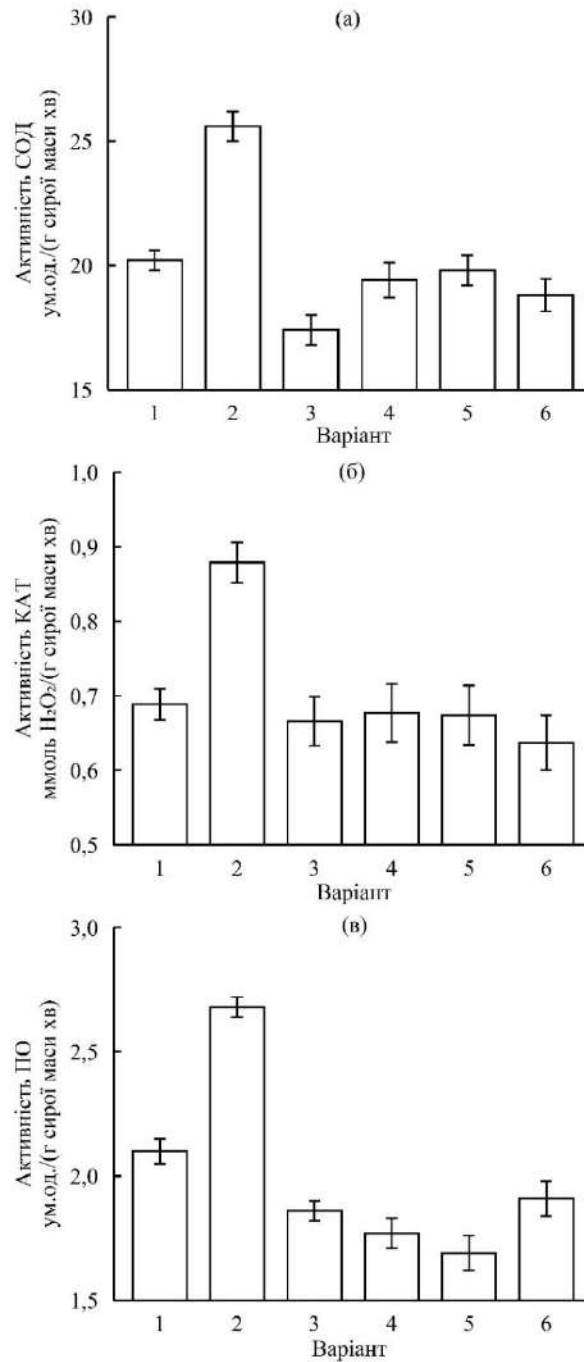


Рис. 3.7. Активність СОД (а), каталази (б) і гваяколпероксидази (в) у коренях проростків пшениці після обробки геміном і антагоністами кальцію. 1 - контроль; 2 - гемін (5 мкМ); 3 - ЕГТА (500 мкМ); 4 - гемін (5 мкМ) + ЕГТА (500 мкМ); 5 - неоміцин (200 мкМ); 6 - гемін (5 мкМ) + неоміцин (200 мкМ).

Таким чином, як хелатор кальцію ЕГТА, так і інгібітор надходження кальцію з внутрішньоклітинних компартментів неоміцин усували викликаний геміном ефект підвищення у коренях проростків пшениці активності всіх трьох вивчених антиоксидантних ферментів.

Антагоністи кальцію самі по собі не чинили істотного впливу на спричинюваний стресовим впливом вихід речовин, що поглинають в УФ-В. Однак обробка проростків як ЕГТА, так і неоміцином усувала мембрано-протекторну дію донора СО (рис. 3.8, а).

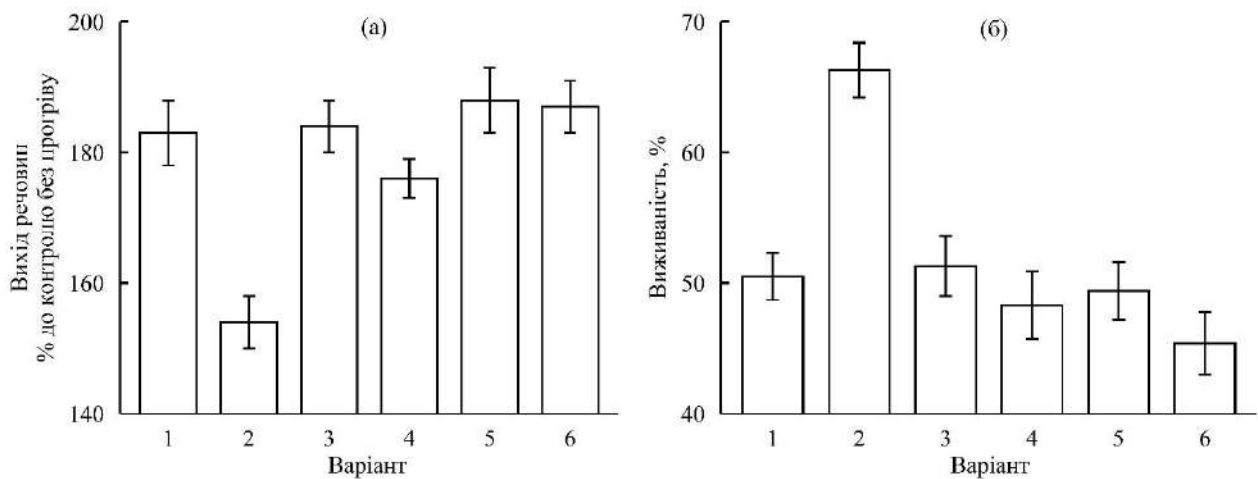


Рис. 3.8. Вихід речовин, що поглинають в ультрафіолетовій області спектра, з коренів проростків пшениці, % до контролю без прогріву (а) і виживаність проростків, % після пошкоджуючого прогріву (б). 1 - контроль; 2 - гемін (5 мкМ); 3 - ЕГТА (500 мкМ); 4 - гемін (5 мкМ) + ЕГТА (500 мкМ); 5 - неоміцин (200 мкМ); 6 - гемін (5 мкМ) + неоміцин (200 мкМ).

Виживаність проростків, оброблених ЕГТА і неоміцином, істотно не відрізнялася від такої у контролі (рис. 3.8, б). Проте хелатор позаклітинного кальцію (ЕГТА) і інгібітор синтезу інозитол-1,4,5-фосфату (неоміцин) повністю знімали позитивний вплив донора монооксиду вуглецю на теплостійкість проростків.

Отримані результати свідчать про те, що підвищення активності позаклітинної пероксидази, що відбувається під впливом донора СО, є кальцій-залежним процесом, оскільки усувається як хелатором кальцію ЕГТА, так і інгібітором виходу кальцію в цитозоль з внутрішньоклітинного простору неоміцином (рис. 3.6, а). Відомо, що пероксидази класу III містять два катіона кальцію на кожну молекулу ферменту (Gazaryan et al., 2006). При цьому кальцій необхідний для стабілізації структури ферменту і збереження його каталітичної активності за різних умов.

У ряді робіт показано підвищення активності пероксидази, в тому числі позаклітинних її форм, у рослин пшениці під дією екзогенного кальцію (Kolupaev et al., 2005; Chasov et al., 2010; Maksimov et al., 2010). Також встановлено, що в присутності підвищених концентрацій кальцію у середовищі посилювалася екскреція пероксидази із калусної тканини тютюну (Bakardjieva et al., 1987).

В умовах наших експериментів антагоністи кальцію ЕГТА і неоміцин повністю усували спричинюване обробкою донором СО підвищення активності позаклітинної пероксидази у коренях. При цьому ЕГТА повністю нівелював збільшення вмісту пероксиду водню у коренях, що відбувається у відповідь на дію донора СО, а неоміцин знімав цей ефект частково (рис. 3.6, б). Можливо, відмінності впливу двох антагоністів кальцію на індуковані донором СО ефекти збільшення вмісту пероксиду водню та активність позаклітинної пероксидази вказують на те, що активація цього ферменту не єдина причина збільшення вмісту пероксиду водню в клітинах коренів. Обробка коренів інгібітором НАДФН-оксидази імідазолом майже не зменшувала ефект підвищення вмісту  $H_2O_2$  в коренях при обробці геміном. Проте, внесок НАДФН-оксидази, принаймні, як міnorного учасника процесу утворення пероксиду водню, який активується дією донора СО, повністю виключити не можна. Крім того, як відомо, АФК можуть генеруватися в апопласті і за участю інших ферментів – ді- і поліаміноксидаз, оксалатоксидази (Sharova, Medvedev, 2017).

Судячи з отриманих результатів, кальцій задіяний як у формуванні АФК-сигналу, що з'являється в клітинах при обробці донором СО, так і в подальших сигнальних процесах, обумовлених дією АФК. Так, викликане обробкою геміном підвищення активності антиоксидантних ферментів – СОД, каталази, розчинної пероксидази – не проявлялося при обробці проростків ЕГТА і неоміцином (рис. 3.7).

Цілком природно, що опосередкована кальцієм і АФК активація антиоксидантної системи при дії донора СО не єдиний механізм його стрес-протекторної дії. Існують відомості про посилення донорами монооксиду вуглецю синтезу у рослин ряду поліфункціональних низькомолекулярних протекторних сполук. Так, у рослин пшениці при сольовому стресі показано посилення донором СО експресії гена  $\Delta^1$ -піролін-5-карбоксилат-синтази, що призводить до накопичення проліну (Yuan et al., 2009). При осмотичному стресі у проростків пшениці, оброблених донором монооксиду вуглецю гематином, збільшувався вміст цукрів (Liu et al., 2010).

Так чи інакше, в умовах наших експериментів вплив донора СО на інтегральний показник виживаність рослин після стресового впливу не виявлявся в присутності ЕГТА і неоміцину, що свідчить про роль різних пулів кальцію в процесі індукції теплостійкості проростків пшениці екзогенним монооксидом вуглецю.

### **3.4. Роль оксиду азоту та його взаємодії з іншими посередниками у реалізації стрес-протекторної дії донора СО**

Як вже зазначалося, NO, як сигнальна молекула, перебуває в тісній функціональній взаємодії з АФК та іонами кальцію. Зважаючи на отримані і описані нами вище дані про роль АФК і кальцію в реалізації стрес-протекторного впливу донора СО на проростки пшениці за умов гіпертермії, можна очікувати і залучення NO у сигнальні процеси, індуковані дією екзогенного СО. В літературі є поодинокі відомості про роль NO в індукуванні



стійкості рослин до осмотичного і сольового стресів дією екзогенного CO, а також в спричинюваних ним прорихових ефектах (Liu et al., 2010; Xie et al., 2008; Song et al., 2008). Однак роль NO у реалізації стрес-протекторної дії екзогенного монооксиду вуглецю за теплового стресу залишалася не дослідженою. Тому, нами було досліджено можливу участь оксиду азоту та генеруючих його ферментативних систем у регуляції утворення АФК та індукуванні теплостійкості проростків пшениці дією донора CO геміну. Також була вивчена залежність впливу донора монооксиду вуглецю на генерацію NO клітинами коренів від їх кальцієвого статусу.

Вміст оксиду азоту в коренях контрольного варіанта протягом 24 год спостережень істотно не змінювався (рис. 3.9, а). Внесення в середовище інкубації проростків пшениці геміну вже через 0,5 год викликало значне підвищення в них вмісту оксиду азоту. Через 1 год після початку обробки донором CO спостерігалось максимальне збільшення кількості NO в коренях проростків дослідного варіанта. Підвищений рівень оксиду азоту в коренях зберігався і через 2 год після початку впливу геміну, проте вже через 4 год його вміст у варіанті з донором NO не відрізнявся від контролю. Не було суттєвих відмінностей між варіантами і через 24 години після початку впливу геміну (рис. 3.9, а).

Активність нітратредуктази (НР) у коренях контрольного варіанта за 24 год спостережень істотно не змінювалася (рис. 3.9, б). При обробці геміном її динаміка багато в чому була схожою на динаміку вмісту NO: підвищення починалося через 0,5 год після початку експозиції, максимум спостерігався через 1 год дії донора CO, після чого активність НР у коренях проростків дослідного варіанту не відрізнялася від контролю (рис. 3.9, б).

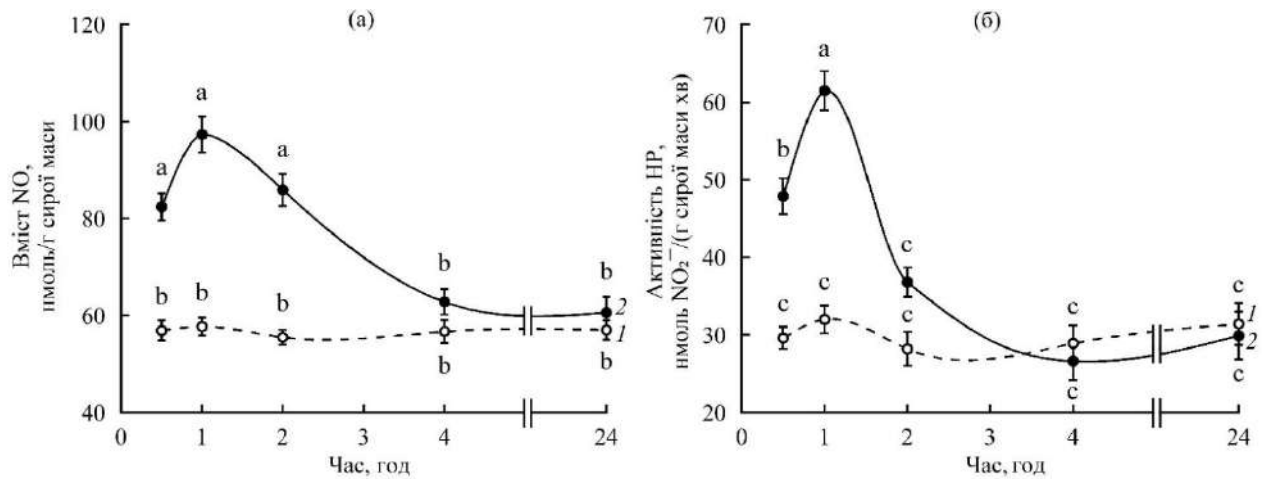


Рис. 3.9. Динаміка вмісту оксиду азоту (а) і активності нітратредуктази (б) в коренях проростків пшениці при дії геміну. 1 - контроль; 2 - гемін (5 мкМ).

У наступних експериментах з'ясували, які ферментативні системи причетні до спричинюваного екзогенним СО збільшення вмісту NO у коренях. Самі по собі інгібітори синтезу NO вольфрамат натрію і аміногуанідин вірогідно не впливали на його кількість в коренях, хоча і викликали тенденцію до зменшення його вмісту (рис. 3.10, а). За впливу геміну у комбінації з інгібітором НР вольфраматом натрію вплив донора СО на вміст NO не проявлявся. Інгібітор НР спричиняв зниження активності ферменту в коренях і усував викликаний донором СО ефект збільшення активності НР (рис. 3.10, б). У той же час обробка проростків інгібітором NO-синтази і діаміноксидази аміногуанідином практично не перешкождала збільшенню вмісту NO, що відбувалося під впливом геміну (рис. 3.10, а). Таким чином, дані інгібіторного аналізу і прямого визначення активності НР вказують на значний внесок саме цього ферменту в ефект посилення генерації оксиду азоту клітинами коренів при дії донора СО.

Обробка проростків антиоксидантом ДМТС не впливала на вміст у них NO і не знімала ефект збільшення вмісту оксиду азоту при інкубації в середовищі з геміном (рис. 3.10, а). Не чинив скавенджер пероксиду водню

вплив і на активність НР в коренях проростків як за відсутності, так і в присутності донора монооксиду вуглецю (рис. 3.10, б).

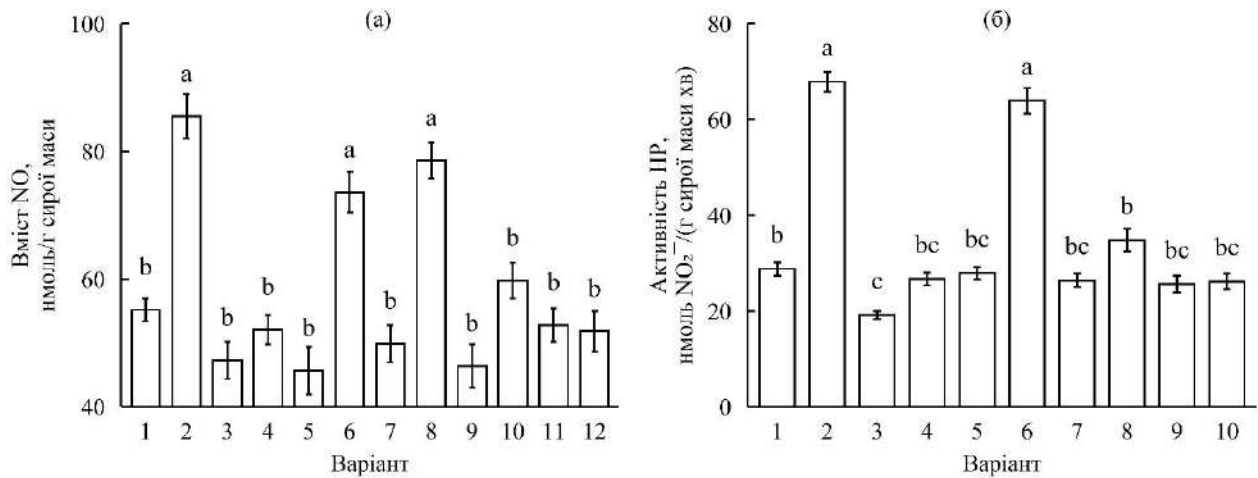


Рис. 3.10. Вміст NO (а) і активність НР (б) в коренях проростків пшениці при обробці геміном та антагоністами оксиду азоту, АФК і кальцію. (а): 1 - контроль; 2 - гемін (5 мкМ); 3 - вольфрамат натрію (2 мМ); 4 - гемін (5 мкМ) + вольфрамат натрію (2 мМ); 5 - аміногуанідин (1 мМ); 6 - гемін (5 мкМ) + аміногуанідин (1 мМ); 7 - ДМТС (0,15 мМ); 8 - гемін (5 мкМ) + ДМТС (0,15 мМ); 9 - ЕГТА (0,5 мМ); 10 - гемін (5 мкМ) + ЕГТА (0,5 мМ); 11 - неоміцин (0,2 мМ); 12 - гемін (5 мкМ) + неоміцин (0,2 мМ). (б): 1 - контроль; 2 - гемін (5 мкМ); 3 - вольфрамат натрію (2 мМ); 4 - гемін (5 мкМ) + вольфрамат натрію (2 мМ); 5 - ДМТС (0,15 мМ); 6 - гемін (5 мкМ) + ДМТС (0,15 мМ); 7 - ЕГТА (0,5 мМ); 8 - гемін (5 мкМ) + ЕГТА (0,5 мМ); 9 - неоміцин (0,2 мМ); 10 - гемін (5 мкМ) + неоміцин (0,2 мМ).

Антагоністи кальцію ЕГТА і неоміцин вірогідно не впливали на вміст NO і активність НР у коренях. При цьому вони повністю усували ефекти підвищення кількості NO і активності НР у відповідь на внесення в середовище інкубації проростків донора СО геміну (рис. 3.10).

Як вже було зазначено, додавання 5 мкМ геміну в середовище інкубації коренів проростків викликало в них збільшення вмісту пероксиду водню та

активності позаклітинної ПО з максимумами через 2 і 1,5 год, відповідно. У зв'язку з цим, саме в таких часових точках оцінювали вплив скавенджера NO РТЮ та інгібіторів ферментів синтезу оксиду азоту на кількість  $H_2O_2$  і активність позаклітинної ПО в коренях. Встановлено, що обробка РТЮ сама по собі майже не впливала на вміст пероксиду водню та активність ферменту (рис. 3.11). При цьому під впливом скавенджера оксиду азоту повністю усувалося спричинюване обробкою геміном підвищення активності позаклітинної ПО і значно нівелювалося збільшення вмісту пероксиду водню у коренях.

При обробці інгібітором НР вольфрамом натрію вміст пероксиду водню та активність позаклітинної ПО у коренях не змінювалися (рис. 3.11). У той же час цей інгібітор повністю усував ефекти підвищення вмісту  $H_2O_2$  і активності позаклітинної ПО, викликані дією донора CO.

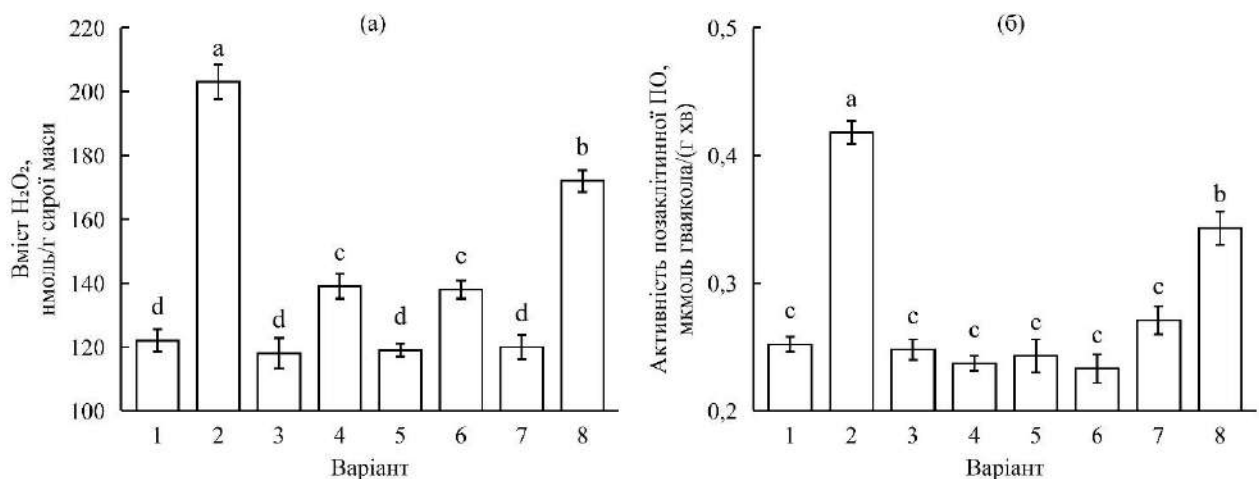


Рис. 3.11. Вміст пероксиду водню (а) і активність позаклітинної ПО (б) у коренях проростків пшениці при обробці геміном і антагоністами оксиду азоту. 1 - контроль; 2 - гемін (5 мкМ); 3 - РТЮ (0,1 мМ); 4 - гемін (5 мкМ) + РТЮ (0,1 мМ); 5 - вольфраMAT натрію (2 мМ); 6 - гемін (5 мкМ) + вольфраMAT натрію (2 мМ); 7 - аміногуанідин (1 мМ); 8 - гемін (5 мкМ) + аміногуанідин (1 мМ).

Обробка коренів проростків аміногуанідином, що інгібує NO-синтазу і діаміноксидазу, істотно не впливала на вміст в них пероксиду водню та

активність позаклітинної ПО. При цьому аміногуанідин лише трохи зменшував прояв ефектів підвищення вмісту  $H_2O_2$  і активності позаклітинної ПО в коренях, які відбувалися при обробці геміном (рис. 3.11).

При обробці проростків скавенджером NO РТЮ інтенсивність процесів ПОЛ, індукованих тепловим стресом, змінювалася несуттєво. При цьому РТЮ повністю усував прояв антиоксидантної дії геміну (рис. 3.12, а). Інгібітор НР вольфрамат натрію сам по собі не впливав на викликане тепловим стресом накопичення продуктів ПОЛ у коренях проростків, однак, як і РТЮ, знімав ефект пом'якшення окислювального стресу, викликаний обробкою донором СО.

При обробці проростків аміногуанідином, вміст МДА в коренях проростків, які зазнали впливу гіпертермії, не відрізнявся від контролю. При цьому даний інгібітор лише трохи послаблював прояв антиоксидантної дії обробки проростків геміном (рис. 3.12, а).

Обробка проростків скавенджером пероксиду водню ДМТС дещо зменшувала прояв впливу гіпертермії на вміст МДА, але при цьому вона частково нівелювала антиоксидантну дію донора СО (рис. 3.12, а).

Антагоністи кальцію ЕГТА і неоміцин самі по собі слабо впливали на вміст МДА у коренях проростків пшениці після дії гіпертермії. У той же час, ЕГТА усував, а неоміцин помітно зменшував прояв ефекту пом'якшення процесів ПОЛ, викликаний дією геміну (рис. 3.12, а).

Обробка проростків донором СО значно підвищувала їх виживаність після ушкоджуючого прогріву (рис. 3.12, б). Різні антагоністи NO (РТЮ, вольфрамат натрію, аміногуанідин) не чинили достовірного впливу на теплостійкість проростків. Однак скавенджер NO і інгібітор НР повністю усували захисну дію донора СО на проростки при гіпертермії. У той же час аміногуанідин лише частково зменшував позитивний вплив обробки геміном на виживаність проростків після ушкоджуючого прогріву.

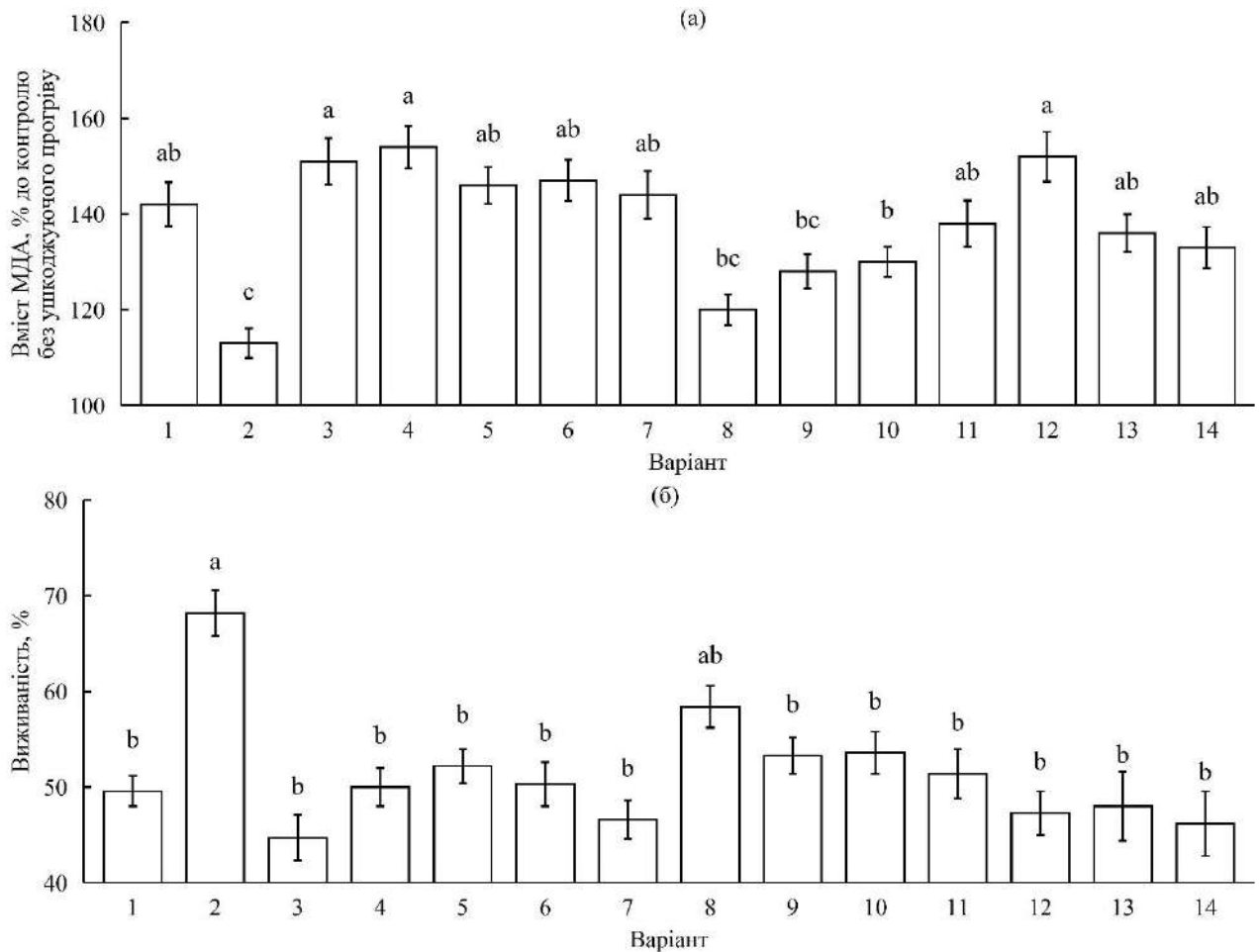


Рис. 3.12. Вміст МДА у коренях (а) і виживаність проростків пшениці (б) після ушкоджуючого прогріву. 1 - контроль; 2 - гемін (5 мкМ); 3 - РТЮ (0,1 мМ); 4 - гемін (5 мкМ) + РТЮ (0,1 мМ); 5 - вольфрамат натрію (2 мМ); 6 - гемін (5 мкМ) + вольфрамат натрію (2 мМ); 7 - аміногуанідин (1 мМ); 8 - гемін (5 мкМ) + аміногуанідин (1 мМ); 9 - ДМТС (0,15 мМ); 10 - гемін (5 мкМ) + ДМТС (0,15 мМ); 11 - ЕГТА (0,5 мМ); 12 - гемін (5 мкМ) + ЕГТА (0,5 мМ); 13 - неоміцин (0,2 мМ); 14 - гемін (5 мкМ) + неоміцин (0,2 мМ).

Антиоксидант ДМТС, як і в інших серіях експериментів (див. рис. 3.5) істотно не впливав на виживаність проростків після теплового стресу, але усував позитивний вплив донора СО на їх теплостійкість. Антагоністи кальцію ЕГТА і неоміцин самі по собі також не впливали на відносну величину виживаності проростків, але при цьому повністю нівелювали підвищення теплостійкості проростків, спричинюване обробкою геміном (рис. 3.12, б).

Отримані результати свідчать про роль оксиду азоту у реалізації стрес-протекторної дії екзогенного CO на проростки пшениці при гіпертермії. На це, зокрема, вказує транзиторне підвищення вмісту NO у коренях проростків пшениці протягом перших двох годин їх інкубації на середовищі з донором CO геміном (рис. 3.9, а). Такі результати узгоджуються з даними Liu і співавт. (Liu et al., 2010), які показали збільшення вмісту NO в насінні пшениці, проростання яких в умовах осмотичного стресу стимулювалося дією гематину. Також зареєстровано підвищення вмісту NO в коренях проростків пшениці за дії водного розчину газоподібного CO, яка індукувала розвиток їх стійкості до сольового стресу (Xie et al., 2008). Але слід зазначити, що у вказаних роботах підвищення вмісту NO в клітинах зареєстровано при тривалому впливі екзогенного CO (12-24 год). На нашій моделі показано досить швидке і транзиторне підвищення вмісту NO, що характерно для його сигнальних ефектів (Yao et al., 2019).

До завдань нашої роботи також входило з'ясування можливих ферментативних шляхів синтезу NO в клітинах коренів під впливом донора монооксиду вуглецю. Як відомо, NO у рослин може утворюватися за відновним або окиснювальним шляхами (Kolupaev et al., 2019d; Gupta et al., 2020).

У наших експериментах показано відсутність помітного впливу аміногуанідину, що інгібує як NO-синтазу, так і діаміноксидазу, на спричинюване донором CO збільшення вмісту оксиду азоту у коренях проростків пшениці (рис. 3.10, а). Це вказує на те, що окислювальний шлях практично не залучається до стимульованого екзогенним CO синтезу оксиду азоту в коренях проростків. У той же час при обробці проростків геміном відзначалося транзиторне підвищення активності НР, яке за часом збігалось з ефектом збільшення вмісту NO (рис. 3.10). Слід зауважити, що активність НР у коренях в умовах наших експериментів була досить низькою, що пов'язано з інкубування проростків за відсутності екзогенних нітратів. Проте ці результати узгоджуються з отриманими раніше даними про наявність активності НР в органах проростків пшениці при їх вирощуванні протягом декількох днів на без

нітратному середовищі (Галеева и др., 2012). Наші експерименти показали, що гальмування активності НР вольфраматом натрію усувало ефект підвищення вмісту оксиду азоту у коренях, викликаний донором СО (рис. 3.10). Таким чином, ймовірно, НР є основним ферментом, що забезпечує генерацію оксиду азоту в клітинах коренів при дії донора СО. Схожі результати отримані Bai і співавт. при стимулюванні розчинами СО або геміну проростання насіння *Baccaurea ramiflora* при низьких температурах. Під впливом екзогенного СО підвищувався вміст NO в зародках. Такий ефект усувався інгібітором НР вольфраматом натрію, але не інгібітором NO-синтази L-NAME (Bai et al., 2012). З іншого боку, в роботі Xie і співавт. (2008) показано усунення інгібітором NO-синтази L-NAME підвищення вмісту NO, спричинюваного екзогенним СО у коренях проростків пшениці, що піддавалися сольовому стресу. Не виключено, що в залежності від природи стресорів та інших експериментальних умов у відповідь на дію СО можуть активуватися різні шляхи синтезу NO.

Ефекти збільшення активності НР і вмісту NO в коренях проростків, оброблених донором СО, які спостерігалися в наших експериментах, виявилися залежними від кальцієвого гомеостазу. Вони пригнічувалися як хелатором позаклітинного кальцію ЕГТА, так і неоміцином – інгібітором утворення інозитол-1,4,5-фосфату, здатного відкривати внутрішньоклітинні кальцієві канали (рис. 3.10). Ефект активації рослинної НР іонами кальцію та інгібування в присутності хелатора кальцію в умовах *in vitro* показаний досить давно (Sane et al., 1987). Також виявлено підвищення активності НР в інтактних рослинах під впливом екзогенного кальцію (Gao et al., 2011). Ймовірно, регуляція активності НР монооксидом вуглецю опосередкована кальцієм.

Ще одним посередником в сигнальних ланцюгах, індукованих монооксидом вуглецю, є пероксид водню. Можливий зв'язок між NO і АФК як учасниками сигнальних процесів, ініційованих СО, на рослинних об'єктах поки що досліджений недостатньо. З результатів наших експериментів випливає, що в сигнальній мережі, яка стимулюється монооксидом вуглецю, NO знаходиться вище пероксиду водню. На це вказують більш швидке утворення NO у коренях



пшениці при обробці геміном (максимальний ефект через 1 год) (рис. 3.9, а) у порівнянні з динамікою зміни вмісту  $H_2O_2$  (максимум через 2 год), а також результати інгібіторного аналізу. Так, попередня обробка проростків пшениці скавенджером NO РТЮ і інгібітором НР вольфрамом натрію усувала викликані геміном ефекти підвищення у коренях проростків активності позаклітинної ПО і вмісту пероксиду водню (рис. 3.11). З іншого боку, антиоксидант ДМТС не впливав на викликане донором СО збільшення активності НР і вміст оксиду азоту у коренях (рис. 3.10). Можна вважати, що стимульоване донором СО підвищення вмісту NO викликає подальшу активацію позаклітинної ПО, яка генерує утворення АФК (Kreslavski et al., 2012), в тому числі в коренях (Minibayeva et al., 2001). У літературі є дані про підвищення активності різних пероксидаз під впливом донорів NO (Mamaeva et al., 2015). Не виключено, що такі ефекти можуть бути зумовлені взаємодією NO з гемом, що входять до складу активних центрів цих ферментів. Звичайно, для певних висновків про механізми викликаної донором СО і опосередкованої NO активації позаклітинної ПО необхідні спеціальні дослідження.

Оцінка впливу модуляторів сигнальних процесів на інтегральні фізіологічні показники, що характеризують стійкість – інтенсивність ПОЛ і виживаність проростків після ушкоджуючого прогріву – також свідчить про залучення NO, АФК та іонів кальцію у реалізацію стрес-протекторних ефектів донора СО. Так, обробка РТЮ усувала як пом'якшення ефекту окислювального стресу, викликане донором СО, так і підвищення виживаності проростків, що відбувається під його впливом (рис. 3.12). Таким же чином знімала стрес-протекторні ефекти екзогенного СО і обробка проростків інгібітором НР вольфрамом натрію. У той же час, аміногуанідин не впливав на вміст NO при дії на проростки геміну і лише незначною мірою зменшував ефекти пом'якшення донором СО окисного стресу (рис. 3.12, а) і підвищення виживаності проростків після ушкоджуючого прогріву (рис. 3.12, б).

В цілому усунення антагоністами NO підвищення вмісту в коренях  $H_2O_2$ , спричинюваного екзогенним СО, а також більш динамічна зміна вмісту оксиду

азоту у порівнянні з пероксидом водню, вказує на те, що NO в сигнальному шляху розташований вище, ніж H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. В свою чергу інгібування викликаного донором CO накопичення NO в клітинах коренів кальцієвими антагоністами ЕГТА і неоміцином дозволяє припускати, що запуск сигнального шляху, пов'язаного з активацією НР, збільшенням вмісту NO і подальшим накопиченням пероксиду водню, включає в себе зміну кальцієвого гомеостазу. При цьому, ймовірно, надходження кальцію в цитозоль з позаклітинного простору і внутрішніх компартментів стимулює утворення NO і АФК. Безумовно, це припущення вимагає вивчення спричинюваних CO змін кальцієвого гомеостазу прямими методами з визначенням його концентрації в цитоплазмі в реальному часі. Проте, отримані дані дозволяють зробити досить однозначний висновок про залучення NO, що утворюється під дією НР, в формування АФК-сигналу і реалізацію стрес-протекторної дії донора CO геміну на проростки пшениці при гіпертермії.

### **Висновки до розділу 3**

Обробка проростків пшениці донором монооксиду вуглецю геміном індукувала розвиток їх теплостійкості, що проявлялося у підвищенні виживаності проростків через три доби після теплового стресу та зменшенні спричинюваних прогрівом окиснювальних пошкоджень та збереженні цілісності мембран, про що свідчило зменшення виходу речовин, поглинаючих в ультрафіолетовій частині спектра, порівняно з контрольним варіантом.

Стрес-протекторна дія геміну як донора монооксиду вуглецю була специфічною. Вона усувалася скавенджером CO гемоглобіном. Крім того, інший редокс-активний продукт розкладання геміну – іони заліза (II) – в еквівалентних концентраціях не впливали на теплостійкість проростків пшениці.

Однією з причин стрес-протекторної дії донора CO на проростки пшениці, ймовірно, є активація ферментативної антиоксидантної системи.

Встановлено, що донор CO підвищував активність супероксиддисмутази, каталази та гваяколпероксидази у коренях проростків пшениці за звичайних умов і після ушкоджувального прогріву.

Ймовірними посередниками у реалізації стрес-протекторного впливу донора CO на проростки пшениці є іони кальцію, АФК і NO. Ефекти індукування обробкою геміном теплостійкості проростків та підвищення в них активності антиоксидантних ферментів усувалися антагоністами кальцію (ЕГТА і неоміцином) та скавенджером пероксиду водню ДМТС. Також спричинюване донором CO підвищення виживаності проростків після теплового стресу усувалося скавенджером NO РТЮ.

Посилення утворення пероксиду водню в коренях проростків пшениці за дії геміну мало транзиторний характер. Його максимум спостерігався після попереднього підвищення активності позаклітинної пероксидази. Зростання вмісту  $H_2O_2$ , спричинюване донором CO, усувалося інгібітором пероксидази азидом натрію, але не інгібітором НАДФН-оксидази імідазолом. Підвищення активності пероксидази і вмісту пероксиду водню, індуковане дією геміну, не проявлялося у присутності антагоністів кальцію (ЕГТА і неоміцину) і NO (РТЮ і вольфрамату натрію). Це вказує на роль кальцію і оксиду азоту в посиленні утворення пероксиду водню пероксидазою за дії на клітини коренів донора CO.

Вміст NO за обробки коренів проростків геміном також транзиторно зростав. Цей ефект усувався інгібітором нітратредуктази вольфраматом натрію, але не інгібітором NO-синтази і діаміноксидази аміногуанідином. Це свідчить про роль нітратредуктази як основного ферментативного джерела NO, яке активується за дії геміну на клітини коренів проростків пшениці. Водночас процес утворення NO, активований донором CO, виявився залежним від кальцієвого гомеостазу, оскільки усувався дією антагоністів кальцію ЕГТА і неоміцину. З іншого боку, індуковане донором монооксиду вуглецю підвищення активності нітратредуктази і зростання вмісту NO в коренях не усувалося антиоксидантом ДМТС. Це свідчить про те, що у сигнальному

ланцюгу, активованому монооксидом вуглецю, NO розташований вище від пероксиду водню.

В цілому ймовірний розвиток сигнальних подій у клітинах проростків пшениці у присутності донора CO геміну можна представити так: вплив CO → підвищення  $[Ca^{2+}]_{цит}$  → активація НР → підвищення вмісту NO → активація позаклітинної пероксидази → підвищення вмісту  $H_2O_2$  → активація антиоксидантної та інших протекторних систем → розвиток теплостійкості.

## РОЗДІЛ 4. УЧАСТЬ ГАЗОТРАНСМІТЕРІВ У РЕАЛІЗАЦІЇ СТРЕС-ПРОТЕКТОРНОЇ ДІЇ НА РОСЛИНИ САЛІЦИЛОВОЇ КИСЛОТИ І 24-ЕБЛ ЗА УМОВ ГІПЕРТЕРМІЇ

Як відомо, фітогормони беруть участь в усіх процесах життєдіяльності, починаючи від проростання насіння і формування стійкості до стресорів різної природи, і закінчуючи регулюванням продуктивності рослин. Це робить вельми актуальним вивчення механізмів дії гормонів і пошук екологічно безпечних способів підвищення стійкості важливих сільськогосподарських культур до несприятливих чинників навколишнього середовища (Кравець та ін., 2017; Ефимова и др., 2019).

Одним з ключових фітогормонів, задіяних у формуванні стійкості рослин до біотичних і абіотичних стресорів, є саліцилова кислота (Shakirova et al., 2013). Вважається, що СК поєднує в собі властивості стресового фітогормону і сигнального посередника (Wang, Li, 2006). Дані, що накопичуються про індукуванні стійкості рослин до стрес-факторів різної природи екзогенної СК не тільки створюють передумови для її практичного використання, а й розширюють уявлення про спектр регульованих нею фізіологічних реакцій (Saleem, 2020). Роль сигнальних посередників у реалізації фізіологічних ефектів СК досліджується вже понад два десятиліття (Vlot et al., 2009). Зокрема, встановлено роль зокрема, АФК, оксиду азоту та іонів кальцію у реалізації її стрес-протекторних ефектів. Однак участь нового посередника-газотрансмітера  $H_2S$  у фізіологічній дії СК досліджувалася лише у поодиноких роботах, виконаних на проростках кукурудзи (Li et al., 2015b).

Ще одним класом фітогормонів, що активно досліджується в контексті адаптації рослин до дії несприятливих чинників є брасиностероїди. Як вже зазначалося, вони відіграють важливу роль в адаптації рослин до дії екстремальних температур, зневоднення, засолення. Фоліарна обробка сіянців *Pinus sylvestris* 24-ЕБЛ викликала підвищення їх стійкості до інфекційного

влягання та посухи (Шкляревський та ін., 2019). Ефекти брасиностероїдів також реалізуються з участю основних сигнальних посередників, у тому числі кальцію, активних форм кисню та азоту (Kolupaev et al., 2014; Karpets et al., 2018). Оксид азоту (NO) здатний індукувати різноманітні адаптивні реакції рослин. Показано, що при комплексному застосуванні 24-ЕБЛ і донора оксиду азоту нітропрусиду натрію (НПН) їх позитивний вплив на посухостійкість томатів підвищувався (Jangid, Dwivedi, 2017). Також 24-ЕБЛ і НПН при одночасному застосуванні більш помітно, ніж окремо підвищували стійкість *Brassica juncea* до засолення (Gupta et al., 2017). Водночас комбінована дія БС і донорів NO на теплостійкість рослинних об'єктів на момент виконання роботи залишалася практично не вивченою.

Тому частина нашої роботи передбачала дослідження участі газотрансмітерів у реалізації стрес-протекторних ефектів на рослини саліцилової кислоти та брасиностероїдів та можливості посилення захисної дії цих фітогормонів за обробки рослинних об'єктів ними у поєднанні з донорами NO і H<sub>2</sub>S. Як модельний об'єкт використовували проростки пшениці, зокрема, їх інтактні корені. Як уже зазначалося, корені пшениці є зручною моделлю для досліджень ефектів, що супроводжуються швидкими змінами редокс-гомеостазу. Вибір проростків пшениці як модельного об'єкта був зумовлений також тим, що стрес-протекторна дія вказаних фітогормонів, зокрема, брасиностероїдів, на однодольних досліджена значно меншою мірою, ніж на дводольних (Karpets, Kolupaev, 2018).

#### **4.1. Участь сірководню в індукуванні теплостійкості проростків пшениці екзогенною саліциловою кислотою**

Інкубація проростків протягом доби на середовищі з додаванням СК викликала підвищення їх стійкості до ушкоджуючого прогріву (рис. 4.1, а). Найбільш помітний ефект проявлявся при використанні СК у концентраціях 1 і 10 мкМ. Обробка проростків розчинами донора сірководню NaHS також

сприяла підвищенню їх теплостійкості (рис. 4.1, б). Найбільша захисна дія проявлялась при використанні розчинів 0,1 і 0,25 мМ NaHS.

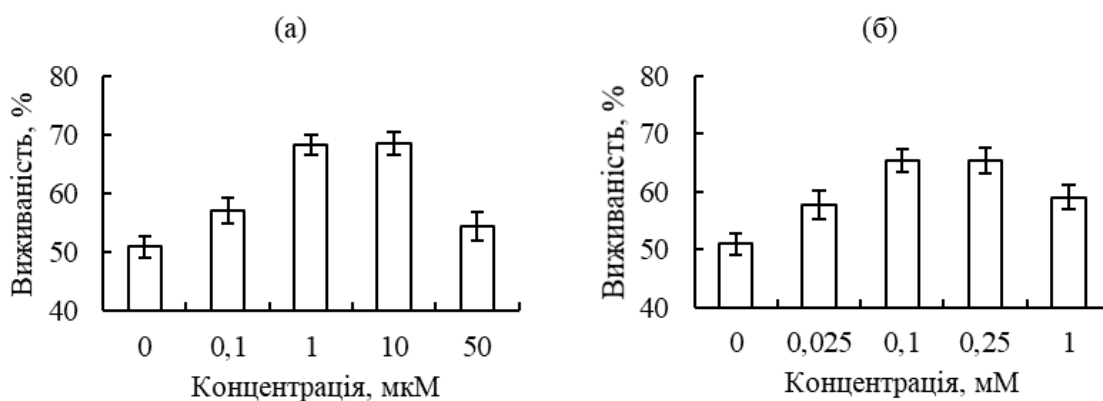


Рис. 4.1. Концентраційна залежність впливу СК (а) і NaHS (б) на теплостійкість проростків пшениці.

При інкубації коренів проростків пшениці в розчині з додаванням СК у концентрації 10 мкМ в них відбувалося транзиторне підвищення вмісту сірководню (рис. 4.2). Тенденція до такого ефекту проявлялася вже через 1 годину інкубації, через 2-3 години відзначалося максимальне (приблизно на 45%) підвищення вмісту  $H_2S$  в коренях, після чого воно зменшувалося. До 24 години спостережень вміст сірководню у коренях проростків, оброблених СК, знижувався до рівня контролю (рис. 4.2).

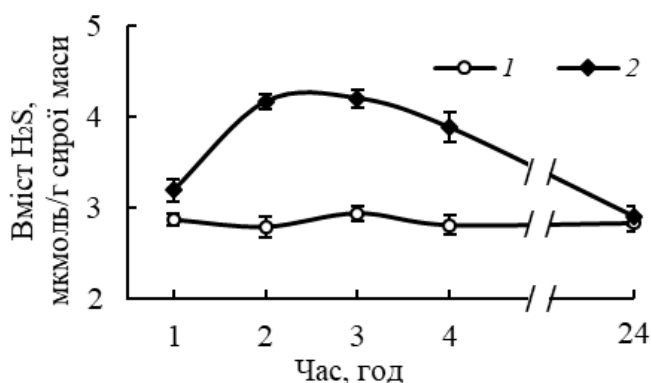


Рис. 4.2. Динаміка вмісту сірководню у коренях проростків пшениці при обробці СК. 1 - контроль; 2 - СК (10 мкМ).

Таким чином, тимчасове підвищення вмісту сірководню у коренях проростків пшениці вказує на його можливу участь у реалізації дії СК.

Обробка проростків 0,3 мМ гідроксиламіном, який є інгібітором ключового ферменту синтезу сірководню L-цистеїндесульфгідрази, знижувала їх виживаність після ушкоджуючого прогріву (рис. 4.3). При цьому інший інгібітор цього ферменту – піруват калію – в такій же концентрації майже не впливав на виживаність проростків після теплового стресу. У той же час обидва інгібітори практично повністю усували позитивну дію СК на теплостійкість проростків. При комбінованій дії 100 мкМ NaHS і 10 мкМ СК виживаність проростків після стресу виявилась помітно вищою, ніж при обробці проростків цими сполуками окремо.

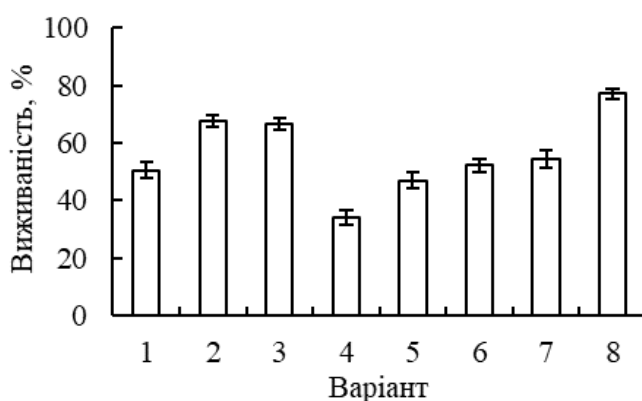


Рис. 4.3. Теплостійкість проростків пшениці при дії СК, NaHS, антагоністів сірководню та комбінацій зазначених сполук. 1 - контроль; 2 - СК (10 мкМ); 3 - NaHS (0,1 мМ); 4 - гідроксиламін (0,3 мМ); 5 - піруват калію (0,3 мМ); 6 - СК (10 мкМ) + гідроксиламін (0,3 мМ); 7 - СК (10 мкМ) + піруват калію (0,3 мМ); 8 - СК (10 мкМ) + NaHS (0,1 мМ).

Однією з протекторних систем, задіяних у саліцилат-індукованому підвищенні теплостійкості проростків, може бути антиоксидантна система. Під впливом СК у коренях проростків за відсутності стресового впливу підвищувалася активність одного з найважливіших антиоксидантних ферментів



– СОД (рис. 4.4, а). Під дією обох інгібіторів синтезу сірководню відзначалося невелике зниження активності ферменту. При комбінованій обробці цими інгібіторами з СК вплив останньої на активність СОД майже не проявлявся. У той же час при поєднанні обробки СК з дією донора  $H_2S$  активність СОД була трохи вищою, ніж у варіантах тільки з СК або  $NaHS$ .

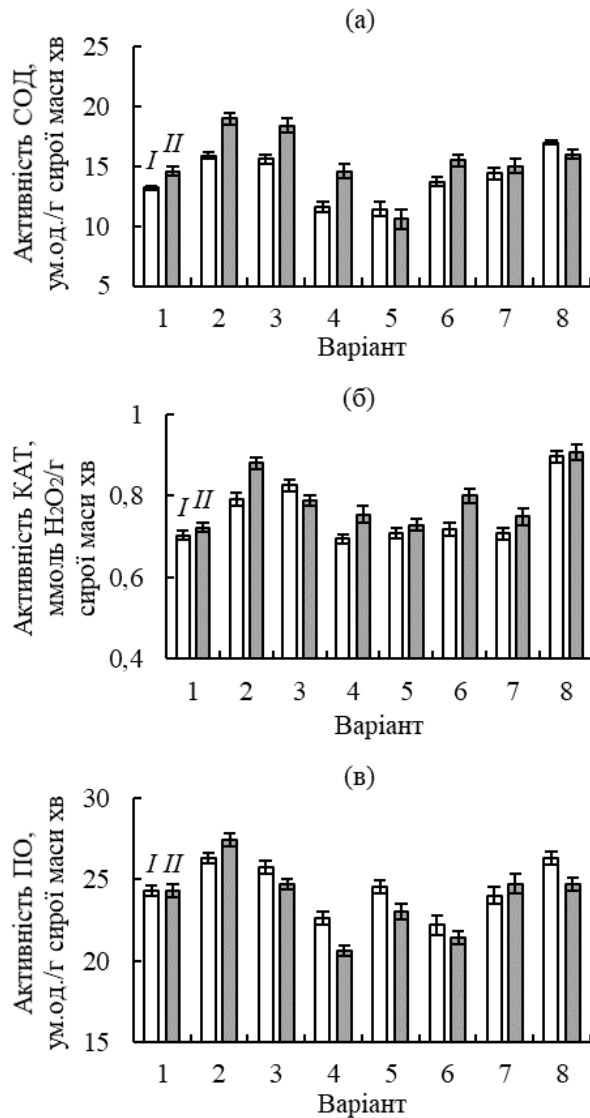


Рис. 4.4. Активність СОД (а), каталази (б) і гваяколпероксидази (в) у коренях проростків пшениці при дії СК,  $NaHS$ , антагоністів сірководню і комбінацій зазначених сполук. I - до стресового впливу; II - після прогріву. 1 - контроль; 2 - СК (10  $\mu$ М); 3 -  $NaHS$  (0,1 мМ); 4 - гідроксиламін (0,3 мМ); 5 - піруват калію (0,3 мМ); 6 - СК (10  $\mu$ М) + гідроксиламін (0,3 мМ); 7 - СК (10  $\mu$ М) + піруват калію (0,3 мМ); 8 - СК (10  $\mu$ М) +  $NaHS$  (0,1 мМ).

Через 2 години після ушкоджуючого прогріву активність СОД у контрольному варіанті збільшувалася, але незначною мірою. Більш істотно її активність підвищувалася у відповідь на дію високої температури після обробки СК і донором  $\text{H}_2\text{S}$  (рис. 4.4, а). У коренях проростків, оброблених піруватом калію, активність СОД після прогріву не змінювалася, а після впливу гідроксиламіну – дещо збільшувалася. При комбінованій обробці проростків СК та інгібіторами синтезу  $\text{H}_2\text{S}$  після теплового стресу активність СОД збільшувалася, проте цей ефект був достовірним тільки при  $P \leq 0,1$ . При цьому абсолютні значення активності ферменту були нижчими, ніж за впливу тільки СК, що дозволяє зробити припущення про участь  $\text{H}_2\text{S}$  у реалізації впливу СК на активність СОД. Показово, що в коренях проростків, оброблених комбінацією СК і донора  $\text{H}_2\text{S}$ , активність СОД після теплового стресу не підвищувалася. Можна припустити, що підвищена активність цього та інших антиоксидантних ферментів після обробки комбінацією СК і  $\text{NaHS}$  була достатньою для антиоксидантного захисту в стресових умовах.

Під впливом СК і донора  $\text{H}_2\text{S}$  активність каталази у коренях збільшувалася (рис. 4.4, б). Обробка інгібіторами синтезу  $\text{H}_2\text{S}$  сама по собі істотно не впливала на активність ферменту. При цьому обидва інгібітори повністю усували викликаний СК ефект підвищення активності каталази, що свідчить на користь припущення про роль  $\text{H}_2\text{S}$  у саліцилат-індукованій зміні активності ферменту. При комбінованій обробці проростків СК і донором сірководню активність ферменту вірогідно перевищувала аналогічні показники, що спостерігалися після обробки тільки СК або тільки  $\text{NaHS}$  (рис. 4.4, б).

Після прогріву активність каталази у контролі істотно не змінювалася, а у варіанті з СК вона підвищувалася. В той же час у коренях проростків, оброблених донором сірководню, активність каталази незначною мірою знижувалася (рис. 4.4, б). За впливу гідроксиламіну або пірувату калію активність ферменту у коренях після прогріву трохи збільшувалася, однак цей ефект не був достовірним при  $P \leq 0,05$ . При комбінованій обробці проростків

інгібіторами L-цистеїндесульфгідрази і СК активність ферменту в коренях у відповідь на гіпертермію дещо збільшувалася, проте абсолютні її значення були помітно нижчими, ніж при обробці тільки СК, що вказує на участь  $H_2S$  у реалізації ефектів СК (рис. 4.4, б). У варіанті з комбінацією СК і донора сірководню активність каталази після теплового стресу суттєво не змінювалася, при цьому її абсолютні величини помітно перевищували відповідні значення у контролі та після впливу тільки  $NaHS$ .

Обробка СК викликала деяке підвищення активності гваяколпероксидази у коренях (рис. 4.4, в). При їх обробці донором  $H_2S$  відзначалася тільки тенденція до невеликого підвищення активності ферменту. За впливу на корені гідроксиламіну активність гваяколпероксидази трохи знижувалася, а при обробці піруватом калію не змінювалася. При комбінованій обробці проростків СК і інгібіторами синтезу  $H_2S$  активність ферменту практично не відрізнялася від величин контролю.

Таким чином, ці інгібітори усували спричинюване СК підвищення активності гваяколпероксидази. При комбінованій дії СК і донора  $H_2S$  активність гваяколпероксидази у коренях не відрізнялася від величин у варіанті з впливом тільки СК (рис. 4.4, в). Після теплового стресу активність гваяколпероксидази в усіх варіантах дослідів змінювалася в незначній мірі. Помітним було лише її зниження після обробки проростків гідроксиламіном (рис. 4.4, в).

Через 1 добу після впливу теплового стресу у коренях контрольних і оброблених інгібіторами синтезу  $H_2S$  проростків спостерігалось підвищення вмісту продукту ПОЛ МДА (рис. 4.5). Обробка проростків СК і  $NaHS$ , а також їх комбінацією практично повністю усувала цей ефект. Таким чином, СК і донор  $H_2S$  пом'якшували прояв окислювального стресу, викликаного гіпертермією. Інгібітори синтезу  $H_2S$  зменшували захисний ефект СК, але не усували його повністю (рис. 4.5).

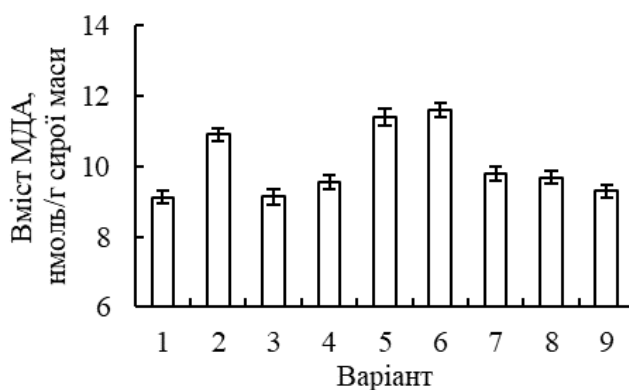


Рис. 4.5. Вміст МДА у коренях проростків пшениці, оброблених СК, NaHS, антагоністами сірководню і комбінаціями зазначених сполук, через 24 годин після прогріву. 1 - контроль (без прогріву); 2 - прогрів; 3 - прогрів + СК (10 мкМ); 4 - прогрів + NaHS (0,1 мМ); 5 - прогрів + гідроксиламін (0,3 мМ); 6 - прогрів + піруват калію (0,3 мМ); 7 - прогрів + СК (10 мкМ) + гідроксиламін (0,3 мМ); 8 - прогрів + СК (10 мкМ) + піруват калію (0,3 мМ); 9 - прогрів + СК (10 мкМ) + NaHS (0,1 мМ).

В цілому отримані результати вказують на участь сірководню у реалізації ефектів СК на стійкість проростків пшениці до гіпертермії. Про це, зокрема, свідчить транзиторне підвищення його вмісту у коренях (рис. 4.2). Слід зазначити, що ефекти дії СК, зареєстровані в коренях пшениці, дещо відрізнялися від тих, які описані для пагонів кукурудзи (Li et al., 2015b). У цитованій роботі при обробці СК спостерігається не транзиторне, а монотонне підвищення вмісту  $H_2S$ . Можливо, це пов'язано з особливостями різних органів проростків. Відомо, що для клітин коренів властива вищий ступінь змін багатьох біохімічних показників у порівнянні з клітинами надземних органів (Chasov, Minibayeva, 2014; Kolupaev et al., 2013). Слід зазначити, що в цілому для сполук, що виконують сигнальні функції, в тому числі газотрансмітерів, характерна в основному транзиторна зміна їх вмісту в клітинах у відповідь на той чи інший вплив (Kolupaev et al., 2019d).

Аргументом на користь участі  $H_2S$  у реалізації стрес-протекторної дії СК є і усунення її позитивного впливу на теплостійкість проростків пшениці двома різними інгібіторами L-цистеїндесульфгідрази – основного ферменту синтезу сірководню (рис. 4.3). Ці результати повністю узгоджуються з даними, отриманими у роботі Лі і співавт. для проростків кукурудзи (Li et al., 2015b).

До однієї із захисних систем, індукованих обробкою проростків СК, належить ферментативна антиоксидантна система (рис. 4.4). Ймовірно, в реалізації цього ефекту задіяний і  $H_2S$ . На користь такого припущення свідчить нівелювання після обробки інгібіторами його синтезу підвищення активності СОД, каталази і гваяколпероксидази у коренях. Для СОД і каталази такий ефект відзначався у коренях проростків і після теплового стресу (рис. 4.4).

При комбінованій дії СК і донора  $H_2S$  спостерігалось додаткове підвищення активності каталази і тенденція до цього для активності СОД. У той же час після стресового впливу активність СОД і гваяколпероксидази у коренях, оброблених комбінацією СК і NaHS, була нижчою, ніж за впливу тільки СК. Можна припустити, що це пов'язано з активацією інших компонентів протекторних систем під впливом  $H_2S$  і меншим «навантаженням» на ферментативні складові антиоксидантної системи. Відомо, що при дії  $H_2S$  у рослин може посилюватися функціонування аскорбат-глутатіонового циклу, що призводить до підвищення вмісту аскорбату і відновленого глутатіону (Christou et al., 2013). Також отримані відомості про посилення за впливу  $H_2S$  накопичення у рослин різних низькомолекулярних сполук, що володіють антиоксидантними властивостями: антоціанів, проліну, гліцин-бетаїну і трегалози (Chen et al., 2016; Kolupaev et al., 2019d). Слід зазначити, що при дослідженні комбінованого впливу СК і NaHS на активність антиоксидантних ферментів у пагонах проростків кукурудзи виявлено більш помітний синергічний ефект (Li, 2015a), ніж у коренях проростків пшениці. Це може бути пов'язано як з особливостями різних органів, так і з відмінностями в експериментальних умовах.

В цілому є підстави стверджувати, що індукування теплостійкості проростків пшениці як СК, так і донором сірководню пов'язане з активацією антиоксидантної системи. Про це свідчить і усунення при обробці проростків цими сполуками накопичення МДА, що викликається тепловим стресом (рис. 4.5). При цьому позитивний вплив СК частково усувався інгібіторами синтезу сірководню. Не повне зняття фізіологічних ефектів СК інгібіторами синтезу  $H_2S$  може вказувати на наявність шляхів саліцилатного сигналіngu, незалежних від сірководню. Для з'ясування їх внеску в реалізацію ефектів СК доцільно провести спеціальні дослідження.

Стрес-протекторна дія як СК, так і сірководню, може бути пов'язана з активацією не тільки антиоксидантної, а й інших захисних систем. Так, відомо, що СК здатна індукувати синтез дегідринів (Shakirova et al., 2016). Дія екзогенного  $H_2S$ , що індукує розвиток теплостійкості рослин суниці, супроводжувалася посиленням експресії генів БТШ 90, БТШ 80, БТШ 70, а також аквапоринів у коренях (Christou et al., 2013).

Таким чином, отримані результати дають підстави вважати, що сірководень бере участь в процесі індукування теплостійкості проростків пшениці екзогенною СК. Ймовірно, що ці ефекти реалізуються в тісному функціональному зв'язку з іншими сигнальними посередниками, зокрема, з АФК і оксидом азоту, кількість яких в рослинних клітинах також змінюється при дії СК (Kolupaev et al., 2012; Kolupaev et al., 2019d; Corpas et al., 2019b). Характер такої взаємодії  $H_2S$  з іншими компонентами сигнальної мережі при реалізації фізіологічних ефектів СК може стати предметом подальших досліджень. В свою чергу комбінований вплив на рослини СК і донорів  $H_2S$  може бути перспективним прийомом індукування їх стійкості до гіпертермії та інших стрес-факторів.

#### **4.2. Посилення стрес-протекторної дії на проростки пшениці 24-ЕБЛ донором оксиду азоту за умов гіпертермії**

Як уже зазначалося, у реалізації стрес-протекторної дії брасиностероїдів може брати участь оксид азоту як сигнальний посередник. Це дозволяє припустити можливість посилення захисної дії БС на рослини за допомогою донорів NO. З іншого боку, надмірні дози оксиду азоту можуть спричиняти так званий нітрозативний стрес (Mamaeva et al., 2015). Зважаючи на це, є доцільним дослідження комбінованих ефектів БС і донорів NO в широкому діапазоні концентрацій. Вивчали роздільний і комбінований вплив 24-ЕБЛ і донора NO НПН на теплостійкість проростків пшениці і показники, що характеризують стан про-/антиоксидантної рівноваги.

Внесення у середовище інкубації коренів 24-ЕБЛ у концентраціях від 5 до 200 нМ викликало підвищення теплостійкості проростків. Найбільш істотний ефект проявлявся при використанні 50 нМ 24-ЕБЛ. Під впливом 2 і 500 нМ 24-ЕБЛ достовірна зміна теплостійкості не спостерігалася.

Обробка проростків НПН у концентраціях діапазону 0,1-2 мМ також викликала помітне підвищення їх виживаності після ушкоджуючого прогріву (рис. 4.6). Найбільший захисний ефект проявлявся при обробці НПН у концентрації 0,5 мМ. Вплив 0,05 і 5 мМ НПН на теплостійкість проростків був несуттєвим.

Для дослідження комбінованої дії 24-ЕБЛ і НПН використовували їх концентрації, що викликали найбільш помітний захисний ефект. Найбільше підвищення теплостійкості проростків викликала обробка сумішшю 20 нМ 24-ЕБЛ і 0,2 мМ НПН (рис. 4.6). Її захисний ефект був помітно вищим ніж при використанні 50 нМ ЕБЛ і 0,5 мМ НПН окремо. Також досить високою була виживаність проростків у варіанті з використанням суміші 50 нМ ЕБЛ і 0,5 мМ НПН. Проте в цьому випадку захисна дія суміші не перевищувала ефекти цих сполук окремо. Нарешті, при використанні суміші 24-ЕБЛ і НПН у високих

концентраціях (200 нМ і 2 мМ, відповідно) не тільки не проявлявся захисний ефект, але і значно знижувалася теплостійкість проростків пшениці.

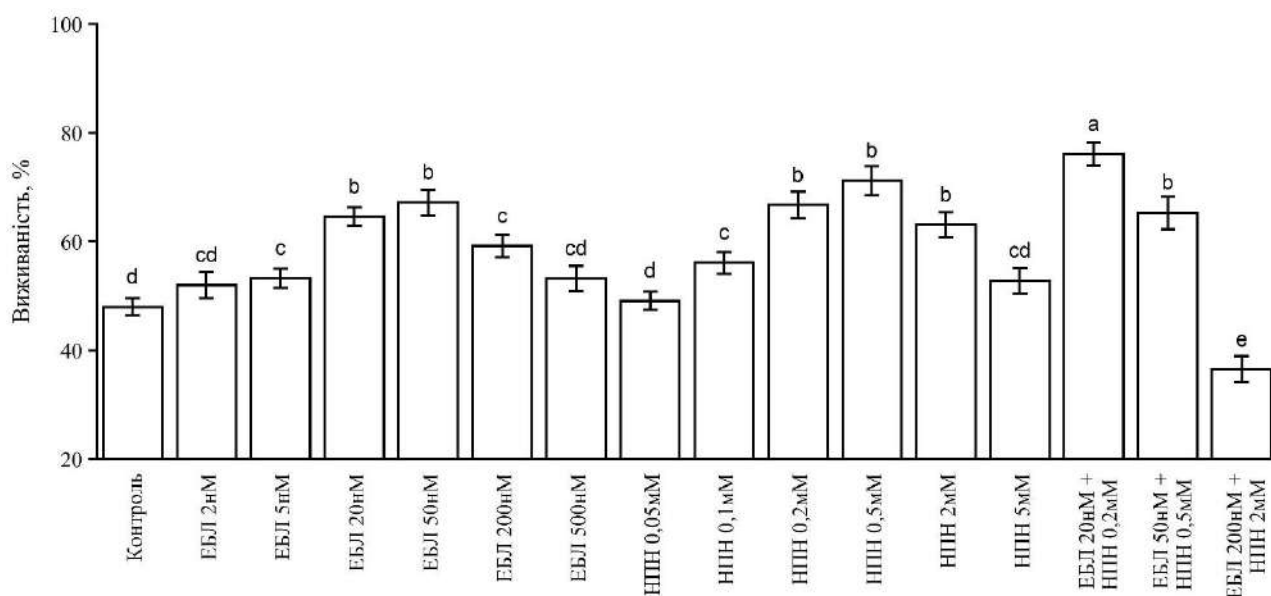


Рис. 4.6. Вживаність проростків пшениці, оброблених 24-ЕБЛ, НПН та їх комбінаціями після ушкоджуючого прогріву.

В цілому, при поєднанні 24-ЕБЛ і донора оксиду азоту в низьких діапазонах концентрацій відзначався ефект синергізму їх стрес-протекторної дії. Проте при підвищенні концентрацій двох сполук такий ефект зменшувався, а комбінація високих концентрацій НПН і 24-ЕБЛ взагалі призводила до вираженого антагонізму дії речовин та зниження теплостійкості проростків.

Для оцінки впливу 24-ЕБЛ і НПН на активність антиоксидантних ферментів і показники окислювального стресу ці сполуки використовували у концентраціях, які чинили найбільш виражений вплив на теплостійкість проростків.

Щоб довести специфічність впливу НПН на теплостійкість рослин як донора оксиду азоту, у окремих експериментах вивчали комбінований ефект НПН у концентраціях, що мали найбільш помітний захисний ефект, та скавенджерів оксиду азоту (РТЮ або метиленового синього – МС). Обробка



проростків лише РТЮ або МС не суттєво впливала на теплостійкість (рис. 4.7). У той же час скавенджери NO значній мірі усували захисний ефект НПН у різних концентраціях. Оскільки розкладання НПН може утворювати іони ціаніду, що може призвести до багатьох фізіологічних ефектів (Mur et al., 2013), порівнювали вплив НПН та  $K_4[Fe(CN)_6]$  на виживаність рослин. Було встановлено, що обробка проростків  $K_4[Fe(CN)_6]$  у концентраціях 0,2–2 мМ не впливала на їх теплостійкість (рис. 4.7). Таким чином, результати експериментів вказують на специфічність впливу НПН як донора NO.

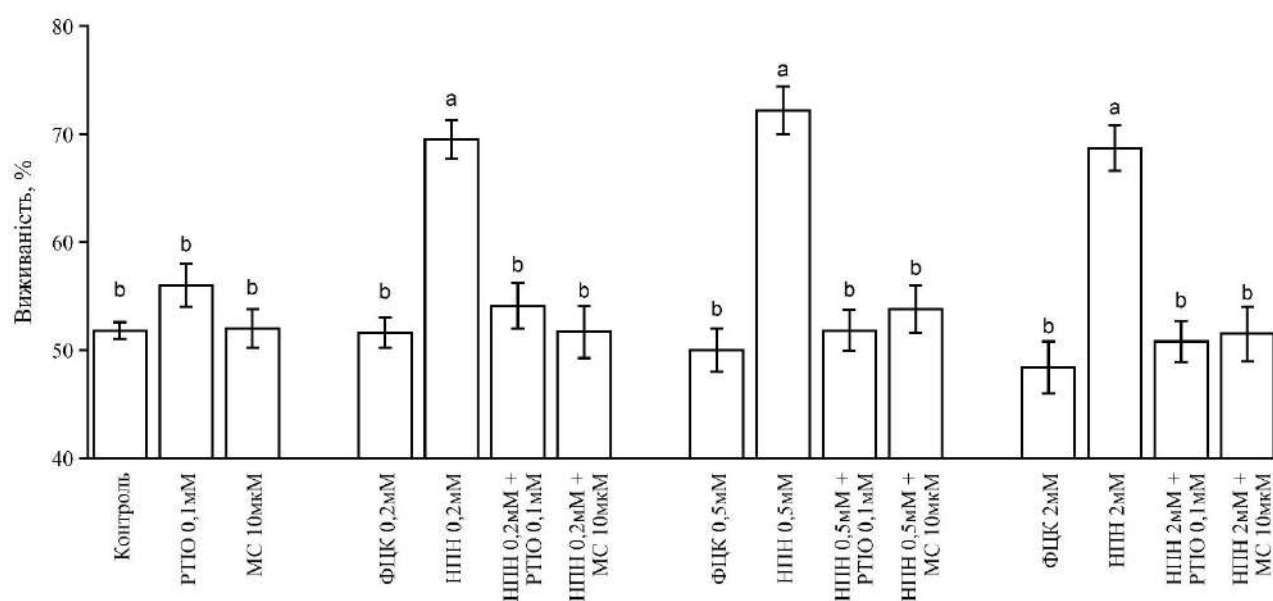


Рис. 4.7. Вплив  $K_4[Fe(CN)_6]$  та НПН у поєднанні з скавенджерами NO на виживаність проростків пшениці після ушкоджуючого прогріву.

Обробка коренів проростків 200 нМ 24-ЕБЛ, 2 мМ НПН, а також їх сумішню викликала підвищення вмісту пероксиду водню (рис. 4.8, а). За впливу нижчих концентрацій 24-ЕБЛ і НПН збільшення вмісту пероксиду водню у коренях після добової інкубації у звичайних умовах не спостерігалось. Через 24 години після ушкоджуючого прогріву вміст пероксиду водню підвищувався у контролі. У варіанті з впливом суміші 200 нМ 24-ЕБЛ і 2 мМ НПН також відзначався високий вміст пероксиду водню. В той же час у всіх

інших варіантах досліду цей показник після прогріву проростків був нижчим, ніж у відповідному контролі.

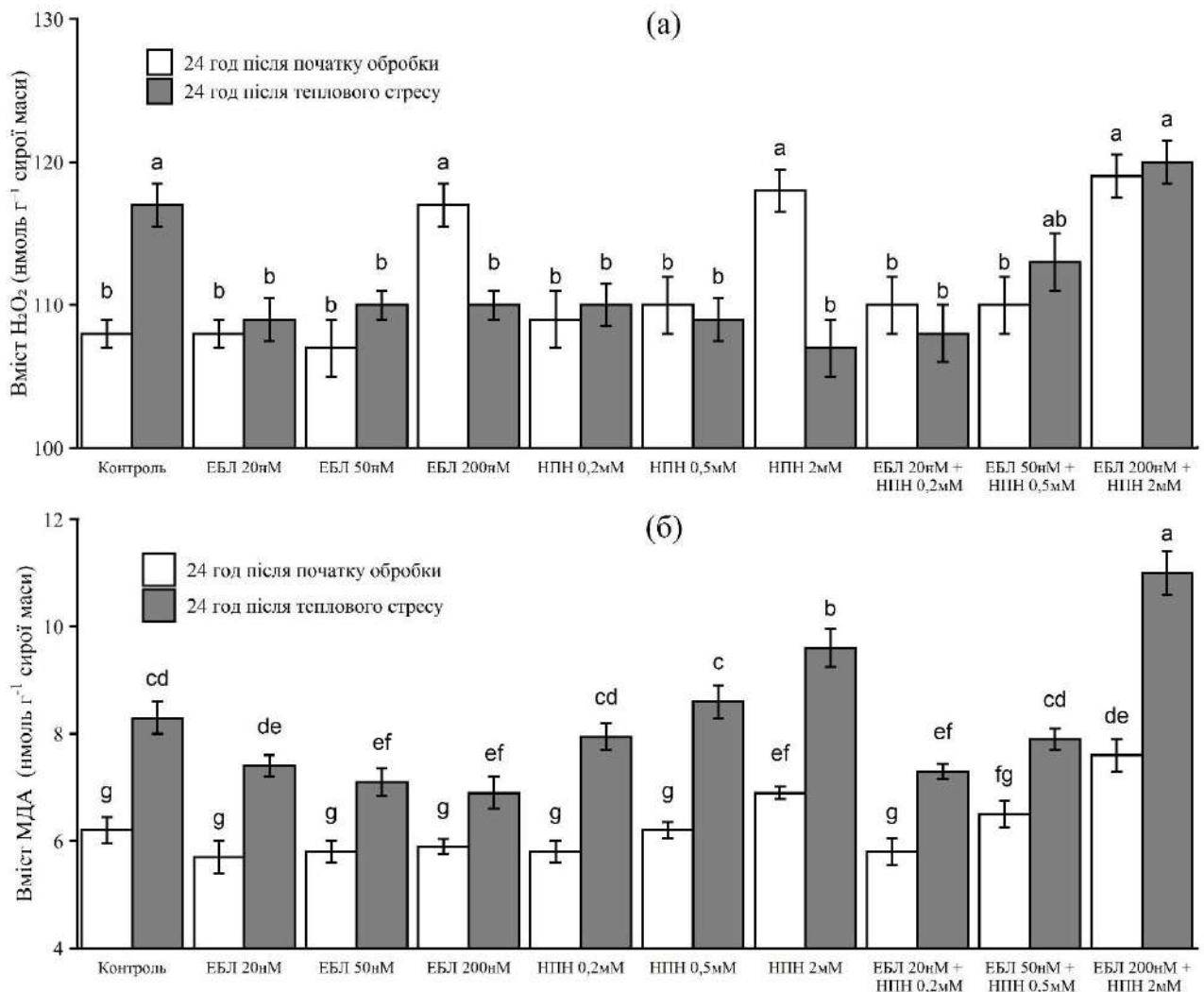


Рис. 4.8. Вміст пероксиду водню (а) і МДА (б) у проростках пшениці за впливу 24-ЕБЛ, НПН, їх комбінацій і ушкоджуючого прогріву.

Вміст продукту ПОЛ МДА у звичайних умовах достовірно збільшувався тільки під впливом 2 мМ НПН і більш суттєво при обробці сумішшю 200 нМ 24-ЕБЛ і 2 мМ НПН (рис. 4.8, б). Після ушкоджуючого прогріву відзначалося збільшення вмісту МДА в усіх варіантах досліду. Значення, що перевищують відповідний контроль, спостерігалися у варіантах з 2 мМ НПН і його сумішшю з 200 нМ 24-ЕБЛ. В той же час у варіантах з 50 і 200 нМ 24-ЕБЛ, а також з

комбінацією 20 нМ 24-ЕБЛ і 0,2 мМ НПН вміст МДА після прогріву проростків був нижчим, ніж у контролі (рис. 4.8, б).

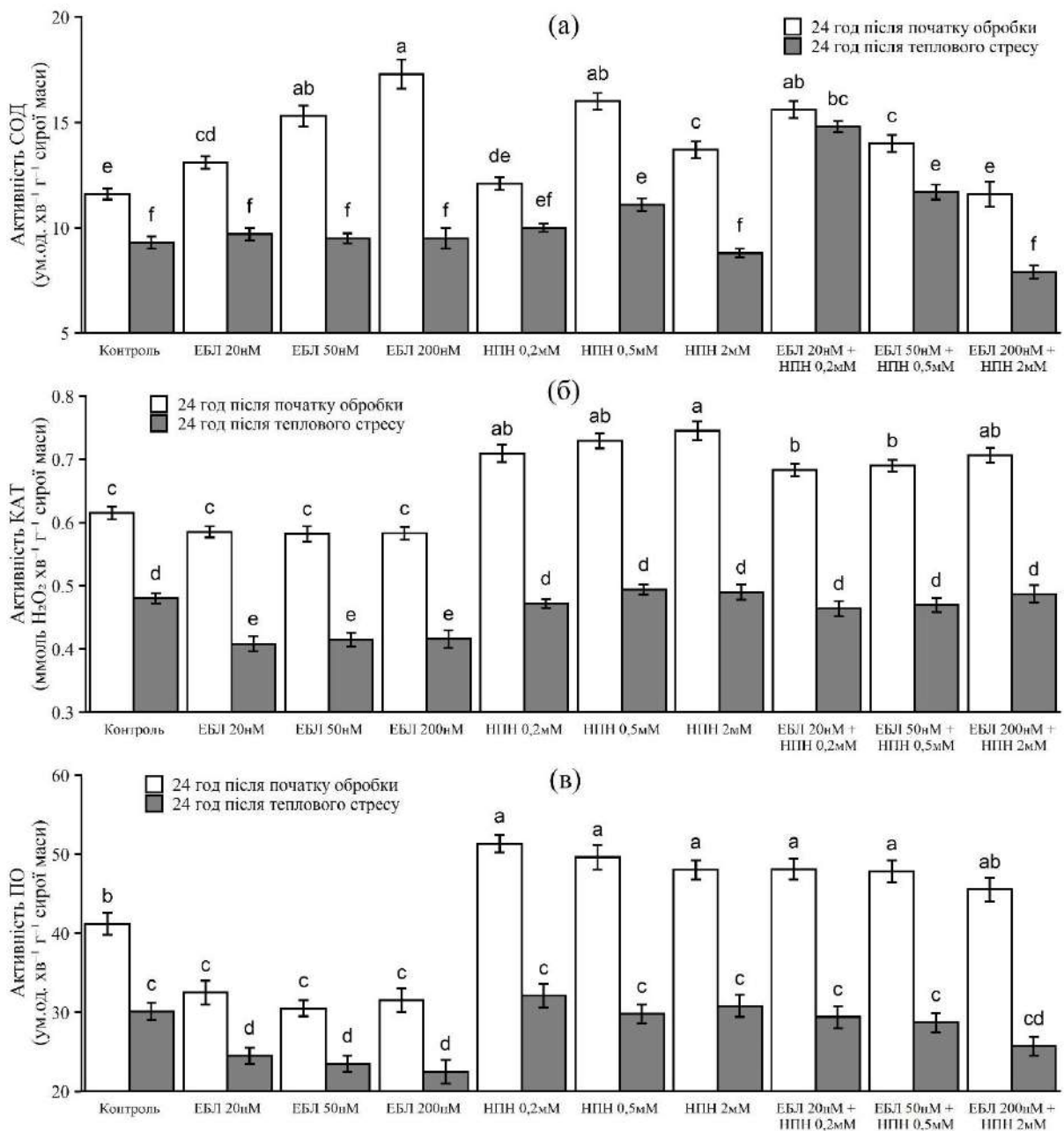


Рис. 4.9. Активність СОД (а), каталази (б) і гваяколпероксидази (в) у проростках пшениці за впливу 24-ЕБЛ, НПН, їх комбінацій і ушкоджуючого прогріву.

Обробка коренів проростків 24-ЕБЛ у концентраціях 20, 50 і 200 нМ викликала підвищення в них активності СОД (рис. 4.9, а). Активність ферменту підвищувалась і за впливу 0,5 та 2 мМ НПН. Досить високою була активність СОД у варіанті зі спільною обробкою 20 нМ 24-ЕБЛ і 0,2 мМ НПН. Комбінації цих сполук у вищих концентраціях (50 нМ 24-ЕБЛ і 0,5 мМ НПН) викликали менш істотне підвищення активності СОД. Нарешті, при використанні 200 нМ 24-ЕБЛ у поєднанні з 2 мМ НПН активність СОД не відрізнялася від величин контролю.

Ушкоджуючий прогрів викликав зниження активності СОД у коренях проростків (рис. 4.9, а). При цьому обробка сумішшю 20 нМ 24-ЕБЛ і 0,2 мМ НПН сприяла збереженню вищої активності СОД після стресового впливу. Перевищуючі відповідний контроль значення активності ферменту спостерігали і у варіантах з обробкою сумішшю 50 нМ 24-ЕБЛ і 0,5 мМ НПН, а також окремо 0,5 мМ НПН.

Обробка коренів проростків 24-ЕБЛ у різних концентраціях за звичайних умов не чинила впливу на активність каталази (рис. 4.9, б). Під впливом НПН у всьому досліджуваному діапазоні концентрацій, а також його комбінацій з 24-ЕБЛ активність каталази збільшувалася відносно контролю. Тепловий стрес викликав зниження активності ферменту у всіх варіантах досліді, особливо низькі значення спостерігалися у коренях проростків, оброблених 24-ЕБЛ.

Під впливом 24-ЕБЛ у звичайних температурних умовах знижувалася активність ПО (рис. 4.9, в). Обробка НПН, навпаки, підвищувала активність ПО. Такий же ефект спостерігався за впливу суміші 20 нМ 24-ЕБЛ і 0,2 мМ НПН або 50 нМ 24-ЕБЛ і 0,5 мМ НПН. Через добу після ушкоджуючого прогріву спостерігалось зниження активності ПО у всіх варіантах досліді. Найменші абсолютні значення активності цього ферменту відзначалися у варіантах з 24-ЕБЛ в різних концентраціях.

В цілому отримані результати підтверджують робочу гіпотезу про можливість посилення позитивного впливу фітогормону 24-ЕБЛ на теплостійкість рослин за допомогою донора сигнальної молекули NO (НПН).

Однак ефект синергічного впливу 24-ЕБЛ і НПН чітко спостерігався тільки при їх використанні у відносно невисоких концентраціях (20 нМ 24-ЕБЛ і 0,2 мМ НПН) (рис. 4.6). З іншого боку, обробка проростків сумішшю цих сполук у високих концентраціях (200 нМ 24-ЕБЛ і 2 нМ НПН) призводила до протилежного результату: значного зниження теплостійкості. Слід зазначити, що 200 нМ 24-ЕБЛ і 2 мМ НПН при використанні окремо не тільки не знижували, а й підвищували виживаність проростків після теплового стресу (рис. 4.6).

Є підстави вважати, що як посилення стрес-протекторних ефектів 24-ЕБЛ і НПН при їх комбінації у низьких концентраціях, так і активація теплових пошкоджень проростків за впливу суміші цих сполук у високих концентраціях, принаймні частково, зумовлені змінами редокс-гомеостазу. Так, обробка коренів проростків 24-ЕБЛ і НПН, а також їх сумішшю у помірних концентраціях нівелювала викликаний тепловим стресом ефект підвищення вмісту пероксиду водню у коренях (рис. 4.8, а). Також обробка проростків 24-ЕБЛ в різних концентраціях і його комбінацією з НПН в низьких концентраціях попереджувала викликане прогрівом підвищення вмісту у коренях продукту ПОЛ МДА (рис. 4.8, б). І, навпаки, при дії суміші 24-ЕБЛ і НПН у високих концентраціях в коренях після прогріву спостерігалися найбільші величини вмісту пероксиду водню та МДА. Іншими словами, при комбінації 24-ЕБЛ і донора оксиду азоту, в залежності від їх концентрацій, можливе як пом'якшення наслідків викликаного прогрівом окислювального стресу, так і їх посилення.

Як оксид азоту, так і АФК є посередниками в реалізації багатьох ефектів 24-ЕБЛ (Sharma et al., 2017). Зокрема, показано їх значення у підвищенні теплостійкості рослинних клітин за впливу екзогенних брасиностероїдів. Транзиторне збільшення їх вмісту в тканинах колеоптилів пшениці спостерігалось у перші години після початку обробки 24-ЕБЛ (Karpets, Kolupaev, 2018). З іншого боку, показано, що екзогенний оксид азоту також може посилювати залежну від НАДФН-оксидази генерацію АФК клітинами

рослин (Karpets et al., 2012). Можливо, за дії відносно високих концентрацій 24-ЕБЛ і НПН, що використовувалися нами в суміші, відбувається надмірна активація генерації АФК, і їх сигнальна дія змінюється ефектом окиснювального стресу.

Слід зазначити, що НПН у високих концентраціях може також мати токсичну дію на рослини, частково пов'язану з утворенням під час його розкладання іонів ціаніду (Mug et al., 2013). Проте, в умовах наших експериментів, при обробці рослин НПН, навіть у найвищій концентрації (5 мМ), візуально помітних токсичних ефектів не виявлено. Обробка проростків  $K_4[Fe(CN)_6]$ , при розкладанні якого також утворюються аніони ціаніду, не мала значного негативного ефекту. Крім того, захисний ефект НПН під впливом теплового стресу усувався обробкою проростків скавенджером NO – РТЮ або МС (рис. 4.7). В ідентичних експериментальних умовах, було показано, що обробка проростків 2 мМ НПН спричиняла майже двократне збільшення вмісту NO у коренях через 1 годину після її початку (Karpets et al., 2016). Цей ефект зберігався протягом 24 годин спостереження. Таким чином, є підстави вважати, що в умовах наших експериментів ефекти НПН в основному пов'язані з його дією як донора оксиду азоту.

Поєднання екзогенного оксиду азоту як сигнальної молекули з 24-ЕБЛ в помірних концентраціях може сприяти активації антиоксидантної системи. На це, зокрема, вказують найвищі величини активності СОД в коренях проростків у післястресовий період, які спостерігалися у варіанті з 20 нМ 24-ЕБЛ і 0,2 мМ НПН (рис. 4.9, а). Такі результати узгоджуються з даними Jangid та Dwivedi (2017), отриманими для рослин томатів, що зазнали впливу посухи. Їх обробка комбінацією 3 мкМ 24-ЕБЛ і 100 мкМ НПН викликала найбільш істотне підвищення активності СОД.

Вплив 24-ЕБЛ і НПН, а також їх суміші на активність інших антиоксидантних ферментів – каталази і ПО – в умовах наших експериментів у постстресовий період був несуттєвим (рис. 4.9, б; 4.9, в). В літературі повідомляється про різноспрямований вплив БС на активність каталази і

пероксидаз у рослин різних видів (Sharma et al., 2015). Так, у сорго при обробці БС відзначалося істотне підвищення активності каталази на тлі зниження активності пероксидази (Vardhini, Rao, 2003). Ідентичний вплив БС на активність каталази і пероксидази в умовах осмотичного стресу було зареєстровано на рослинах *Raphanus sativus* (Vardhini et al., 2012). Протилежний ефект – підвищення активності пероксидази і зниження активності каталази – виявлений при дії 24-ЕБЛ на рослини томатів (Slathia et al., 2012). Помітне підвищення активності пероксидази під впливом 24-ЕБЛ показано в листках картоплі за умов сольового стресу (Kolomeichuk et al., 2020).

В умовах наших експериментів, незважаючи на зниження активності ферментів, що знешкоджують  $H_2O_2$ , в усіх варіантах з обробкою 24-ЕБЛ і НПН, а також їх сумішшю, за винятком варіанта з дією максимальних концентрацій, істотного накопичення пероксиду водню у коренях після прогріву не спостерігалось (рис 4.8, а). Це вказує на можливе індукування 24-ЕБЛ, НПН і їх комбінацією інших компонентів антиоксидантної системи. В літературі повідомляється про здатність 24-ЕБЛ викликати АФК-опосередковану активацію глутатіонредуктази і накопичення глутатіону у рослин огірка (Jiang et al., 2012). Також у рослин огірка при холодovому стресу обробка БС сприяла накопиченню аскорбінової кислоти і підвищенню активності аскорбатпероксидази (Jiang et al., 2012). З іншого боку, показано, що 24-ЕБЛ знижував індуковане тепловим стресом посилення генерації супероксидного аніон-радикала і пероксиду водню, а також накопичення МДА у рослин *Ficus concinna*. При цьому відзначалося підвищення вмісту аскорбату і відновленого глутатіону (Jin et al., 2015). У рослин *Brassica juncea* під впливом 24-ЕБЛ підвищувався загальний вміст низькомолекулярних антиоксидантів – фенольних сполук, глутатіону, аскорбату і каротиноїдів (Sharma et al., 2016). Також, з використанням рослин пшениці показана здатність БС викликати збільшення вмісту вільного проліну за звичайних і стресових умов (Yusuf et al., 2011; Talaat, Shawky, 2013). Як відомо, пролін належить до мультифункціональних стрес-протекторів і має високу антиоксидантну

активність (Szabados, Savoure, 2009; Shafiq et al., 2018). Нарешті, на рослинах кукурудзи показана здатність БС викликати підвищення активності альтернативної оксидази і тим самим знижувати утворення АФК в мітохондріях та зменшувати ймовірність розвитку окислювального стресу (Yusuf et al., 2019).

Оксид азоту також чинить істотний вплив на функціонування антиоксидантної системи рослин. Він включає в себе пряму модифікацію цільових білків шляхом S-нітрозилювання, нітрування залишків тирозину і метал-нітрозилювання (Astier, Lindermaur, 2012). При цьому в залежності від способу модифікації можливі як активація, так і інгібування цільових ферментів (Aroga et al., 2016). Крім того, оксид азоту, як сигнальна молекула, за участі інших посередників може посилювати експресію генів антиоксидантних ферментів (Zhang et al., 2007; Liu et al., 2014).

Таким чином, є підстави вважати, що при комбінованій дії екзогенних БС і NO в помірних концентраціях можливе посилення їх фізіологічних ефектів. Ймовірно, воно зумовлене участю оксиду азоту як посередника, що забезпечує процеси трансдукції сигналу БС у генетичний апарат, і активацією відповідних фізіологічних процесів. Прикладом таких ефектів може бути посилення оксидом азоту стрес-протекторної дії БС, в тому числі показане у наших експериментах підвищення теплостійкості проростків пшениці, яке було максимальним при дії суміші 24-ЕБЛ і НПН в помірних концентраціях. Синергізм ефектів БС і NO може проявлятися не тільки при індукуванні ними захисних реакцій рослин у відповідь на дію стресорів. Наприклад, є відомості про посилення індукованого БС утворення адвентивних коренів при обробці проростків донорами NO і послабленні такого ефекту його скавенджерами (Li et al., 2020).

В цілому, отримані результати вказують на можливість посилення фізіологічних ефектів БС за допомогою донора оксиду азоту НПН. При цьому, подібні ефекти можливі лише у відносно вузькому діапазоні концентрацій БС і донорів NO. Перевищення концентрацій цих сполук може нівелювати їх стрес-протекторну дію. Це явище може бути зумовлене надмірною зміною редокс-



гомеостазу під впливом суміші БС і донора NO, що призводить до окислювального стресу.

#### **Висновки до розділу 4**

Обробка проростків СК або NaHS викликала підвищення їх стійкості до ушкоджуючого прогріву. При цьому, під впливом СК відбувалося транзиторне збільшення вмісту сірководню у коренях з максимальним ефектом через 2-3 години після початку обробки. Обробка коренів СК викликала підвищення в них активності СОД, каталази і гваяколпероксидази. Під впливом NaHS істотно підвищувалася активність СОД і каталази. Також обробка коренів проростків СК і NaHS зменшувала викликане прогрівом накопичення продуктів ПОЛ. Інгібітори синтезу сірководню гідроксиламін та піруват калію частково усували викликані СК ефекти підвищення активності антиоксидантних ферментів і розвитку теплостійкості проростків. У той же час комбінована обробка 10 мкМ СК і 0,1 мМ NaHS сприяла додатковому збільшенню активності антиоксидантних ферментів і підвищенню виживаності проростків після прогріву.

Обробка проростків пшениці 24-ЕБЛ або НПН підвищувала їх виживаність після ушкоджуючого прогріву. Комбінована обробка 24-ЕБЛ і НПН у оптимальних концентраціях викликала більш істотну захисну дію у порівнянні з обробкою кожною сполукою окремо. У той же час спільна дія високих концентрацій знижувала теплостійкість проростків. Під впливом 24-ЕБЛ і НПН у концентраціях, що чинили захисний вплив, а також їх комбінацій, підвищувалася активність СОД у коренях. Після прогріву найвищі значення активності СОД зберігалися у варіанті з комбінованою обробкою проростків 20 нМ 24-ЕБЛ і 0,2 мМ НПН. Активність каталази і гваяколпероксидази у коренях проростків підвищувалася під впливом різних концентрацій НПН і його комбінацій з 24-ЕБЛ. В той же час 24-ЕБЛ за відсутності НПН не впливав на активність каталази і викликав зниження активності ПО. Після прогріву

активність цих ферментів знижувалася в усіх варіантах досліду. Тепловий стрес викликав підвищення вмісту МДА, обробка проростків 24-ЕБЛ, а також його комбінацією з НПН в низьких концентраціях усувала цей ефект, а в високих, навпаки, посилювала.

Отже, стрес-протекторна дія фітогормонів СК і БС може бути підсилена їх застосуванням у поєднанні з донорами газотрансмітерів – сірководню і оксиду азоту, відповідно. При цьому донори газотрансмітерів у низьких концентраціях разом з фітогормонами посилювали вплив останніх на одну з ключових захисних систем клітин – антиоксидантну. Це робить перспективною для практичного застосування обробку рослин комбінацією стресових фітогормонів і донорів газотрансмітерів.

## РОЗДІЛ 5. РОЛЬ КОМПОНЕНТІВ ЖАСМОНАТНОГО СИГНАЛІНГУ В РЕАЛІЗАЦІЇ СТРЕС-ПРОТЕКТОРНИХ ЕФЕКТІВ ГАЗОТРАНСМІТЕРІВ ЗА ДІЇ СОЛЬОВОГО СТРЕСУ НА РОСЛИНИ АРАБІДОПСИСУ

Газотрансміттери перебувають у тісному зв'язку з мережею гормонального сигналіngu рослин. З одного боку, вони беруть участь в трансдукції сигналів фітогормонів в генетичний апарат (Shan et al., 2018a), з іншого – зміна вмісту газотрансмітерів може впливати на гормональний комплекс (Huang et al., 2004; Banerjee et al., 2018). Дослідження останніх років, зокрема, вказують на тісний функціональний зв'язок між газотрансмітерами і жасмонатами (Kolupaev, Yastreb, 2021). Останні, як уже зазначалося, перебувають в центрі регуляторних процесів рослин за стресових умов. Це повною мірою стосується адаптації рослин до засолення. Так, при сольовому стресі виявлено підвищення вмісту жасмонової кислоти у рослин різних видів (Ali, Baek, 2020; Kang et al., 2005; Ryu et al., 2015). Порівняння реакції на сольовий стрес рослин томату дикого типу і жасмонатдефіцитного мутанта *def-1* показало, що у останнього розвивався більш глибокий окислювальний стрес і відзначалися менший вміст низькомолекулярних антиоксидантів і низька активність СОД, глутатіонредуктази та глутатіон-S-трансферази (Abouelsaad, Renault, 2018).

Встановлено, що газотрансміттери можуть впливати на вміст жасмонатів (Huang et al., 2004). Так, підвищення їх кількості у рослин зареєстровано під впливом екзогенних NO (Huang et al., 2004) і CO (Cheng et al., 2018). Дія гіпертермії на рослини тютюну викликала посилення синтезу CO, що, в свою чергу, посилювало утворення жасмонової кислоти. В результаті цього активізувався транскрипційний фактор жасмонатного сигналіngu NtMYC2a, що, у свою чергу, призводило до активації експресії гена путресцин-N-метилтрансферази NtPMT1 і в кінцевому підсумку до термоіндукованого посилення синтезу нікотину (Cheng et al., 2018).

Між сірководнем і жасмоновою кислотою як учасниками сигнальної трансдукції, ймовірно, також існують прямі і зворотні зв'язки. Так, виявлено посилення генерації сірководню у рослин арабідопсису при їх обробці жасмоновою кислотою (Shan et al., 2018a). З іншого боку, із застосуванням методів біоінформатики отримані дані, що вказують на можливість впливу  $H_2S$  на експресію гена рецептора жасмонатів COI1 (Li et al., 2017).

Транскрипційний фактор JIN1/MYC2, ключовий у жасмонатному сигналінгу, також може бути задіяний в сигнальній мережі газотрансмітерів. Так, ще у 2008 році на підставі даних, отриманих методами біоінформатики, було зроблено висновок про участь генів сімейства MYC в трансдукції сигналів NO (Palmieri et al., 2008).

Водночас експериментальних досліджень участі ключових білкових компонентів жасмонатного сигналінгу (рецептора жасмонату COI1 і транскрипційного фактора JIN1/MYC2) у реалізації стрес-протекторних ефектів газотрансмітерів на момент виконання нашої роботи не проводилося. Тому одним із завдань стало дослідження реакції на сольовий стрес рослин арабідопсису дикого типу (Col-0) і дефектних за жасмонатним сигналінгом мутантів *coil* і *jin1* при їх обробці донорами газотрансмітерів – НПН (NO), NaHS ( $H_2S$ ) і геміном (CO). Всі вказані газотрансмітери розглядаються як можливі індуктори солестійкості рослин (див. розділ 1).

### **5.1. Вплив донорів NO і $H_2S$ на солестійкість рослин арабідопсису, дефектних за компонентами жасмонатного сигналінгу**

За впливу NaCl водний дефіцит тканин листя арабідопсису всіх трьох генотипів збільшувався приблизно у два рази (рис. 5.1). Обробка рослин дикого типу донором сірководню NaHS перед сольовим стресом значною мірою зменшувала його прояв у стресових умовах. При дії донора оксиду азоту НПН ефект зниження водного дефіциту у рослин Col-0 проявлявся на рівні тенденції (був вірогідним при  $P \leq 0.1$ ). Помітне зменшення водного дефіциту у варіантах

з попередньою обробкою NaHS і НПН спостерігалось і у мутантів *coil*. В той же час у рослин генотипу *jin1*, оброблених перед стресовим впливом донорами сірководню і оксиду азоту, водний дефіцит не зменшувався (рис. 5.1).

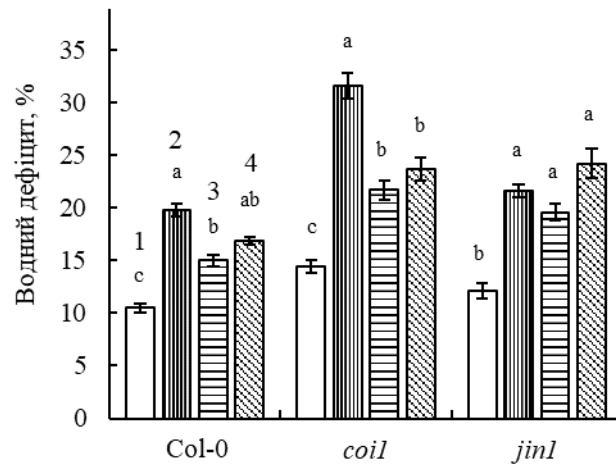


Рис. 5.1. Водний дефіцит листя арабідопсису за впливу NaCl та донорів сірководню і оксиду азоту. 1 - контроль; 2 - NaCl (175 мМ); 3 - NaCl (175 мМ) + NaHS (50 мкМ); 4 - NaCl (175 мМ) + НПН (500 мкМ).

Інкубація рослин на середовищі з NaCl викликала підвищення вмісту продукту ПОЛ МДА у листі рослин всіх трьох досліджуваних генотипів (рис. 5.2, а). Передобробка донорами сірководню і оксиду азоту значно зменшувала стрес-індуковане накопичення МДА у рослин дикого типу, але практично не впливала на його вміст у обох мутантів, дефектних за жасмонатним сигналіном.

Пом'якшення донором сірководню викликаних сольовим стресом окиснювальних пошкоджень листя рослин Col-0 зменшувало екзоосмос електrolітів з тканин листя, тобто сприяло збереженню цілісності мембран (рис. 5.2, б). Обробка рослин дикого типу донором оксиду азоту чинила подібний мембрано-протекторний ефект на рівні тенденції (вірогідно при  $P \leq 0.1$ ). У той же час попередня обробка мутантів *coil* і *jin1* донорами  $H_2S$  і  $NO$

істотно не впливала на проникність мембран клітин листя при сольовому стресі (рис. 5.2, б).

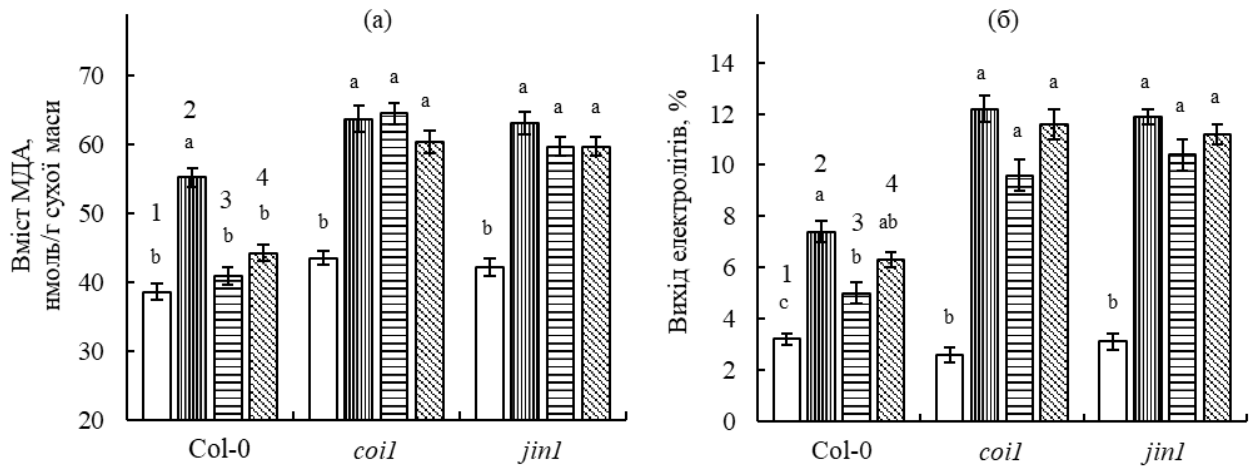


Рис. 5.2. Вміст МДА (а) і вихід електролітів з листя арабідопсису (б) при дії NaCl та донорів сірководню і оксиду азоту. 1 - контроль; 2 - NaCl (175 мМ); 3 - NaCl (175 мМ) + NaHS (50 мкМ); 4 - NaCl (175 мМ) + НПН (500 мкМ).

Одним з інтегральних показників стійкості рослин до дії стресорів, зокрема, засолення, вважається збереження пулу фотосинтетичних пігментів після впливу несприятливого фактора (Santos, 2004). Після впливу солі у рослин всіх трьох генотипів знижувався вміст хлорофілів, в найбільшій мірі цей ефект проявлявся у мутантів *jin1* (табл. 5.1). Передобробка NaHS і НПН сприяла збереженню пулу хлорофілів у листі за стресових умов у рослин дикого типу, але не у мутантів, дефектних за жасмонатним сигналінгом. Слід зазначити, що за відсутності впливу NaCl протягом чотирьох діб експерименту вміст хлорофілів у листках достовірно не змінювався. Не спостерігалось достовірних відмінностей за цим показником і між різними генотипами.

Вміст каротиноїдів у листках рослин трьох генотипів при помірному стресовому впливі достовірно не змінювався (табл. 5.1). Їх попередня обробка донорами сірководню і оксиду азоту істотно не впливала на кількість каротиноїдів.

Табл. 5.1. Вміст фотосинтетичних пігментів (мг/г сухої маси) в листі арабідопсису при дії NaCl та донорів сірководню і оксиду азоту

Варіант	Хлорофіли $a + b$	Каротиноїди
	<i>Col-0</i>	
Контроль	$15.44 \pm 0.20^a$	$1.41 \pm 0.03^a$
NaCl (175 мМ)	$13.12 \pm 0.19^b$	$1.56 \pm 0.06^a$
NaCl (175 мМ) + NaHS (50 мкМ)	$15.22 \pm 0.17^a$	$1.47 \pm 0.04^a$
NaCl (175 мМ) + НПН (500 мкМ)	$14.44 \pm 0.18^a$	$1.52 \pm 0.06^a$
	<i>coil</i>	
Контроль	$16.20 \pm 0.22^a$	$1.71 \pm 0.07^a$
NaCl (175 мМ)	$14.00 \pm 0.19^b$	$1.74 \pm 0.08^a$
NaCl (175 мМ) + NaHS (50 мкМ)	$14.41 \pm 0.17^b$	$1.55 \pm 0.05^a$
NaCl (175 мМ) + НПН (500 мкМ)	$13.62 \pm 0.21^b$	$1.55 \pm 0.05^a$
	<i>jin1</i>	
Контроль	$15.74 \pm 0.19^a$	$1.76 \pm 0.07^a$
NaCl (175 мМ)	$10.71 \pm 0.18^c$	$1.55 \pm 0.04^a$
NaCl (175 мМ) + NaHS (50 мкМ)	$11.91 \pm 0.17^b$	$1.48 \pm 0.06^a$
NaCl (175 мМ) + НПН (500 мкМ)	$10.23 \pm 0.19^c$	$1.55 \pm 0.05^a$

За відсутності стресу досліджувані генотипи арабідопсису відрізнялися за активністю СОД. У генотипу *coil* вона була вищою, а у *jin1* істотно нижчою, ніж у рослин дикого типу (рис. 5.3, а). Інкубація на середовищі з NaCl викликала зниження активності ферменту у рослин всіх трьох досліджуваних генотипів. Передобробка NaHS рослин дикого типу сприяла збереженню активності СОД у листі на рівні, близькому до контролю, а попередній вплив НПН викликав істотне підвищення активності ферменту у порівнянні з контрольним варіантом (рис. 5.3, а). У той же час передстресова обробка рослин *coil* і *jin1* донорами сірководню і оксиду азоту не впливала на активність СОД в умовах дії NaCl.

Активність каталази в контролі у рослин *coil* була істотно нижчою, а у рослин *jin1* трохи вищою у порівнянні з *Col-0* (рис. 5.3, б). Сольовий стрес не мав помітного впливу на активність ферменту у рослин дикого типу і мутантів *coil*, але спричиняв її зниження у генотипу *jin1*. Передобробка донорами  $H_2S$  і NO призводила до підвищення активності каталази у рослин дикого типу при

дії стресора (рис. 5.3, б). У той же час вона не впливала на активність ферменту у мутантів *coil* і *jin1*.

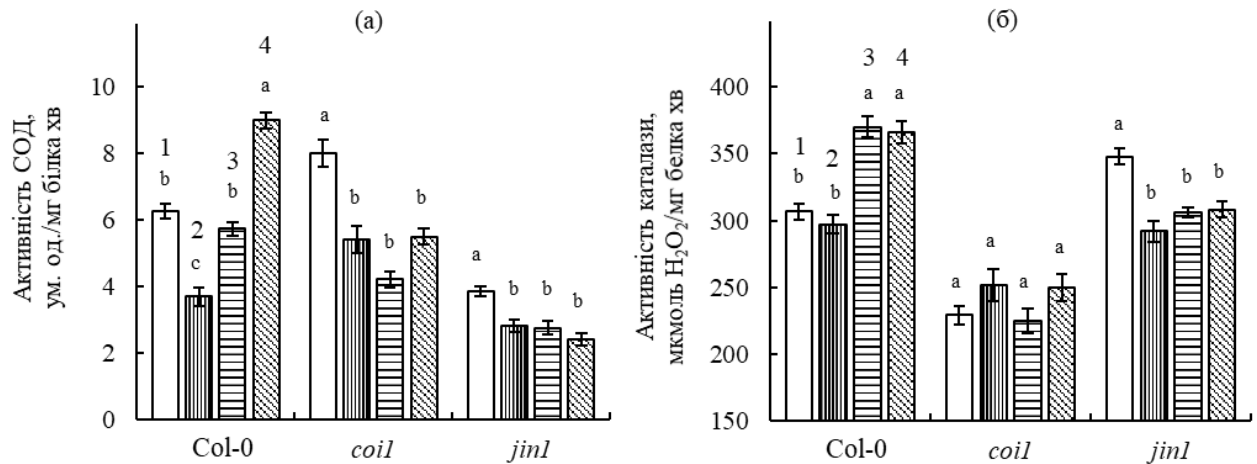


Рис. 5.3. Активність СОД (а) і каталази (КАТ; б) в листі арабідопсису при дії NaCl та донорів сірководню і оксиду азоту. 1 - контроль; 2 - NaCl (175 мМ); 3 - NaCl (175 мМ) + NaHS (50 мкМ); 4 - NaCl (175 мМ) + НПН (500 мкМ).

Вміст проліну за звичайних умов у листі рослин генотипу *coil* був вищим ніж у рослин дикого типу і мутантів *jin1* (рис. 5.4). Інкубація на середовищі з NaCl викликала приблизно потрійне збільшення вмісту проліну у рослин дикого типу і мутантів *coil*. У рослин *jin1* цей ефект був дещо меншим. Передобробка рослин дикого типу і мутантів *coil* донорами сірководню і оксиду азоту достовірно зменшувала стрес-індуковане накопичення проліну в листі (рис. 5.4). У той же час донори H<sub>2</sub>S і NO не чинили істотного впливу на вміст проліну за стресового впливу у рослин генотипу *jin1*.

В умовах наших експериментів попередня обробка донорами газотрансмітерів - сірководню і оксиду азоту - підвищувала стійкість рослин арабідопсису дикого типу до дії NaCl. Це виражалося в зменшенні водного дефіциту листя (рис. 5.1), запобіганні окислювальних пошкоджень, зниженні стрес-індукованого виходу електролітів з тканин (рис. 5.2), а також збереженні пулу хлорофілу (табл. 5.1).



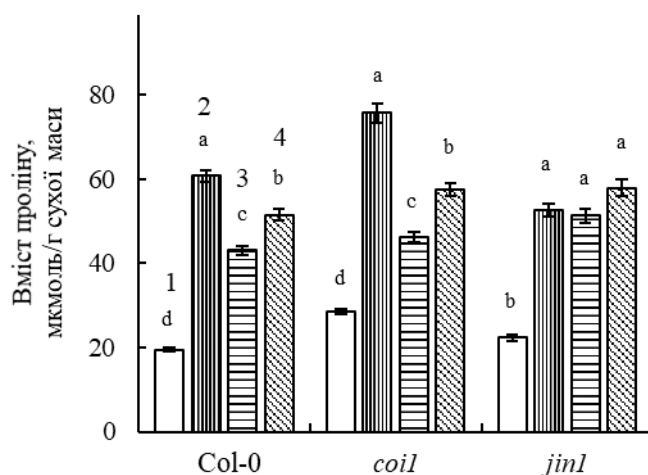


Рис. 5.4. Вміст проліну в листі арабідопсису при дії NaCl та донорів сірководню і оксиду азоту. 1 - контроль; 2 - NaCl (175 мМ); 3 - NaCl (175 мМ) + NaHS (50 мкМ); 4 - NaCl (175 мМ) + НПН (500 мкМ).

Можна вважати, що сірководень і оксид азоту як сигнальні молекули активують протекторні системи рослин, викликаючи ефекти преадаптації. Одним з таких ефектів, виявлених нами, є підвищення під впливом донорів  $H_2S$  і особливо NO активності ключового антиоксидантного ферменту СОД (рис. 5.3, а), що виконує важливі функції в захисті клітин від радикальних АФК (Alscher et al., 2002). Також у рослин дикого типу, оброблених NaHS і НПН, при дії NaCl підвищувалася активність каталази (рис. 5.3, б), яка знешкоджує пероксид водню і функціонує у тісній взаємодії з СОД. Ці результати узгоджуються з даними літератури про посилення функціонування антиоксидантної системи рослин при дії екзогенних сірководню і оксиду азоту. Так, в роботі Shi і співавт. (2015) під впливом сірководню у рослин арабідопсису дикого типу при тривалій дії солі у ґрунтовій культурі підвищувалася активність СОД, каталази та глутатіонредуктази, а також збільшувався редокс-статус глутатіону. В цілому феноменологічно схожі ефекти в наших досліджах проявлялися і при обробці рослин Col-0 донором

іншого газотрансмітера - оксиду азоту (рис. 5.3). Підвищення активності СОД і каталази, а також деяких інших антиоксидантних ферментів зареєстровано у рослин різних видів і під впливом НПН, особливо на тлі засолення (Wu et al., 2011).

Обробка рослин арабідопсису дикого типу донорами сірководню і оксиду азоту призводила до ослаблення стрес-індукованого накопичення проліну в листі (рис. 5.4). Незважаючи на важливість проліну як мультифункціонального протектора, менше підвищення його вмісту при помірному сольовому впливі може вказувати на велику резистентність рослин (Кузнецов, Шевяков, 1999). Іншими словами, при більшій резистентності «порог» активації накопичення проліну стресовим фактором може бути вищим. Можна вважати, що у рослин, попередньо адаптованих дією донорів сірководню і оксиду азоту, крім накопичення проліну, активно функціонують інші захисні механізми, зокрема, ферментативна складова антиоксидантної системи. Як відомо, в ряді випадків між проліном і СОД можлива функціональна взаємозамінність як агентами, що забезпечують захист від вільних радикалів (Shevyakova et al., 2009).

Нами вивчалися лише окремі складові антиоксидантної та осмопротекторної систем рослин арабідопсису, що функціонують при сольовому стресі. Природно, що отримані дані не розкривають повноти впливу газотрансмітерів на захисні системи, що функціонують при сольовому стресі. Однак, донори сірководню і оксиду азоту безсумнівно сприяли підвищенню солестійкості рослин арабідопсису дикого типу, що зафіксовано за такими інтегральними показниками, як рівень ПОЛ, проникність мембран, величина водного дефіциту і пул фотосинтетичних пігментів. При цьому схожість феноменології протекторної дії газотрансмітерів  $H_2S$  і  $NO$  при обробці рослин  $NaCl$  видається досить закономірною. Наявні в літературі відомості вказують, що ці молекули знаходяться у складній функціональній взаємодії один з одним, в тому числі при індукуванні стійкості рослин до стресорів. Так, позитивний вплив донора сірководню  $NaHS$  на солестійкість і експресію генів антиоксидантних ферментів у рослин ячменю не проявлявся в присутності

скавенджера оксиду азоту РТІО (Chen et al., 2015). З іншого боку, показано, що індукований донором оксиду азоту нітропрусидом натрію розвиток теплостійкості проростків кукурудзи супроводжувався підвищенням вмісту  $H_2S$  (Li et al., 2013).

Як уже зазначалося,  $H_2S$  і  $NO$  функціонально взаємодіють не тільки один з одним, але і з мережею гормонального сигналіngu. Одним з «вузлових» елементів такої взаємодії може бути транскрипційний фактор JIN1/MYC2, який бере участь не тільки в реалізації фізіологічних ефектів жасмонової кислоти, але і АБК (Ton et al., 2009). Як показують отримані результати, у рослин арабідопсису *jin1*, дефектних за геном, що кодує цей білок, не проявлявся ефект індукування солестійкості дією донорів оксиду азоту і сірководню. Обробка цих рослин НПН і  $NaHS$ , на відміну від рослин дикого типу, при дії солі не сприяла зниженню водного дефіциту (рис. 5.1), не зменшувала окислювальні пошкодження (рис. 5.2) і не стабілізувала вміст хлорофілів (табл. 5.1). Також у мутантів *jin1*, попередньо оброблених донорами  $NO$  і  $H_2S$ , не спостерігалось підвищення активності антиоксидантних ферментів в стресових умовах (рис. 5.3). Крім того, їх обробка екзогенними газотрансмітерами не впливала на рівень стрес-індукованого накопичення проліну (рис. 5.4). Слід зазначити, що відсутність впливу донора оксиду азоту на солестійкість рослин генотипу *jin1* була показана раніше при використанні більш сильного стресового впливу (Yastreb et al., 2017).

Отримані результати вказують на те, що в реалізації протекторної дії оксиду азоту та сірководню задіяний не лише транскрипційний фактор JIN1/MYC2, але і, ймовірно, інші компоненти жасмонатного сигналіngu. Так, у мутантів *coi1*, дефектних за рецептором жасмонової кислоти, стрес-протекторна дія донорів  $NO$  і  $H_2S$  проявлялася менше, ніж у рослин дикого типу. Зокрема, передстресова обробка *coi1* НПН і  $NaHS$  не зменшувала викликане засоленням накопичення продуктів ПОЛ в листках і посилення виходу електролітів з тканин (рис. 5.2). Також обробка обома донорами газотрансмітерів не стабілізувала пул хлорофілів при дії  $NaCl$  (табл. 5.1). Не

спостерігалось у рослин *coi1* і помітного впливу донору NO на активність СОД і каталази при сольовому стресі (рис. 5.3). Таким чином, в цілому рослини *coi1*, як і мутанти *jin1*, слабо реагували на дію екзогенних NO і H<sub>2</sub>S. Однак, між цими мутантами виявлялися і деякі відмінності в прояві відповідної реакції на засолення після обробки гідросульфідом натрію і НРН. Так, у рослин *coi1* попередній вплив донорів NO і H<sub>2</sub>S зменшував ефект стрес-індукованого накопичення проліну (рис. 5.4). У цих мутантів під впливом донорів оксиду азоту і сірководню при дії NaCl дещо зменшувався водний дефіцит (рис. 5.1). Іншими словами, у мутантів *coi1*, на відміну від *jin1*, частково проявлялася стрес-протекторна дія донорів сірководню і оксиду азоту. Можливо, що транскрипційний фактор JIN1/MYC2 грає більш важливу роль в індукуванні солестійкості рослин арабідопсису екзогенними NO і H<sub>2</sub>S у порівнянні з білком COI1, оскільки він, ймовірно, залучений не тільки в реалізацію ефектів жасмонату, але і ряд інших сигнальних процесів. Як уже зазначалося, методами біоінформатики отримані дані про можливу роль генів сімейства MYC в передачі сигналів оксиду азоту (Palmieri et al., 2008). Транскрипційний фактор JIN1/MYC2 задіяний і в передачі сигналу АБК (Ton et al., 2009). При цьому NO і H<sub>2</sub>S можуть виступати у ролі посередників в реалізації ефектів АБК (Scuffi et al., 2014), але оксид азоту також здатний індукувати її синтез (Xing et al., 2004).

З іншого боку, є відомості, що вказують на можливість посилення сірководнем експресії гена COI1, що кодує білок-рецептор жасмонату (Li et al., 2017). Таким чином, цілком ймовірно, що деякі фізіологічні ефекти сірководню можуть реалізуватися за участю жасмонатного сигнального шляху. Як уже зазначалося, жасмонатний сигналінг, опосередкований білком COI1, також може брати участь у дії оксиду азоту на деякі фізіологічні процеси (наприклад, формування кореневої системи) (Barrera-Ortiz et al., 2018).

В цілому, отримані результати дозволяють говорити про залучення компонентів жасмонатного сигналінгу у реалізації протекторної дії екзогенних оксиду азоту і сірководню на рослини арабідопсису при сольовому стресі.

## 5.2. Вплив геміну на солестійкість рослин арабідопсису дикого типу і мутантів *coi1* та *jnl1*

Завданням наступних експериментів було порівняння функціонування ферментативної антиоксидантної і осмопротекторної систем арабідопсису дикого типу та мутантів *jnl1* і *coi1* за впливу донора монооксиду вуглецю геміну за умов сольового стресу.

У даній серії експериментів за впливу NaCl водний дефіцит тканин листків арабідопсису всіх трьох генотипів збільшувався більш ніж у два рази (рис. 5.5). Обробка рослин дикого типу донором CO геміном перед сольовим стресом помітно знижувала його прояв. В той же час у обох мутантів, дефектних за жасмонатним сигналінгом, цей ефект не проявлявся. Слід зазначити, що виникнення водного дефіциту у рослин при підвищенні концентрації солей в прикореневому розчині проявляється досить швидко і призводить до вторинних негативних наслідків, зокрема, до закривання продихів, обмеження надходження CO<sub>2</sub>, розвитку окисного стресу і пригнічення росту (Munns, 2002). Таким чином, зменшення водного дефіциту при сольовому стресі у рослин дикого типу під впливом донора CO свідчить про посилення розвитку адаптивних реакцій.

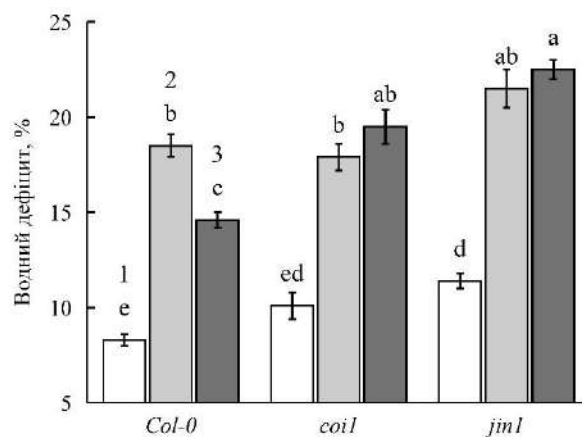


Рис. 5.5. Водний дефіцит листя арабідопсису під дією NaCl та геміну: 1 - контроль; 2 - NaCl (150 мМ); 3 - NaCl (150 мМ) + гемін (2 мкМ).

Через 2 доби після впливу 150 мМ NaCl вміст хлорофілів істотно знижувався у всіх трьох генотипів (табл. 5.2). Обробка геміном сприяла збереженню пулу хлорофілів у листках рослин дикого типу. У той же час при обробці донором СО мутантів *coi1* і *jin1* такий ефект не проявлявся.

Вміст каротиноїдів під впливом сольового стресу знижувався в листках рослин дикого типу і мутантів *coi1*, у рослин генотипу *jin1* цей ефект проявлявся на рівні тенденції (табл. 5.2). Обробка геміном призводила до вірогідного підвищення вмісту каротиноїдів у стресових умовах тільки у рослин Col-0. У мутантів, дефектних за жасмонатним сигналіном, цей ефект спостерігався лише на рівні більш-менш вираженої тенденції.

Таким чином, при сольовому стресі помітний позитивний вплив, що визначається за величиною водного дефіциту та вмістом фотосинтетичних пігментів, обробка донором СО чинила на рослини дикого типу, але не мутантів *coi1* і *jin1*.

Табл. 5.2. Вміст хлорофілу та каротиноїдів (мг/г сухої маси) у листках арабідопсису

Варіант	Хлорофіли <i>a + b</i>	Каротиноїди
Col-0		
Контроль	18,40 ± 0,29 <sup>a</sup>	2,49 ± 0,07 <sup>ab</sup>
NaCl (150 мМ)	13,63 ± 0,25 <sup>c</sup>	1,99 ± 0,06 <sup>b</sup>
NaCl (150 мМ) + гемін (2 мкМ)	14,90 ± 0,22 <sup>b</sup>	2,71 ± 0,09 <sup>a</sup>
<i>coi1</i>		
Контроль	19,21 ± 0,29 <sup>a</sup>	2,69 ± 0,09 <sup>a</sup>
NaCl (150 мМ)	13,36 ± 0,26 <sup>cd</sup>	2,00 ± 0,10 <sup>b</sup>
NaCl (150 мМ) + гемін (2 мкМ)	13,57 ± 0,26 <sup>c</sup>	2,55 ± 0,15 <sup>ab</sup>
<i>jin1</i>		
Контроль	19,08 ± 0,27 <sup>a</sup>	2,21 ± 0,09 <sup>b</sup>
NaCl (150 мМ)	11,61 ± 0,25 <sup>d</sup>	2,10 ± 0,10 <sup>b</sup>
NaCl (150 мМ) + гемін (2 мкМ)	12,23 ± 0,26 <sup>d</sup>	2,45 ± 0,12 <sup>ab</sup>

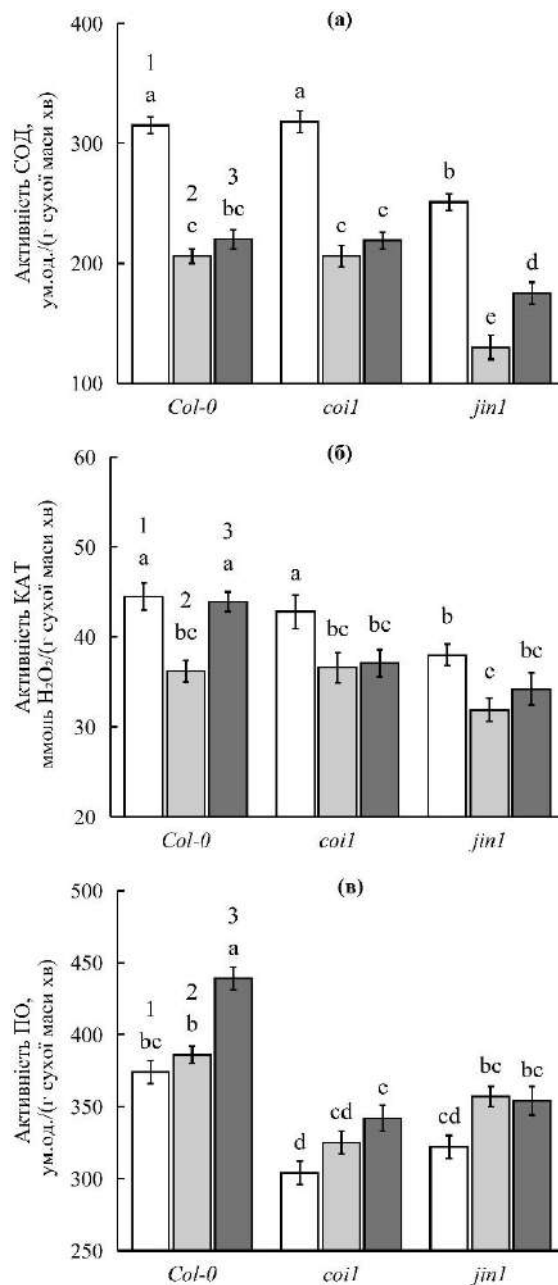


Рис. 5.6. Активність СОД (а), каталази (КАТ; б) та гваяколпероксидази (ПО; в) у листі арабідопсису під дією NaCl та геміну: 1 - контроль; 2 - NaCl (150 мМ); 3 - NaCl (150 мМ) + гемін (2 мкМ).

У подальших експериментах оцінювали вплив донора СО на стан ферментативної антиоксидантної системи арабідопсису в умовах сольового стресу. Активність СОД в контролі у мутантів *jin1* була нижчою, ніж у рослин дикого типу та генотипу *coil* (рис 5.6, а), що, ймовірно, обумовлено генетично і

узгоджується з результатами, отриманими в інших серіях експериментів. Інкубація рослин всіх трьох досліджуваних генотипів на середовищі з 150 мМ NaCl викликала зниження активності СОД (рис. 5.6, а). Обробка геміном достовірно не впливала на активність ферменту у рослин дикого типу та мутанта *coi1*. В той же час у рослин *jin1* при обробці донором СО відзначалося невелике, але вірогідне при  $P \leq 0,05$  підвищення активності СОД.

Активність каталази в листках рослин різних генотипів, вирощених у звичайних умовах, відрізнялася незначною мірою. Під впливом сольового стресу вона знижувалася у рослин всіх генотипів (рис. 5.6, б). Попередня інкубація рослин дикого типу в присутності геміну повністю усувала такий ефект сольового стресу у рослин дикого типу, але не мутантів *coi1* і *jin1*.

Активність гваяколпероксидази у звичайних умовах у рослин Col-0 була вищою, ніж у мутантів, дефектних за жасмонатним сигналінгом (рис. 5.6, в). Сольовий стрес не чинив істотного впливу на активність цього ферменту у всіх трьох генотипів. Обробка донором СО викликала підвищення активності гваяколпероксидази в умовах сольового стресу у рослин дикого типу, але не у мутантів, дефектних за генами жасмонатного сигналінгу.

За впливу 150 мМ NaCl у листках арабідопсису усіх трьох генотипів вміст проліну у листках зростав 3,5-4,0 рази (рис. 5.7, а). Попередня обробка геміном рослин дикого типу значно посилювала ефект накопичення проліну в умовах сольового стресу. У той же час у мутантів *coi1* і *jin1* вплив донора СО не викликав змін в накопиченні проліну при сольовому стресі (рис. 5.7, а).

Вміст цукрів в листі за звичайних умов у рослин дикого типу і мутантів *jin1* був практично однаковим, а у рослин *coi1* трохи вищим, хоча ця відмінність не була вірогідною при  $P \leq 0,05$  (рис. 5.7, б). Після сольового стресу відзначалося збільшення кількості цукрів у листках рослин всіх досліджуваних генотипів. Під впливом донора СО у рослин дикого типу посилювалося накопичення цукрів на тлі дії сольового стресу. У мутантів, дефектних за жасмонатним сигналінгом, подібного ефекту не спостерігалось (рис. 5.7, б).



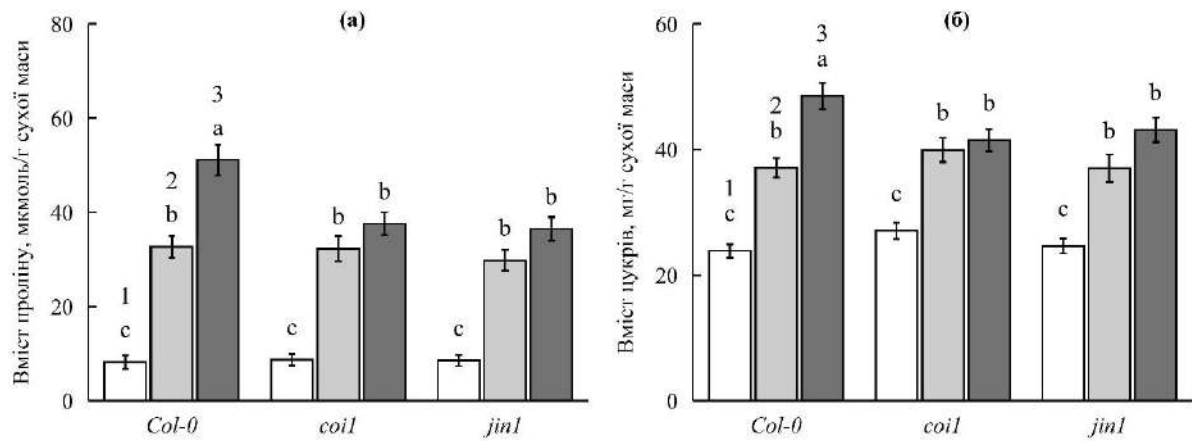


Рис. 5.7. Вміст проліну (а) та цукрів (б) у листках арабідопсису під дією NaCl та геміну: 1 - контроль; 2 - NaCl (150 мМ); 3 - NaCl (150 мМ) + гемін (2 мкМ).

Результати, що свідчать про посилення функціонування протекторних систем рослин арабідопсису дикого типу при їх обробці донором СО перед сольовим стресом, узгоджуються з рядом даних, отриманих для інших видів. Так, показано, що у рослин пшениці екзогенний СО при сольовому стресі посилював експресію гена  $\Delta^1$ -пірролін-5-карбоксилатсминтази і послаблював експресію гена проліндегідрогенази, що призводило до накопичення ендogenous проліну (He, He, 2018). У проростків пшениці при сильному сольовому стресі обробка водним розчином СО запобігала розвитку програмованої загибелі клітин коренів, знижувала активність НАДФН-оксидази і посилювала експресію гена Mn-СОД (Ling et al., 2009). Також встановлено, що обробка гематином викликала посилення накопичення проліну і цукрів, а також підвищення активності СОД, каталази, аскорбатпероксидази і глутатіонредуктази у *Cassia obtusifolia* в умовах сольового стресу (Zhang et al., 2012).

У наших експериментах підвищення активності СОД у рослин арабідопсису дикого типу і *coil* при сольовому стресі під впливом донора СО не відбувалося (рис. 5.6, а). Це може бути пов'язано з видовими особливостями

рослин і/або експериментальними умовами. Проте, обробка геміном викликала деяке підвищення активності СОД у мутантів *jin1*. Слід зазначити, що у даного генотипу при сольовому стресі відбувалося більш сильне падіння активності цього ферменту, ніж у рослин дикого типу та *coi1*. Не виключено, що екзогенний СО міг частково індукувати протекторні системи і у мутантів *jin1*, що опосередковано могло сприяти збереженню активності СОД. Цілком природно, що отримані нами результати не дають підстав виключати наявності шляхів передачі сигналів СО, не пов'язаних з компонентами жасмонатного сигналіngu. В цілому ж, виражений позитивний вплив обробки геміном проявлявся тільки у рослин арабідопсису дикого типу. Така обробка сприяла стабілізації активності каталази, підвищенню активності гваяколпероксидази і накопиченню проліну та цукрів (рис. 5.6, 5.7).

У той же час, у мутанта за геном, що кодує білок COI1, як і у рослин, дефектних за геном, що кодує один з основних транскрипційних факторів жасмонатного сигналіngu (JIN1/MYC2), під впливом геміну істотного підвищення солестійкості не відзначалося. Обробка таких рослин донором СО не викликала ефекту посилення роботи ферментативної антиоксидантної системи (рис. 5.6) і додаткового накопичення осмолітів (рис. 5.7) при сольовому стресі. Цей ефект донора СО щодо накопичення проліну і цукрів у рослин дикого типу проявлявся особливо помітно. Сумісні осмоліти пролін і цукру при сольовому стресі виконують мультифункціональну роль. Накопичуючись у великих кількостях, вони діють не тільки як осмоліти і мембрано-протекторні сполуки, але і як антиоксиданти, здатні зв'язувати вільні радикали (Kolupaev et al., 2019b). Їх накопичення у оброблених донором СО рослин арабідопсису дикого типу при сольовому стресі може компенсувати відсутність ефекту підвищення активності СОД (Sin'kevich et al., 2009; Radyukina et al., 2011), що спостерігалось в наших експериментах (рис. 5.6).

Таким чином, отримані результати вказують на залучення компонентів жасмонатного сигналіngu в реалізацію стрес-протекторних ефектів екзогенного монооксиду вуглецю. Безумовно, відмінності в реакції на дію донора СО у

рослин дикого типу і мутантів за жасмонатним сигналінгом не дають підстави для висновку про безпосередню участь білків COI1 і JIN1/MYC2 в передачі сигналу CO. Не виключено, що їх роль при дії екзогенного CO зумовлена здатністю цього газотрансмітера індукувати синтез жасмонової кислоти (Cheng et al., 2018). Такий ефект зареєстрований у рослин тютюну. Однак не можна виключити, що окремі білкові компоненти жасмонатного сигналінгу при дії CO регулюються не самою жасмоновою кислотою, а іншими сигнальними посередниками. Білок JIN1/MYC2 останнім часом розглядається у ролі своєрідного хаба в трансдукції сигналів не тільки жасмонату, а й АБК (Ton et al., 2009; Lackman et al., 2011), а також NO і H<sub>2</sub>S (див. п. 5.1).

Отже, зареєстроване в наших експериментах помітне нівелювання захисних реакцій, індукованих донором CO, у мутантів арабідопсису, дефектних по двох ключових білках жасмонатного сигналінгу, свідчить про залучення цього сигналінгу в реалізацію дії CO. Для пояснення механізмів участі жасмонатного сигналінгу в прояві фізіологічних ефектів CO у рослин при сольовому стресі необхідні спеціальні дослідження.

## Висновки до розділу 5

Донори NO і H<sub>2</sub>S чинили схожий позитивний вплив на солестійкість рослин дикого типу, що виражалося в зниженні під їх впливом водного дефіциту листя, зменшенні окислювальних пошкоджень, стабілізації проникності мембран і вмісту хлорофілу при дії 175 мМ NaCl. Також під впливом обробки NaHS і НПН при засоленні у рослин Col-0 підвищувалася активність супероксиддисмутази і каталази, але зменшувалося стрес-індуковане накопичення проліну. Попередня обробка мутантів *coi1* і *jin1* донорами NO і H<sub>2</sub>S не запобігала викликаному дією NaCl посиленню пероксидного окислення ліпідів, не сприяла зменшенню проникності мембран і збереженню пулу хлорофілів в стресових умовах. Також в обох мутантів, оброблених NaHS або НПН, не відзначалося підвищення активності СОД і каталази при дії солі.

Обробка донорами NO і H<sub>2</sub>S не чинила впливу на величину водного дефіциту і вміст проліну в листі мутанта *jin1*, та зменшувала прояв даних показників у мутанта *coil*.

Обробка 2 мкМ геміном пом'якшувала ефект сольового стресу у рослин дикого типу, але не у *coil* і *jin1*. Також під впливом донора CO відзначалася стабілізація вмісту фотосинтетичних пігментів в умовах сольового стресу у рослин Col-0, але не мутантів за жасмонатним сигналінгом. У рослин арабідопсису дикого типу, оброблених геміном, у відповідь на дію хлориду натрію накопичувалася більша кількість проліну і цукрів у порівнянні з рослинами генотипів *coil* і *jin1*. Обробка геміном не впливала на активність СОД, але стабілізувала активність каталази і підвищувала активність гваяколпероксидази в стресових умовах у рослин дикого типу.

Отримані результати вказують на залучення компонентів жасмонатного сигналінгу (білків COI1 і JIN1/MYC2) в реалізацію стрес-протекторної дії донорів сірководню, оксиду азоту та монооксиду вуглецю. Водночас механізми їх участі у процесах сигналінгу газотрансмітерів потребують спеціальних досліджень.

## УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Накопичення знань про роль газотрансмітерів у розвитку адаптивних реакцій рослин на дію стресорів останніми роками відбувається досить інтенсивно (Hancock, 2019; Kolupaev et al., 2019; Yoo et al., 2019). Біологічна активність газотрансмітерів зумовлена їх здатністю легко проникати через біомембрани, брати участь в регуляторних процесах як шляхом безпосереднього впливу на біомакромолекули (зокрема, на каталітичну активність ферментів), так і опосередковано – шляхом індукування змін вмісту інших сигнальних посередників.

Найменш дослідженим для рослинних об'єктів серед основних газотрансмітерів (NO, H<sub>2</sub>S, CO) є монооксид вуглецю. Зокрема, відкритим залишається питання про роль інших сигнальних посередників у реалізації його фізіологічних ефектів. Поодинокі дані, що були опубліковані на момент виконання нашої роботи, вказували на участь ключових сигнальних посередників – АФК, кальцію і оксиду азоту – у прояві різних впливів CO на рослинні об'єкти. Зокрема, є дані про посилення синтезу NO в замикаючих клітинах при індукуванні закривання продихів екзогенним CO (Cao et al., 2007). З іншого боку, встановлено, що донор NO може спричиняти посилення експресії гена гемоксигенази-1 і синтез CO (Santa-Cruz et al., 2010). Припускають, що мішенню прямого впливу CO можуть бути білки іонних каналів рослинних клітин, в тому числі кальцієвих каналів L-типу (Wilkinson, Kemp, 2011; Hsu et al., 2013b).

Проведені нами дослідження, принаймні в рамках використаної експериментальної моделі (етіольовані проростки пшениці), засвідчили участь іонів кальцію, АФК і оксиду азоту в індукованому дією донора CO розвитку теплостійкості. При цьому вдалося встановити окремі причинно-наслідкові зв'язки між змінами вмісту вказаних посередників за обробки коренів

проростків пшениці екзогенним монооксидом вуглецю, а також з'ясувати участь певних ферментних систем в генерації посередників.

Зокрема, було показано, що спричинюване донором СО транзиторне зростання вмісту NO у коренях проростків відбувалося за рахунок підвищення активності нітратредуктази. Поряд зі зростанням вмісту NO під дією донора СО було зафіксовано і тимчасове підвищення вмісту пероксиду водню в тканинах коренів, пов'язане з підйомом активності позаклітинної пероксидази. При цьому індуковані обробкою донором СО ефекти підвищення активності пероксидази і посилення утворення пероксиду водню нівелювалися під дією скавенджера NO РТЮ та інгібітора нітратредуктази вольфрмату натрію. Водночас підвищення активності нітратредуктази і вмісту NO в коренях не усувалося антиоксидантом ДМТС. Це свідчить про те, що у сигнальному ланцюгу, активованому СО, оксид азоту розташований попереду від пероксиду водню (схема 1). Водночас ефекти утворення NO і  $H_2O_2$ , активовані донором СО, виявилися залежними від кальцієвого гомеостазу, оскільки усувалися дією антагоністів кальцію (ЕГТА і неоміцину). Це вказує на роль кальцію в посиленні утворення інших посередників за дії на клітини коренів донора СО. Процеси, пов'язані з активацією сигнальної мережі, є необхідними для реалізації досліджуваних стрес-протекторних ефектів донора монооксиду вуглецю. Зокрема, встановлено усунення спричинюваного дією донора СО підвищення активності антиоксидантних ферментів і розвитку теплостійкості під впливом антагоністів кальцію, NO і АФК.

Безумовно, варто зауважити, що про вказаний розвиток подій (схема 1) можна досить однозначно говорити лише у рамках конкретної експериментальної моделі (у нашому випадку це корені інтактних етіольованих проростків пшениці). Сигнальні процеси при реалізації стрес-протекторного впливу СО на інші об'єкти можуть виявитися іншими.

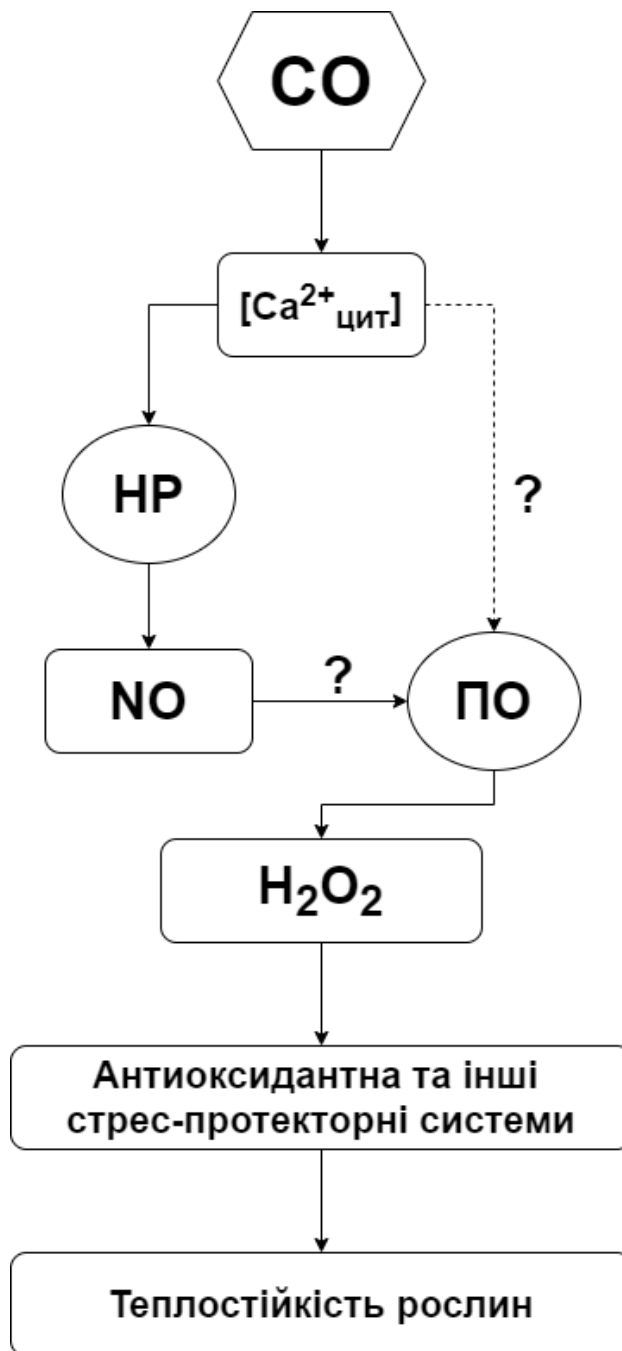


Схема 1. Сигнальні посередники в реалізації впливу екзогенного монооксиду вуглецю на теплостійкість рослин.

Ще одним питанням, що вивчалось в рамках нашої роботи, була участь газотрансмітерів у реалізації захисних ефектів фітогормонів за дії на рослини «стресових» фітогормонів – саліцилової кислоти і брасиностероїдів. Можлива роль сірководню як посередника у дії СК досліджена дуже слабо. Зокрема, єдиним раніше встановленим феноменом було підвищення вмісту сірководню у

пагонах проростків кукурудзи при індукуванні їх теплостійкості дією екзогенної СК (Li et al., 2015b). Водночас зв'язок між станом антиоксидантної системи і змінами ендogenous вмісту  $H_2S$  за дії на рослини СК на початок нашої роботи спеціально не досліджувався. Нами було показано транзиторне підвищення ендogenous вмісту сірководню у коренях проростків пшениці за обробки донором сірководню  $NaHS$  і подальше зростання в них активності СОД, каталази і гваколпероксидази. Зміни активності антиоксидантних ферментів, спричинювані дією екзогенної СК, не проявлялися в присутності інгібіторів синтезу сірководню (пірувату і гідроксиламіну). Так само вказані інгібітори усували ефект розвитку теплостійкості проростків, індукований СК. Водночас комбінована обробка проростків СК і донором сірководню спричиняла посилення впливу фітогормону на антиоксидантну систему коренів проростків і їх теплостійкість. Все це свідчить про роль сірководню як посередника у реалізації стрес-протекторної дії СК. Проте також добре відомо, що ефекти СК реалізуються з участю інших сигнальних посередників, зокрема, АФК і оксиду азоту (Карпец и др., 2016). Зважаючи на це, у подальшому доцільно дослідити зв'язки між цими посередниками і сірководнем при реалізації фізіологічної дії СК.

Газотрансмітери як сигнальні посередники, ймовірно, задіяні в трансдукції сигналів різних фітогормонів, зокрема, брасиностероїдів. Проте відомості щодо ролі газотрансмітерів у реалізації фізіологічних ефектів БС обмежуються тільки оксидом азоту. Отримано експериментальні свідчення участі  $NO$  в процесах індукування БС посухостійкості кукурудзи (Zhang et al., 2011) і перцю (Kaaya et al., 2019), теплостійкості ізольованих колеоптилів пшениці (Karpets, Kolupaev, 2018). При цьому однак малодослідженою залишається можливість посилення дії БС при комбінуванні обробок рослин з донорами оксиду азоту. Одержані нами результати засвідчили таку можливість при індукуванні теплостійкості проростків пшениці. Зокрема, показано, що при використанні 24-ЕБЛ і донора оксиду азоту НПН в низьких концентраціях (20 нМ і 200 мкМ, відповідно) відзначалося більш істотне підвищення активності СОД, зменшення



окиснювальних пошкоджень тканин і зростання виживаності проростків при тепловому стресі, ніж за дії кожної зі сполук окремо. Проте, при використанні цих сполук у високих концентраціях спостерігалось істотне порушення окиснювально-відновної рівноваги (зростання вмісту пероксиду водню і МДА) і зниження теплостійкості. Ймовірно, вплив БС і донора оксиду азоту на теплостійкість проростків пшениці зумовлений змінами редокс-гомеостазу, які, залежно від ступеня, можуть або підсилювати антиоксидантну систему, або, навпаки, спричиняти розвиток окиснювальних пошкоджень.

Отже, газотрансмітери можуть виступати у ролі посередників при реалізації фізіологічних ефектів рослинних гормонів. Ще один аспект функціональної взаємодії газотрансмітерів і фітогормонів пов'язаний з можливою участю білкових компонентів гормонального сигналіngu у механізмах дії газотрансмітерів. Зважаючи на це, одним із завдань роботи було дослідження ймовірної участі компонентів жасмонатного сигналіngu в трансдукції сигналів NO, CO і H<sub>2</sub>S. Відомо, що транскрипційний фактор JIN1/MYC2 контролює експресію генів, індукованих не тільки жасмонатом, а й абсцизовою кислотою і, ймовірно, іншими чинниками (Ton et al., 2009; Lackman et al., 2011). Цей білок розглядається як один з вузлових в стресовому сигналіngu, зокрема, при розвитку захисних реакцій рослин на посуху і засолення (Ton et al., 2009). Як зазначалося, на підставі даних, отриманих методами біоінформатики, було зроблено висновок про участь генів сімейства MYC в трансдукції сигналів NO (Palmieri et al., 2008). На ймовірну роль компонентів жасмонатного сигналіngu і (або) самої жасмонової кислоти в реалізації фізіологічних ефектів оксиду азоту вказує, зокрема, і відсутність впливу екзогенного NO на архітектуру коренів мутантів арабідопсису *coi1* (Barrera-Ortiz et al., 2018).

Водночас молекулярно-генетичними методами отримані дані, що вказують на можливість впливу іншого газотрансмітера – сірководню – на експресію гена, що кодує білок-рецептор жасмонату COI1 (Li et al., 2017). Зрештою, на момент виконання наших досліджень було відомо, що за дії

гіпертермії на рослини тютюну відбувалося посилення синтезу монооксиду вуглецю, що, в свою чергу, посилювало синтез жасмонової кислоти. В результаті цього активізувався транскрипційний фактор жасмонатного сигналіngu NtMYC2a (Cheng et al., 2018). Таким чином, окремі дані літератури побічно свідчать про участь білкових компонентів жасмонатного сигналіngu в реалізації фізіологічних ефектів різних газотрансмітерів.

У наших дослідженнях на одній моделі (рослинах арабідопсису дикого типу – Col-0) показано підвищення солестійкості дією донорів трьох ключових газотрансмітерів – NO, H<sub>2</sub>S, CO. Це виявлялося у збереженні рослинами в умовах сольового стресу пулу хлорофілів і каротиноїдів та зменшенні водного дефіциту, спричинюваного дією NaCl. Також під впливом обробки NaHS, НПН и геміном у рослин Col-0 підвищувалася активність антиоксидантних ферментів. Водночас у мутантів, дефектних за жасмонатним сигналіngом – *jin1* і *coi1*, подібний вплив донорів NO, H<sub>2</sub>S і CO майже не проявлявся.

Ці результати можуть вказувати на залучення компонентів жасмонатного сигналіngu в реалізацію протекторних ефектів оксиду азоту, сірководню та монооксиду вуглецю при сольовому стресі (схема 2). Безумовно, відмінності в реакції на дію донорів газотрансмітерів у рослин дикого типу і мутантів за жасмонатним сигналіngом не дають підстави для висновку про безпосередню участь білка JIN1/MYC2 в передачі сигналів цих сполук. Для більш певних висновків про механізми участі білків жасмонатного сигналіngu в реалізації дії NO, H<sub>2</sub>S і CO необхідні спеціальні дослідження. Не виключено, що роль білка JIN1/MYC2 за дії екзогенних газотрансмітерів зумовлена їх здатністю індукувати синтез жасмонової кислоти у рослин. Так само можливо, що окремі білкові компоненти жасмонатного сигналіngu за дії газотрансмітерів регулюються не самою жасмоновою кислотою, а іншими сигнальними посередниками. Проте, так чи інакше, отримані результати свідчать про залучення компонентів жасмонатного сигналіngu у процеси підвищення солестійкості рослин дією газотрансмітерів, зокрема, пов'язані з підтриманням про-/антиоксидантної рівноваги та водного балансу. На підставі даних

літератури (Kolupaev, Yastreb, 2021) і отриманих нами результатів можна припустити такий ймовірний розвиток подій, спрямованих на формування адаптивних реакцій за участю газотрансмітерів і компонентів жасмонатного сигналіngu (схема 2): під впливом стресорів або донорів газотрансмітерів відбувається підвищення ендogenous вмісту NO, H<sub>2</sub>S і CO.

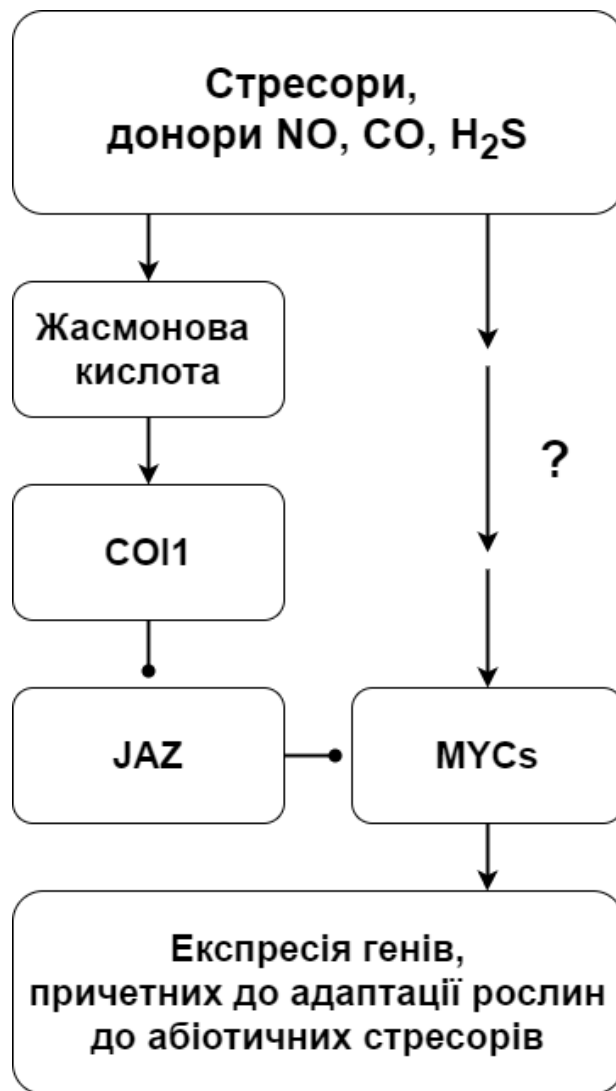


Схема 2. Ймовірне залучення жасмонатного сигналіngu в реалізацію стрес-протекторних ефектів газотрансмітерів.

Ці газотрансмітери можуть індукувати синтез жасмонової кислоти. Сигнали NO, H<sub>2</sub>S і CO можуть передаватися в генетичний апарат за участю ключових білків жасмонатного сигналіngu COI1 і MYC. При цьому білки

родини МҮС можуть виконувати роль «хаба» в передачі сигналів, які індукують гени, що забезпечують розвиток стійкості рослин до дії засолення і ймовірно інших стресорів.

## ВИСНОВКИ

Дисертаційна робота істотно доповнює фундаментальні знання про роль сигнальних молекул-газотрансмітерів (оксиду азоту, сірководню, монооксиду вуглецю) та їх функціональну взаємодію зі стресовими фітогормонами (саліциловою і жасмоновою кислотами та брасиностероїдами) при адаптації рослин до дії несприятливих абіотичних чинників.

1. Вперше встановлено ефект підвищення теплостійкості інтактних проростків пшениці під впливом донора СО геміну. Він супроводжувався підвищенням активності антиоксидантних ферментів (супероксиддисмутази, каталази, гваяколпероксидази) та зменшенням окиснювальних пошкоджень біомембран.

2. Доведено участь іонів кальцію у реалізації протекторної дії донора СО на рослини за умов теплового стресу. Встановлено, що як хелатор позаклітинного кальцію (ЕГТА), так і інгібітор надходження кальцію в цитозоль з внутрішньоклітинних компартментів (неоміцин) усували спричинювані геміном ефекти підвищення теплостійкості проростків пшениці і зростання активності антиоксидантних ферментів.

3. Показано значення посилення утворення пероксиду водню в індукуванні теплостійкості проростків пшениці. Інгібіторними методами та шляхом аналізу динаміки процесів встановлено, що цей ефект є наслідком підвищення активності позаклітинної пероксидази.

4. Із застосуванням скавенджера NO РТЮ та інгібіторів ферментів його синтезу встановлена роль оксиду азоту у передачі сигналу монооксиду вуглецю. Доведено, що NO в сигнальній мережі, яка активується під дією екзогенного СО, розташований вище від пероксиду водню, на що вказує динаміка вмісту цих посередників у коренях пшениці при їх обробці геміном та результати інгібіторного аналізу. Показано, що основною причиною

підвищення вмісту NO в клітинах коренів проростків пшениці за дії донора CO є кальційзалежне підвищення активності нітратредуктази.

5. Доведено значення сірководню у реалізації стрес-протекторних ефектів саліцилової кислоти на проростки пшениці за впливу гіпертермії. Показано транзиторне збільшення вмісту H<sub>2</sub>S у коренях під дією екзогенної саліцилової кислоти. Також обробка СК викликала істотне підвищення активності супероксиддисмутази і каталази, та зменшувала пошкодження біомембран. Вказані ефекти усувалися інгібіторами синтезу сірководню та підсилювалися при обробці проростків комбінацією СК і донора H<sub>2</sub>S гідросульфїду натрію.

6. Показана можливість посилення стрес-протекторної дії на рослини брасиностероїду у комбінації з донором NO. Встановлено, що комбінована обробка проростків пшениці 24-ЕБЛ і донором оксиду азоту НПН у низьких концентраціях викликала більш істотне підвищення теплостійкості проростків пшениці порівняно з обробкою кожною сполукою окремо. Водночас при збільшенні концентрацій обох сполук спостерігалось зменшення їх стрес-протекторних ефектів, що може бути зумовлено розвитком окиснювального стресу.

7. З використанням мутантних ліній арабідопсису *coil* та *jin1* показана участь компонентів жасмонатного сигналінгу – білків COI1 (рецептор жасмонату) і JIN1/MYC2 (ключовий транскрипційний фактор) – у реалізації захисної дії екзогенних газотрансмітерів (NO і H<sub>2</sub>S і CO) за умов сольового стресу. Показано, що всі три досліджувані газотрансмітери чинили помітний позитивний вплив на стан антиоксидантної системи, водний баланс, вміст фотосинтетичних пігментів лише у рослин дикого типу (Col-0). Водночас стрес-протекторний вплив донорів NO, H<sub>2</sub>S і CO на рослини *coil* та *jin1* виявлявся значно меншою мірою.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- Васюкова, Н. И., & Озерецковская, О. Л. (2007). Индуцированная устойчивость растений и салициловая кислота (обзор). *Прикл. биохимия и микробиология*, 43(4), 405–411.
- Веденичова Н.П., Косаківська І.В. (2020) Цитокініни в онтогенезі й адаптації злаків. *Фізіологія рослин і генетика*, 52(1), 3–30.
- Газарян, И. Г., Хушпульян, Д. М. & Тишков В. И. (2006). Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений. *Успехи биол. химии.*, 46, 303–322.
- Галеева, Е. И., Трифонова, Т. В., Пономарева, А. А., Викторова, Л. В., & Минибаева, Ф. В. (2012). Нитратредуктаза листьев *Triticum aestivum*: регуляция активности и возможная роль в образовании оксида азота. *Биохимия*, 77, 512.
- Гончарова Э. А. (2005). *Водный статус культурных растений и его диагностика*. В. А. Драгавцева (ред.). СПб.: ВИР.
- Евдокимова, О. В., Кабашникова, Л. Ф., & Савченко, Г. Е. (2014). Содержание салициловой кислоты и активных форм кислорода в листьях ячменя (*Hordeum vulgare*) при обработке салицилатами. *Весті НАН Беларусі, сер. біял. навук.* 3, 57–62.
- Ефимова, М. В., Мухаматдинова, Е. А., Ковтун, И. С., Кабил, Ф., Медведева, Ю. В., & Кузнецов, В. В. (2019). Жасмоновая кислота повышает устойчивость растений картофеля в культуре *in vitro* к хлоридному засолению. *Доклады Академии наук*, 488(6), 685–689
- Игнатенко, А. А., Таланова, В. В., Репкина, Н. С., & Титов, А. Ф. (2020). Влияние метилжасмоната на устойчивость растений огурца, подвергнутых действию низкой повреждающей температуры. *Труды Карельского научного центра РАН*, 3, 121–129.

- Карпец, Ю. В., Колупаев, Ю. Е., & Косаковская, И. В. (2016). Оксид азота и пероксид водорода как сигнальные посредники при индуцировании теплоустойчивости проростков пшеницы экзогенными жасмоновой и салициловой кислотами. *Физиология растений и генетика*, 48(2), 158–166.
- Колупаев, Ю. Е., Карпец, Ю. В., & Ястреб, Т. О. (2013). Колеоптили пшеницы как модельный объект для исследования стресс-протекторного действия экзогенных соединений. *Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія*, 1(28), 103–108.
- Колупаев, Ю. Е., Фирсова, Е. Н., & Ястреб, Т. О. (2016). Сероводород у растений: участие в клеточном сигналинге и адаптации к стрессовым факторам. *Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія*, 3(39), 6–17
- Колупаев, Ю. Є., & Косаківська, І. В. (2008). Роль сигнальних систем і фітогормонів в реалізації стресових реакцій рослин. *Укр. ботан. журн.*, 65(3), 418–430.
- Кравець, В. С., Дерев'янчук, М. В., & Хрипач, В. О. (2017). *Брасиностероїди у регуляції метаболізму рослин*. Луцьк: Терен.
- Крутецкая, З. И., & Лебедев, О. Е. (2001). Механизмы  $\text{Ca}^{2+}$  сигнализации в клетках. *Цитология*, 43(1), 5–32.
- Кузнецов, Вл. В., & Шевякова, Н. И. (1999). Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция. *Физиология растений*, 46, 321.
- Кулаева, О. Н., Селиванкина, С. Ю., Романенко, Е. Г., Николаева, М. К., & Ничипорович, А. А // Физиология растений. 1979. Т. 26 № 5. С. 1016–1028.
- Савченко, Т. В., Застрижная, О. М., & Климов, В. В. (2014). Оксипирины и устойчивость растений к абиотическим стрессам. *Биохимия*, 79(4), 458–475.
- Семенова, С. Б. (2020). Принципы формирования кальциевого сигнала в клетках эукариот. *Цитология*, 62(9), 611–622.



- Титов, А. Ф., & Таланова, В. В. (2009). *Устойчивость растений и фитогормоны*. Петрозаводск.
- Шакирова, Ф. М. (2001). *Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция*. Уфа: Гилем.
- Шклярєвський, М. А., Тарабан, Д. А., Павлов, Ю. П., & Карпець, Ю. В. (2019). Індукування неспецифічної стійкості сіянців сосни звичайної дією 24-епібрасиноліду. *Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія*, 3(48), 75–86.
- Шлык, А. А. (1971). Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев. О. А. Павлинова (ред.), *Биохимические методы в физиологии растений*. М.: Наука.
- Шорнинг, Б. Ю., Смирнова, Е. Г., Ягужинский, Л. С., & Ванюшин, Б. Ф. (2000). Необходимость образования супероксида для развития этиолированных проростков пшеницы. *Биохимия*, 65(12), 1612–1618.
- Abouelsaad, I., & Renault, S. (2018). Enhanced oxidative stress in the jasmonic acid-deficient tomato mutant def-1 exposed to NaCl stress. *J. Plant Physiol.*, 226, 136–144.
- Agrawal, G. K., Tamogami, S., Han, O., Iwahashie, H., & Rakwal, R. (2004). Rice octadecanoid pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 317, 1–15.
- Alavi, S. M. N., Arvin, M. J., & Kalantari, K. M. (2014). Salicylic acid and nitric oxide alleviate osmotic stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *J. Plant Interact.*, 9(1), 683–688.
- Ali, M. S., & Baek, K.-H. (2020). Jasmonic Acid Signaling Pathway in Response to Abiotic Stresses in Plants. *Int. J. Mol. Sci.*, 21(2), Art. 621. <https://doi.org/10.3390/ijms21020621>
- Alscher, R. G., Erturk, N., & Heath, L. S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.*, 53, 1331.
- Arora, D., & Bhatla, S. C. (2015). Nitric oxide triggers a concentration-dependent differential modulation of superoxide dismutase (FeSOD and Cu/ZnSOD)

- activity in sunflower seedling roots and cotyledons as an early and long. *Plant Signaling and Behavior*, *10*, e1071753.
- 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 Research*, *50*, 291–303.
- Ashraf, M. A., Akbar, A., Askari, S.H., Iqbal, M., Rasheed, R., & Hussain, I. (2018). Recent advances in abiotic stress tolerance of plants through chemical priming: an overview. In *Advances in Seed Priming* (pp 51–79). Singapore: Springer.
- Astier, J., & Lindermayr, C. (2012). Nitric oxide-dependent posttranslational modification in plants: an update. *Int J Mol Sci*, *13*, 15193–15208.
- Bai, X., Chen, J., Kong, X., Todd, C. D., Yang, Y., Hu, X., & Li, D.Z. (2012). Carbon monoxide enhances the chilling tolerance of recalcitrant *Baccaurea ramiflora* seeds via nitric oxide-mediated glutathione homeostasis. *Free Radical Biol. Med.*, *53*, 710–720.
- 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
- Bakardjieva, N. T., Izvorska, N. D., & Hristova, N. (1987). Influence of Ca<sup>2+</sup> on the activity and release of peroxidase from *Tobacco callus* tissues. *Dokl. Bulg. AN*, *40*(8), 84–88.
- Banerjee, A., Tripathi, D. K., & Roychoudhury, A. (2018). Hydrogen sulphide trapeze: Environmental stress amelioration and phytohormone crosstalk. *Plant Physiol Biochem.*, *132*, 46–53.
- Barrera-Ortiz, S., Garnica-Vergara, A., Esparza-Reynoso, S., García-Cárdenas, E., Raya-González, J., Ruiz-Herrera, L. F., & López-Bucio, J. (2018). Jasmonic acid-ethylene crosstalk via ETHYLENE INSENSITIVE 2 reprograms *Arabidopsis* root system architecture through nitric oxide accumulation. *J. Plant Growth Regul.*, *37*, 438.
- Bartoli, C. G., Casalongueb, C. A., Simontacchia, M., Marquez-Garciac, B., & Foyer, C. H. (2013). Interactions between hormone and redox signalling pathways in

- the control of growth and cross tolerance to stress. *Environ. Exp. Bot.*, *94*, 73–88.
- Bates, L. S., Walden, R. P., & Tear, G. D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil*, *39*, 205–210.
- Baudouin, E. (2011). The language of nitric oxide signaling. *Plant Biol (Stuttg.)*, *13*(2), 233–242.
- Bolwell, G. P., & Wojtaszek, P. (1997). Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence - a broad perspective. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, *51*(6), 347–366. doi:10.1006/pmpp.1997.0129
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, *72*, 248–254.
- Brandt, B., Munemasa, S., Wang, C., Nguyen, D., Yong, T., Yang, P. G., ... Schroeder, J. I. (2015). Calcium specificity signaling mechanisms in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis* guard cells. *eLife*, *4*. doi:10.7554/eLife.03599
- Brown, G. C. (1995). Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase. *FEBS Letters*, *369*, 136–139.
- Bürstenbinder, K., Möller, B., Plötner, R., Stamm, G., Hause, G., Mitra, D., & Abel, S. (2017). The IQD family of calmodulin-binding proteins links calcium signaling to microtubules, membrane subdomains, and the nucleus. *Plant Physiology*, *173*, 1692–1708.
- Cao, Z., Huang, B., Wang, Q., Xuan, W., Ling, T., Zhang, B., ... Shen, W. (2007). Involvement of carbon monoxide produced by heme oxygenase in ABA-induced stomatal closure in *Vicia faba* and its proposed signal transduction pathway. *Chin. Sci. Bull.*, *52*(17), 2365–2373.
- Carballal, S., Trujillo, M., Cuevasanta, E., Bartesaghi, S., Möller, M. N., Folkes, L. K., ... Alvarez, B. (2011). Reactivity of hydrogen sulfide with peroxynitrite and other oxidants of biological interest. *Free Radic Biol Med*, *50*, 196–205.

- Chasov, A. V., & Minibayeva, F. V. (2014). Methodological approaches for studying apoplastic redox activity: 2. Regulation of peroxidase activity. *Russ J Plant Physiol*, *61*, 626–633. <https://doi.org/10.1134/S1021443714050045>
- Chasov, A. V., Alekseeva, V. Y., Kolesnikov, O. P., & Minibayeva F. V. (2010). Activation of extracellular peroxidase of wheat roots under the action of xenobiotics. *Appl. Biochem. Microbiol.*, *46*(4), 431–437. doi: 10.1134/S0003683810040125.
- Chen, J., Shang, Y. T., Wang, W. H., Chen, X. Y., He, E. M., Zheng, H. L., & Shangguan, Z. (2016). Hydrogen Sulfide-Mediated Polyamines and Sugar Changes Are Involved in Hydrogen Sulfide-Induced Drought Tolerance in *Spinacia oleracea* Seedlings. *Front. Plant Sci.*, *7*, 1173. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01173>
- Chen, J., Wang, W. H., Wu, F. H., He, E. M., Liu, X., Shangguan, Z. P., & Zheng, H. L. (2015). Hydrogen sulfide enhances salt tolerance through nitric oxide-mediated maintenance of ion homeostasis in barley seedling roots. *Sci. Rep.*, *5*, 12516. doi:10.1038/srep12516
- Chen, Q., Gong, C., Ju, X., Zhu, Z., Shen, W., Shen, Z., & Cui, J. (2018). Hemin through the heme oxygenase 1/ferrous iron, carbon monoxide system involved in zinc tolerance in *Oryza Sativa* L. *J. Plant Growth Regul.*, *37*, 947–957. doi: [org/10.1007/s00344-018-9793-z](https://doi.org/10.1007/s00344-018-9793-z)
- Chen, X., Chen, Q., Zhang, X., Li, R., Jia, Y., Ef, A. A., ... Hu, X. (2016). Hydrogen sulfide mediates nicotine biosynthesis in tobacco (*Nicotiana tabacum*) under high temperature conditions. *Plant Physiol Biochem*, *104*, 174–179.
- Chen, Y., Wang, M., Hu, L., Liao, W., Dawuda, M. M., & Li, C. (2017). Carbon monoxide is involved in hydrogen gas-induced adventitious root development in cucumber under simulated drought stress. *Front Plant Sci.*, *8*, 128. doi: 10.3389/fpls.2017.00128
- Chen, Z., Zheng, Z., Huang, J., Laia, Z., & Fana, B. (2009). Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signal. Behav.*, *4*, 493–496.

- Cheng, T., Hu, L., Wang, P., Yang, X., Peng, Y., Lu, Y., ... Shi, J. (2018). Carbon monoxide potentiates high temperature-induced nicotine biosynthesis in tobacco. *Int J Mol Sci.*, *19*, 188. doi: 10.3390/ijms19010188
- Christou, A., Manganaris, G. A., Papadopoulos, I., & Fotopoulos, V. (2013). Hydrogen sulfide induces systemic tolerance to salinity and non-ionic osmotic stress in strawberry plants through modification of reactive species biosynthesis and transcriptional regulation of multiple defence pathways. *J Exp Bot*, *64*, 1953–1966.
- Chung, Y., & Choe, S. (2013). The regulation of brassinosteroid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Critical Rev. Plant Sci.*, *32*, 396–410.
- Cooper, C. E. (1999). Nitric oxide and iron proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1411*, 290–309.
- Corpas, F. J., & Barroso, J. B. (2017). Nitric oxide synthase-like activity in higher plants. *Nitric Oxide*, *68*, 5–6. doi: 10.1016/j.niox.2016.10.009
- Corpas, F. J., Barroso, J. B., González-Gordo, S., Muñoz-Vargas, M. A., & Palma, J. M. (2019a). Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S): A novel component in *Arabidopsis* peroxisomes which triggers catalase inhibition. *J Integr Plant Biol*, *61*, 871–883.
- Corpas, F. J., González-Gordo, S., Canas, A., & Palma, J. M. (2019b). Nitric oxide and hydrogen sulfide in plants: which comes first? *J. Exp. Bot.*, *70*(17), 4391–4404.
- Cui, J. X., Zhou, Y. H., Ding, J. G., Xia, X. J., Shi, K., Chen, S.C., ... 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
- Cui, W. T., Qi, F., Zhang, Y. H., Cao, H., Zhang, J., Wang, R., & Shen W. (2015). Methane-rich water induces cucumber adventitious rooting through heme oxygenase1/carbon monoxide and Ca<sup>2+</sup> pathways. *Plant Cell Rep.*, *34*, 435–445.

- da-Silva, C. J., & Modolo, L. V. (2018). Hydrogen sulfide: a new endogenous player in an old mechanism of plant tolerance to high salinity. *Acta Botanica Brasiliica*, *32*, 150–160.
- Dekker, J., & Hargrove, M. (2002). Weedy adaptation in *Setaria* spp. V. Effects of gaseous environment on giant foxtail (*Setaria faberii*) (Poaceae) seed germination. *Amer. J. Bot.*, *89*, 410–416.
- Demidchik, V. (2012). Reactive oxygen species and oxidative stress in plants. In S. Shabala (Ed.), *Plant Stress Physiology* (pp. 24-58). CAB International. doi: 10.1079/9781845939953.0024.
- Demidchik, V., & Shabala, S. (2017). Mechanisms of cytosolic calcium elevation in plants: the role of ion channels, calcium extrusion systems and NADPH oxidase-mediated ‘ROS-Ca<sup>2+</sup> Hub’. *Functional Plant Biology*. doi: 10.1071/FP16420
- Du, H., Liu, H., & Xiong, L. (2013). Endogenous auxin and jasmonic acid levels are differentially modulated by abiotic stresses in rice. *Front. Plant Sci.*, *4*, 397. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00397>
- Efimova, M. V., Savchuk, A. L., Hasan, J. 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. <https://doi.org/10.1134/S1021443714060053>
- Esim, N., & Atici, Ö. (2015). Effects of exogenous nitric oxide and salicylic acid on chilling-induced oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum*). *Front. Life Sci.*, *8*(2), 124–130.
- Fang, H. H., Pei, Y. X., Tian, B. H., Zhang, L. P., Qiao, Z. J., & Liu, Z. Q. (2014). Ca<sup>2+</sup> participates in H<sub>2</sub>S induced Cr<sup>6+</sup> tolerance in *Setaria italica*. *Chinese J Cell Biol*, *36*, 758–765.
- Fang, H., Liu, Z., Long, Y., Liang, Y., Jin, Z., Zhang, L., ... Pei, Y. (2017). The Ca<sup>2+</sup>/calmodulin2-binding transcription factor TGA3 elevates LCD expression and H<sub>2</sub>S production to bolster Cr<sup>6+</sup> tolerance in Arabidopsis. *Plant J.*, *91*(6) 1038–1050.

- 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
- Farnese, F. S., Menezes-Silva, P. E., Gusman, G. S., & Oliveira, J. A. (2016). When bad guys become good ones: the key role of reactive oxygen species and nitric oxide in the plant responses to abiotic stress. *Front. Plant Sci.*, *7*, 471. doi: 10.3389/fpls.2016.00471
- 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*, 333–338. <https://doi.org/10.1134/S1021443712030065>
- Fonseca, S., Chini, A., Hamberg, M., Adie, B., Porzel, A., Kramell, R., ... Solano, R. (2009). (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nat. Chem. Biol.*, *5*(5), 344–350.
- Ford, P. C. (2010). Reactions of NO and nitrite with heme models and proteins. *Inorganic Chemistry*, *49*, 6226–6239.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2009). Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid. Redox Signal.*, *11*, 861–906.
- Freschi, L. (2013). Nitric oxide and phytohormone interactions: current status and perspectives. *Frontiers in Plant Science*, *4*, 398. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00398>.
- Fu, P. N., Wang, W. J., Hou, L. X., & Liu, X. (2013). Hydrogen sulfide is involved in the chilling stress response in *Vitis vinifera* L. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, *82*, 295–302.
- Gao, H., Jia, Y., Guo, S., Lv, G., Wang, T., & Juan, L. (2011). Exogenous calcium affects nitrogen metabolism in root-zone hypoxia-stressed muskmelon roots and enhances short-term hypoxia tolerance. *J. Plant Physiol.*, *168*, 1217.
- Gao, Q.-F., Gu, L.-L., Wang, H.-Q., Fei, C.-F., Fang, X., Hussain, J., ... Wang, Y.-F. (2016). Cyclic nucleotide-gated channel 18 is an essential Ca<sup>2+</sup> channel in

- pollen tube tips for pollen tube guidance to ovules in *Arabidopsis*. *PNAS*, *113*, 3096–3101. doi:10.1073/pnas
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.*, *48*, 909–930.
- Glyan'ko, A. K., & Ischenko, A. A. (2010). Structural and functional characteristics of plant NADPH oxidase: a review. *Appl. Biochem. Microbiol.*, *46*(5), 463–471. doi: 10.1134/S0003683810050017
- Guo, H., Xiao, T., Zhou, H., Xie, Y., & Shen, W. (2016). Hydrogen sulfide: a versatile regulator of environmental stress in plants. *Acta Physiol Plant*, *38*, 16. doi:10.1007/s11738-015-2038-x
- Gupta, K. J., & Kaiser, W. M. (2010). Production and scavenging of nitric oxide by barley root mitochondria. *Plant Cell Physiol.*, *51*(4), 576–584. doi: 10.1093/pcp/pcq022
- Gupta, K. J., Hancock, J. T., Petrivalsky, M., Kolbert, Z., Lindermayr, C., Durner, J., ... Loake, G. J. (2020). Recommendations on terminology and experimental best practice associated with plant nitric oxide research. *New Phytol.*, *225*, 1828–1834.
- Gupta, P., & Seth, C. S. (2020). Interactive role of exogenous 24-Epibrassinolide and endogenous NO in *Brassica juncea* L. under salinity stress: Evidence for NR-dependent NO biosynthesis. *Nitric Oxide*, *97*, 33–47. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2020.01.014>
- Gupta, P., Srivastava, S., & Seth, C. S. (2017). 24-Epibrassinolide and sodium nitroprusside alleviate the salinity stress in *Brassica juncea* L. cv. Varuna through cross talk among proline, nitrogen metabolism and abscisic acid. *Plant Soil*, *411*, 483–498.
- Hamayun, M., Khan, A. L., Ahmad, N., Lee, I. J., Khan, S. A., & Shinwari, Z. K. (2010). Effect of polyethylene glycol induced drought stress on physiohormonal attributes of soybean. *Pak. J. Bot.*, *42*(2), 977–986.
- Hancock, J. T. (2019). Hydrogen sulfide and environmental stresses. *Environ Exp Bot*, *161*, 50–56.



- Hancock, J. T., & Whiteman, M. (2014). Hydrogen sulfide and cell signaling: Team player or referee? *Plant Physiol Biochem*, *78*, 37–42.
- Hartung, W., Wilkinson, S., & Davies, W. J. (1998). Factors that regulate abscisic acid concentrations at the primary site of action at the guard cell. *J. Exp. Bot.*, *49*, 361–367.
- Hashempour, A., Ghasemnezhad, M., Fotouhi Ghazvini, R., & Sohani M. M. (2014). The physiological and biochemical responses to freezing stress of olive plants treated with salicylic acid. *Russ. J. Plant Physiol.*, *61*(4), 443–450.
- He, H., & He, L. (2014). The role of carbon monoxide signaling in the responses of plants to abiotic stresses. *Nitric Oxide*, *42*, 40–43.
- He, H., & He, L. F. (2018). Regulation of gaseous signaling molecules on proline metabolism in plants. *Plant Cell Reports.*, *37*, 387–392.
- Hepler, P. K. (2016). The cytoskeleton and its regulation by calcium and protons. *Plant Physiology*, *170*, 3–22.
- Hepler, P. K., Kunkel, J. G., Rounds, C. M., & Winship, L. J. (2012). Calcium entry into pollen tubes. *Trends in Plant Science*, *17*, 33–38.
- Honda, K., Yamada, N., Yoshida, R., Ihara, H., Sawa, T., Akaike, T., & Iwai, S. (2015). 8-Mercapto-Cyclic GMP mediates hydrogen sulfide-induced stomatal closure in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol*, *56*, 1481–1489.
- Hsu, Y. Y., Chao, Y. Y., & Kao, C. H. (2013a). Methyl jasmonate-induced lateral root formation in rice: The role of heme oxygenase and calcium. *J. Plant Physiol.*, *170*(1), 63–69. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2012.08.015>
- Hsu, Y. Y., Chao, Y. Y., & Kao, C. H. (2013b). Cobalt chloride-induced lateral root formation in rice: the role of heme oxygenase. *J. Plant Physiol.*, *170*(12), 1075–1081. doi: 10.1016/j.jplph.2013.03.004
- Hu, Y., Jiang, L., Wang, F., & Yu, D. (2013). Jasmonate Regulates the INDUCER OF CBF EXPRESSION–C-REPEAT BINDING FACTOR/DRE BINDING FACTOR1 Cascade and Freezing Tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell*, *25*(8), 2907–2924.

- Hu, Y., Jiang, Y., Han, X., Wang, H., Pan, J., & Yu, D. (2017). Jasmonate regulates leaf senescence and tolerance to cold stress: crosstalk with other phytohormones. *J. Exp. Bot.*, 68(6), 1361–1369.
- Huang, B. (Eds.). (2006). *Plant-Environmental Interactions*. Boca Raton-London-New York: CRP Press.
- Huang, J., Han, B., Xu, S., Zhou, M., & Shen, W. (2011). Heme oxygenase-1 is involved in the cytokinin-induced alleviation of senescence in detached wheat leaves during dark incubation. *J. Plant Physiol.*, 168(8), 768–775.
- Huang, X., Stettmaier, K., Michel, C., Hutzler, P., Mueller, M. J., & Durner, J. (2004). Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 218, 938–946.
- Jang, G., Yoon, Y., & Choi, Y. D. (2020). Crosstalk with Jasmonic Acid Integrates Multiple Responses in Plant Development. *Int. J. Mol. Sci.*, 21(1), Art. 305. <https://doi.org/10.3390/ijms21010305>
- Jangid, K. K., & Dwivedi, P. (2017). Physiological and biochemical changes by nitric oxide and brassinosteroid in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) under drought stress. *Acta Physiol Plant*, 39, 73.
- Jeandroz, S., Lamotte, O., Astier, J., Rasul, S., Trapet, P., Besson-Bard, A., ... Wendehenne, D. (2013). There's more to the picture than meets the eye: nitric oxide cross talk with Ca<sup>2+</sup> signaling. *Plant Physiol.*, 163, 459–470.
- Jeandroz, S., Wipf, D., Stuehr, D. J., Lamattina, L., Melkonian, M., Tian, Z., ... Wendehenne, D. (2016). Occurrence, structure, and evolution of nitric oxide synthase-like proteins in the plant kingdom. *Sci. Signal.*, 9, re2. <https://doi:10.1126/scisignal.aad4403>
- Jiang, J. L., Tian, Y., Li, L., Yu, M., Hou, R. P., & Ren, X. M. (2019). H<sub>2</sub>S alleviates salinity stress in cucumber by maintaining the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> balance and regulating H<sub>2</sub>S metabolism and oxidative stress response. *Front Plant Sci*, 10, 678. [doi:10.3389/fpls.2019.00678](https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00678)
- Jiang, Y. P., Cheng, F., Zhou, Y. H., Xia, X. J., Mao, W. H., Shi, K., ... Yu, J. Q. (2012). Cellular glutathione redox homeostasis plays an important role in the

- brassinosteroid-induced increase in CO<sub>2</sub> assimilation in *Cucumis sativus*. *New Phytol*, 194(4), 932–943.
- Jin, S. H., Li, X. Q., Wang, G. G., & Zhu, X. T. (2015). Brassinosteroids alleviate high-temperature injury in *Ficus concinna* seedlings via maintaining higher antioxidant defence and glyoxalase systems. *AoB Plants*, 7, pii: plv009. doi: 10.1093/aobpla/plv009
- Jin, Z. P., Shen, J. J., Qiao, Z. J., Yang, G. D., Wang, R., & Pei, Y. X. (2011). Hydrogen sulfide improves drought resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Biophys Res Commun*, 414, 481–486.
- Jin, Z., Xue, S., Luo, Y., Tian, B., Fang, H., Li, H., & Pei, Y. (2013). Hydrogen sulfide interacting with abscisic acid in stomatal regulation responses to drought stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem*, 62, 41–46.
- Johnson, J. M., Reichelt, M., Vadassery, J., Gershenzon, J., & Oelmüller, R. (2014). An *Arabidopsis* mutant impaired in intracellular calcium elevation is sensitive to biotic and abiotic stress. *BMC Plant Biol.*, 14, 162.
- Kang, D., Seo, Y., Lee, J. D., Ishii, R., Kim, K. U., Shin, D. H., ... Lee, I. (2005). Jasmonic Acid Differentially Affects Growth, Ion Uptake and Abscisic Acid Concentration in Salt-tolerant and Salt-sensitive Rice Cultivars. *J. Agron. Crop Sci.*, 191(4), 273–282.
- Karpets, Y. V., Kolupaev, Y. E., Lugovaya, A. A., Shvidenko, N. V., & Yastreb, T. O. (2018). Effects of nitrate and L-arginine on content of nitric oxide and activities of antioxidant enzymes in roots of wheat seedlings and their heat resistance. *Russ J Plant Physiol*, 65, 908–915. <https://doi.org/10.1134/S1021443718050096>
- 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 ions. *Russ J Plant Physiol*, 65, 177–185.
- Karpets, Yu. V., Kolupaev, Yu. E., Lugovaya, A. A., & Oboznyi, A. I. (2014). Effect of jasmonic acid on the pro-/antioxidant system of wheat

- coleoptiles as related to hyperthermia tolerance. *Russ J Plant Physiol.*, *61*, 339–346. <https://doi.org/10.1134/S102144371402006X>
- Karpets, Yu. V., Kolupaev, Yu. E., Lugovaya, A. A., Shvydenko, N. V., Shkliarevskiy, M. A., & Yastreb, T. O. (2020). Functional interaction of ROS and nitric oxide during induction of heat resistance of wheat seedlings by hydrogen sulfide donor. *Russ J Plant Physiol*, *67*(4), 653–660.
- Karpets, Yu. V., Kolupaev, Yu. E., Yastreb, T. O., & Dmitriev, O. P. (2012). Possible pathways of heat resistance induction in plant cells by exogenous nitrogen oxide, *Cytol Genet*, *46*, 354–359.
- Karpets, Yu. V., Kolupaev, Yu. E., Yastreb, T. O., & Oboznyi, A. I. (2015). Effects of NO-Status modification, heat hardening, and hydrogen peroxide on the activity of antioxidant enzymes in wheat seedlings. *Russ J Plant Physiol*, *62*, 292–298. <https://doi.org/10.1134/S1021443715030097>
- Karpets, Yu. V., Kolupaev, Yu. E., Yastreb, T. O., & Oboznyi, A. I. (2016). Induction of heat resistance in wheat seedlings by exogenous calcium, hydrogen peroxide, and nitric oxide donor: functional interaction of signal mediators. *Russ J Plant Physiol*, *63*, 490–498.
- Kaur, N., & Gupta, A. K. (2005). Signal transduction pathways under abiotic stresses in plant. *Curr. Sci.*, *88*, 1771–1780.
- Kaya, C., Ashraf, M., Wijaya, L., & Ahmad, P. (2019). The putative role of endogenous nitric oxide in brassinosteroid-induced antioxidant defence system in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under water stress. *Plant Physiol Biochem*, *143*, 119–128.
- 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
- Kim, Y. S., Park, S., Gilmour, S. J., & Thomashow, M. F. (2013). Roles of CAMTA transcription factors and salicylic acid in configuring the low-temperature transcriptome and freezing tolerance of Arabidopsis. *Plant J.*, *75*, 364–376.

- Klessig, D. F., Choi, H. W., & Dempsey D. M. A. (2018). Systemic acquired resistance and salicylic acid: past, present, and future. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, *31*, 871–888.
- Kolbert, Z., Barroso, J. B., Brouquisse, R., Corpas, F. J., Gupta, K. J., Lindermayr, C., ... Hancock, J. T. (2019). A forty-year journey: The generation and roles of NO in plants. *Nitric Oxide*, *93*, 53–70.
- Kolomeichuk, L. V., Efimova, M. V., Zlobin, I. E., Kreslavski, V. D., Murgan, O. K., Kovtun, I. S., ... Allakhverdiev, S. I. (2020). 24-Epibrassinolide alleviates the toxic effects of NaCl on photosynthetic processes in potato plants. *Photosynth Res.* <https://doi.org/10.1007/s11120-020-00708-z>
- 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*, 658–663.
- Kolupaev, Yu. E., & Yastreb, T. O. (2021). Jasmonate Signaling and Plant Adaptation to Abiotic Stressors (Review). *Appl Biochem Microbiol*, *57*, 1–19. <https://doi.org/10.1134/S0003683821010117>
- Kolupaev, Yu. E., Akinina, G. E., & Mokrousov, A. V. (2005). Induction of heat tolerance in wheat coleoptiles by calcium ions and its relation to oxidative stress. *Russ. J. Plant Physiol.*, *52*(2), 199–204. doi:10.1007/s11183-005-0030-9
- Kolupaev, Yu. E., Firsova, E. N., & Yastreb, T. O. (2017a). Induction of plant cells heat resistance by hydrogen sulfide donor is mediated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation with participation of NADPH oxidase and superoxide dismutase. *Ukr Biochem J*, *89*(4), 34–42.
- Kolupaev, Yu. E., Firsova, E. N., Yastreb, T. O., Lugovaya, A. A. (2017b). The participation of calcium ions and reactive oxygen species in the induction of antioxidant enzymes and heat resistance in plant cells by hydrogen sulfide donor. *Appl Biochem Microbiol*, *53*, 573–579.
- Kolupaev, Yu. E., Horielova, E. I., Yastreb, T. O., Ryabchun, N. I., & Kirichenko, V. V. (2019a). Stress-protective responses of wheat and rye seedlings whose

- chilling resistance was induced with a donor of hydrogen sulfide. *Russ J Plant Physiol*, 66, 540–547.
- Kolupaev, Yu. E., Karpets, Yu. V., & Dmitriev, A. P. (2015). Signal mediators in plants in response to abiotic stress: calcium, reactive oxygen and nitrogen species. *Cytol. Genet.*, 49, 338–348.
- Kolupaev, Yu. E., Karpets, Yu. V., & Kabashnikova, L. F. (2019b). Antioxidative system of plants: cellular compartmentalization, protective and signaling functions, mechanisms of regulation (Review). *Appl Biochem Microbiol.*, 55(5), 441–459.
- Kolupaev, Yu. E., Karpets, Yu. V., & Yastreb, T. O. (2019c). Induction of Wheat Plant Resistance to Stressors by Donors of Nitric Oxide and Hydrogen Sulfide. In M. Hasanuzzaman, K. Nahar, M. A. Hossain (Eds.), *Wheat Production in Changing Environments* (pp. 521-556). Singapore: Springer.
- Kolupaev, Yu. E., Karpets, Yu. V., Beschasniy, S. P., & Dmitriev, A. P. (2019d). Gasotransmitters and their role in adaptive reactions of plant cells. *Cytol. Genet.*, 53(5), 392–406.
- 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.
- Kolupaev, Yu. E., Yastreb, T. O., Oboznyi, A. I., Ryabchun, N. I., & Kirichenko, V. V. (2016). Constitutive and cold-induced resistance of rye and wheat seedlings to oxidative stress. *Russ J Plant Physiol*, 63, 326–337. <https://doi.org/10.1134/S1021443716030067>
- Kolupaev, Yu. E., Yastreb, T. O., Shvidenko, N. V., & Karpets, Yu. V. (2012). Induction of heat resistance of wheat coleoptiles by salicylic and succinic acids: Connection of the effect with the generation and neutralization of reactive oxygen species. *Appl Biochem Microbiol*, 48, 500–505. <https://doi.org/10.1134/S0003683812050055>

- Konrad, K. R., Wudick, M. M., & Feijo, J. A. (2011). Calcium regulation of tip growth: new genes for old mechanisms. *Current Opinion in Plant Biology*, *14*, 721–730.
- Kramell, R., Miersch, O., Atzorn, R., Parthier, B., & Wasternack, C. (2000). Octadecanoid-Derived Alteration of Gene Expression and the “Oxylipin Signature” in Stressed Barley Leaves. Implications for Different Signaling Pathways. *Plant Physiol.*, *123*(1), 177–188.
- Kreslavski, V. D., Los, D. A., Allakhverdiev, S. I., & Kuznetsov, V. V. (2012). Signaling role of reactive oxygen species in plants under stress. *Russ J Plant Physiol*, *59*, 141–154. <https://doi.org/10.1134/S1021443712020057>
- Kwak, J. M., Nguyen, V., & Schroeder, J. I. (2006). The role of reactive oxygen species in hormonal responses. *Plant Physiol.*, *141*, 323–329.
- Lackman, P., González-Guzmán, M., Tilleman, S., Carqueijeiro, I., Pérez, A. C., Moses, T., ... Goossens, A. (2011). Jasmonate signaling involves the abscisic acid receptor PYL4 to regulate metabolic reprogramming in Arabidopsis and tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*, *108*, 5891–5896.
- Lamotte, O., Guold, K., Lecourieux, D., Sequeira-Legrand, A., Lebrun-Garcia, A., Durner, J., ... Wendehenne, D. (2004). Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. *Plant Physiol.*, *135*, 516–529.
- Lefevre, H., Bauters, L., & Gheysen G. (2020). Salicylic acid biosynthesis in plants. *Front. Plant Sci.* *11*, 338. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00338>
- Lei, T., Feng, H., Sun, X., Dai, Q.L., Zhang, F., Liang, H.G., & Lin, H.H. (2010). The alternative pathway in cucumber seedlings under low temperature stress was enhanced by salicylic acid. *Plant Growth Regulation.*, *60*, 35-42. doi: 10.1007/s10725-009-9416-6
- Li Z.-G. (2015a). 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

- Li, H., Li, M., Wei, X., Zhang, X., Xue, R., Zhao, Y., & Zhao, H. (2017). Transcriptome analysis of drought-responsive genes regulated by hydrogen sulfide in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Mol. Genet. Genomics.*, 292(5), 1091–1110.
- Li, Q., & Lancaster, J. R. (2013). Chemical foundations of hydrogen sulfide biology. *Nitric Oxide*, 35, 21–34.
- Li, Y., Wu, Y., Liao, W., Hu, L., Dawuda, M. M., Jin, X., ... Yu, J. (2020). Nitric oxide is involved in the brassinolide-induced adventitious root development in cucumber. *BMC Plant Biol*, 20(1), 102.
- Li, Z. G., & Zhu, L. P. (2015). Hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide-induced accumulation of betaine is involved in the acquisition of heat tolerance in maize seedlings. *Braz J Bot*, 38, 31–38.
- Li, Z. G., Long, W. B., Yang, S. Z., Wang, Y. C., Tang, J. H., Wen, L., ... Min, X. (2015a). Endogenous hydrogen sulfide regulated by calcium is involved in thermotolerance in tobacco *Nicotiana tabacum* L. suspension cell cultures. *Acta Physiol Plant*, 37, 219. doi:10.1007/s11738-015-1971-z
- Li, Z. G., Min, X., & Zhou, Z. H. (2016). Hydrogen sulfide: A signal molecule in plant cross-adaptation. *Front Plant Sci*, 7, 1621. doi:10.3389/fpls.2016.01621
- Li, Z. G., Yang, S. Z., Long, W. B., Yang, G. X., & Shen, Z. Z. (2013). Hydrogen sulphide may be a novel downstream signal molecule in nitric oxide-induced heat tolerance of maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Plant Cell Environ.*, 36, 1564.
- Li, Z. G., Yi, X. Y., & Li, Y. T. (2014a). Effect of pretreatment with hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide on heat tolerance in relation to antioxidant system in maize (*Zea mays*) seedlings. *Biologia*, 69, 1001–1009.
- Li, Z.G. (2013). Hydrogen sulfide: a multifunctional gaseous molecule in plants. *Russ J. Plant Physiol.*, 60(6), 733–740. doi: org/10.1134/S1021443713060058
- Li, Z.G. (2015b). Chapter Thirteen: analysis of some enzymes activities of hydrogen sulfide metabolism in plants. *Methods Enzymol.*, 555, 253–269. doi: 10.1016/bs.mie.2014.11.035



- Li, Z.-G., & Gu, S.-P. (2016). Hydrogen sulfide as a signal molecule in hematin-induced heat tolerance of tobacco cell suspension. *Biol. Plant.*, *60*, 595–600. doi: org/10.1007/s10535-016-0612-8
- Li, Z.-G., Luo, L.-J., & Zhu, L.-P. (2014b). Involvement of trehalose in hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide-induced the acquisition of heat tolerance in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Bot. Stud.*, *55*, 20. doi:10.1186/1999-3110-55-20
- Li, Z.-G., Xie, L.-R., & Li, X.-J. (2015b). Hydrogen sulfide acts as a downstream signal molecule in salicylic acid-induced heat tolerance in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *J. Plant Physiol.*, *177*, 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.12.018>
- Lin, Y. T., Zhang, W., Qi, F., Cui, W. T., Xie, Y. J., & Shen, W. B. (2014). Hydrogen-rich water regulates cucumber adventitious root development in a heme oxygenase-1/carbon monoxide-dependent manner. *J. Plant Physiol.*, *171*, 1–8.
- Ling, T., Zhang, B., Cui, W., Wu, M., Lin, J., Zhou, W., ... Shen, W. (2009). Carbon monoxide mitigates salt-induced inhibition of root growth and suppresses programmed cell death in wheat primary roots by inhibiting superoxide anion overproduction. *Plant Sci.*, *177*(4), 331–340. doi: org/10.1016/j.plantsci.2009.06.004
- Lisjak, M., Teklic, T., Wilson, I. D., Whiteman, M., & Hancock, J. T. (2013). Hydrogen sulfide: environmental factor or signaling molecule? *Plant Cell Environ.*, *36*, 1607–1616.
- Liu, K., Xu, S., Xuan, W., Ling, T., Cao, Z., Huang, B., ... Shen, W. (2007). Carbon monoxide counteracts the inhibition of seed germination and alleviates oxidative damage caused by salt stress in *Oryza sativa*. *Plant Sci.*, *172*, 544–555.
- Liu, S., Dong, Y., Xu, L., & Kong, J. (2014). Effects of foliar applications of nitric oxide and salicylic acid on salt-induced changes in photosynthesis and antioxidative metabolism of cotton seedlings. *Plant Growth Regul.*, *73*, 67–78.

- Liu, Y., Xu, S., Ling, T., Xu, L., & Shen, W. (2010). Heme oxygenase/carbon monoxide system participates in regulating wheat seed germination under osmotic stress involving the nitric oxide pathway. *J. Plant Physiol.*, *167*(16), 1371–1379. doi: 10.1016/j.jplph.2010.05.021
- Liu, Z., Li, Y., Cao, C., Liang, S., Ma, Y., Liu, X., & Pei, Y. (2019). The role of H<sub>2</sub>S in low temperature-induced cucurbitacin C increases in cucumber. *Plant Mol Biol*, *99*, 535–544.
- Lorenzo, O., Chico, J. M., Sanchez-Serrano, J. J., & Solano, R. (2004). JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, *16*, 1938–1950.
- Maksimov, I. V., Troshina, N. B., Surina, O. B., Cherepanova, E. A., & Yarullina, L. G. (2010). Influence of Ca<sup>2+</sup> ions on metabolism of active oxygen species in wheat calli cocultured with the bunt pathogen *Tilletia caries*. *Appl. Biochem. Microbiol.*, *46*(5), 530–535. doi: 10.1134/S000368381005011X
- Mamaeva, A. S., Fomenkov, A. A., Nosov, A. V., Moshkov, I. E., Mur, L. A. J., Hall, M. A., & Novikova, G. V. (2015). Regulatory role of nitric oxide in plants. *Russ J Plant Physiol*, *62*, 427–440. <https://doi.org/10.1134/S1021443715040135>
- Marino, D., Dunand, C., Puppo, A. & Pauly, N. (2012). A burst of plant NADPH oxidases. *Trends Plant Sci.*, *17*(1), 9–15.
- Maslennikova, D. R., Allagulova, Ch. R., Fedorova, K. A., Plotnikov, A. A., Aval'baev, A. M., & Shakirova, F. M. (2017). Cytokinins contribute to realization of nitric oxide growth-stimulating and protective effects on wheat plants. *Russ. J. Plant Physiol.*, *64*, 665.
- Matschi, S., Werner, S., Schulze, W. X., Legen, J., Hilger, H. H., & Romeis, T. (2013). Function of calcium-dependent protein kinase CPK28 of *Arabidopsis thaliana* in plant stem elongation and vascular development. *The Plant Journal*, *73*, 883–896.

- McAinsh, M. R., & Pittman, J. K. (2009). Shaping the calcium signature. *New Phytologist.*, *181*, 275–294.
- Medvedev, S. S. (2012). Mechanisms and physiological role of polarity in plants. *Russ J Plant Physiol.*, *59*, 502–514.
- Medvedev, S. S. (2018). Principles of Calcium Signal Generation and Transduction in Plant Cells. *Russ J Plant Physiol.*, *65*, 771–783.
- Melekhov, E. I., & Efremova, L. K. (1990). Effect of phytohormones on plant cell stability to heating and to 2,4-D treatments. *Fiziologiya Restenii*, *37*(3), 561–568.
- Meng, D. K., Chen, J., & Yang, Z. M. (2011). Enhancement of tolerance of Indian mustard (*Brassica juncea*) to mercury by carbon monoxide. *J. Hazardous Materials.*, *186*(2-3), 1823–1829. doi: org/10.1016/j.jhazmat.2010.12.062
- Miller, J. B., Pratap, A., Miyahara, A., Zhou, L., Bornemann, S., Morris, R. J., & Oldroyd G. E. D. (2013). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase is negatively and positively regulated by calcium providing a mechanism for decoding calcium responses during symbiosis signaling. *The Plant Cell.*, *25*, 5053–5066.
- Minibayeva, E. V., Gordon, L. K., Kolesnikov, O. P., & Chasov, A. V. (2001). Role of extracellular peroxidase in the superoxide production by wheat root cells. *Protoplasma*, *217*, 125–128.
- Minibayeva, F., Kolesnikov, O., Chasov, A., Beckett, R. P., Lüthje, S., Vylegzhanina, N., ... Böttger, M. (2009). Wound-induced apoplastic peroxidase activities: their roles in the production and detoxification of reactive oxygen species. *Plant Cell Environ.*, *32*(5), 497–508. doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.01944.x
- Mittler, R, Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V. B., Vandepoele, K., ... Van Breusegem, F. (2011). ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci.*, *16*, 300–309.
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.*, *25*, 239–250.

- Mur, L. A. J., Kenton, P., Atzorn, R., Miersch, O., & Wasternack C. (2006) The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiol.*, *140*, 249–262.
- Mur, L. A. J., Mandon, J., Persijn, S., Cristescu, S. M., Moshkov, I. E., Novikova, G. V., ... Gupta, K. J. (2013). Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge. *AoB Plants*, *5*, pls052. doi:10.1093/aobpla/pls052
- Neill, S., Barros, R., Bright, J., Desikan, R., Hancock, J., Harrison, J., ... Wilson, I. (2008). Nitric oxide, stomatal closure and abiotic stress. *J. Exp. Bot.*, *59*, 165–176.
- Oda, T., Hashimoto, H., Kuwabara, N., Akashi, S., Hayashi, K., Kojima, C., ... Shimizu, T. (2010). Structure of the N-terminal regulatory domain of a plant NADPH oxidase and its functional implications. *J. Biol. Chem.*, *285*, 1435–1445.
- Ogasawara, Y., Kaya, H., Hiraoka, G., Yumoto, F., Kimura, S., Kadota, Y., ... Kuchitsu, K. (2008). Synergistic activation of the Arabidopsis NADPH oxidase AtrbohD by Ca<sup>2+</sup> and phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, *283*(14), 8885–8892. doi: 10.1074/jbc.M708106200
- Ordonez, N. M., Marondedze, C., Thomas, L., Pasqualini, S., Shabala, L., Shabala, S., & Gehring, C. (2014). Cyclic mononucleotides modulate potassium and calcium flux responses to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Arabidopsis roots. *FEBS Letters*, *588*, 1008–1015.
- Quan, L. J., Zhang, B., Shi, W. W., & Li, H. Y. (2008). Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *J. Integr. Plant Biol.*, *50*(1), 2–18.
- Package ‘psych’ (<https://cran.r-project.org/web/packages/psych/psych.pdf>).
- Palmieri, M. C., Sell, S., Huang, X., Scherf, M., Werner, T., Durner, J., & Lindermayr, C. (2008). Nitric oxide-responsive genes and promoters in *Arabidopsis thaliana*: a bioinformatics approach. *J Exp Bot.*, *59*, 177–186.

- Pedmale, U. V., Celaya, R. B., & Liscuma, E. (2010). Phototropism: mechanism and outcomes. In *The Arabidopsis Book*, 8, e0125. doi: 10.1199/tab.0125
- Peers, C. & Lefer, D. J. (2011). Emerging roles for gasotransmitters. *Exp. Physiol.*, 96(9), 831–832.
- Peleg-Grossman, S., Melamed-Book, N., & Levine, A. (2012). ROS production during symbiotic infection suppresses pathogenesis-related gene expression. *Plant Signaling Behav.*, 7, 409–415.
- Petrov, V. D., & Breusegem, F. V. (2012). Hydrogen peroxide – a central hub for information flow in plant cell. *AoB Plants*, pls014; doi:10.1093/aobpla/pls014
- Piterková, J., Luhová, L., Mieslerova, B., Lebeda, A., & Petrivalsky, M. (2013). Nitric oxide and reactive oxygen species regulate the accumulation of heat shock proteins in tomato leaves in response to heat shock and pathogen infection. *Plant Science*, 207, 57–65.
- Pitzschke, A., & Hirt, H. (2006). Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species signaling in plants. *Plant Physiol.*, 141, 351–356.
- Poonam, S., Kaur, H., & Geetika, S. (2013). Effect of Jasmonic Acid on Photosynthetic Pigments and Stress Markers in *Cajanus cajan* (L.) Millsp. Seedlings under Copper Stress. *Amer. J. Plant Sci.*, 4, 817–823.
- Radi, R. (2004). Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 4003–4008.
- Radyukina, N. L., Shashukova, A. V., Makarova, S. S., & Kuznetsov, V. V. (2011). Exogenous proline modifies differential expression of superoxide dismutase genes in UV-B-irradiated *Salvia officinalis* plants. *Russ J Plant Physiol.*, 58(1), 36–44.
- Riemenschneider, A., Wegele, R., Schmidt, A., & Papenbrock, J. (2005). Isolation and characterization of a D-cysteine desulphydrase protein from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS J*, 272, 1291–1304.
- Rodriguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M. C., Zabalza, A., Corpas, F. J., Gomez, M., Del Rio, L. A., & Sandolio, L. M. (2006). Cadmium effect on oxidative

- metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation in vivo. *Plant Cell Environ.*, 29(8), 1532–1544.
- Romeis, T., & Herde, M. (2014). From local to global: CDPKs in systemic defense signaling upon microbial and herbivore attack. *Current Opinion in Plant Biology*, 20, 1–10.
- Romero, L. C., García, I., & Gotor, C. (2013). L-cysteine desulphydrase 1 modulates the generation of the signaling molecule sulfide in plant cytosol. *Plant Signal. Behav.*, 8(5), 4621–4634. doi: 10.4161/psb.24007
- Ruan J., Zhou Y., Zhou M., Yan J., Khurshid M., Weng W., ... Zhang K. (2019). Jasmonic Acid Signaling Pathway in Plants. *Int. J. Mol. Sci.*, 20(10), 2479. <https://doi.org/10.3390/ijms20102479>
- Rudenko, N. N., Ignatova, L. K., Fedorchuk, T. P., & Ivanov, B. N. (2015). Carbonic anhydrases in photosynthetic cells of higher plants. *Biochemistry (Mosc.)*, 80(6), 674–687. doi: org/10.1134/S0006297915060048
- Ryu, H., & Cho, Y.-G. (2015). Plant hormones in salt stress tolerance. *J. Plant Biol.*, 58(3), 147–155.
- Sa, Z. S., Huang, L. Q., Wu, G. L., Ding, J. P., Chen, X. Y., Yu, T., ... Shen, W. B. (2007). Carbon monoxide: a novel antioxidant against oxidative stress in wheat seedling leaves. *J. Integr. Plant Biol.*, 49(5), 638–645. doi: 10.1111/j.1744-7909.2007.00461.x
- Sagisaka, S. (1976). The occurrence of peroxide in a perennial plant, *Populus gelrica*. *Plant Physiol.*, 57, 308.
- Sakhabutdinova, A. R., Fatkhutdinova, D. R., & Shakirova, F. M. (2004). Effect of Salicylic Acid on the Activity of Antioxidant Enzymes in Wheat under Conditions of Salination. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40, 501–505. <https://doi.org/10.1023/B:ABIM.0000040675.29736.91>
- Saleem, M., Fariduddin, Q., & Janda, T. (2020). Multifaceted role of salicylic acid in combating cold stress in plants: A review. *Journal of Plant Growth Regulation*. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10152-x>

- Sane, P. V., Kumar, N., Bajjal, M., Singh, K. K., & Kochhar, V. K. (1987). Activation of nitrate reductase by calcium and calmodulin. *Phytochem.*, *26*, 1289.
- Santa-Cruz, D. M., Pacienza, N. A., Polizio, A. H., Balestrasse, K. B., Tomaro, M. L., & Yannarelli, G. G. (2010). Nitric oxide synthase-like dependent NO production enhances heme oxygenase up-regulation in ultraviolet-B-irradiated soybean plants. *Phytochem.*, *71*, 1700–1707.
- Santos, C. V. (2004). Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves. *Sci. Horticult.*, *103*(1), 93–99.
- Scuffi, D., Álvarez, C., Laspina, N., Gotor, C., Lamattina, L., & García-Mata, C. (2014). Hydrogen sulfide generated by L-cysteine desulphydrase acts upstream of nitric oxide to modulate abscisic acid-dependent stomatal closure. *Plant Physiol.*, *166*, 2065.
- Sembdner, G., & Parthier, B. (1993). The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, *44*, 569–589.
- Semchuk, N. M., Vasylyk, Yu. V., Lushchak, Ok. V., & Lushchak, V.I. (2012). Effect of short-term salt stress on oxidative stress markers and antioxidant enzymes activity in tocopherol-deficient *Arabidopsis thaliana* plants. *Ukr Biochem J.*, *84*(4), 41–48.
- Seybold, H., Trempel, F., Ranf, S., Scheel, D., Romeis, T., & Lee, J. (2014). Ca<sup>2+</sup>-signalling in plant immune response: from pattern recognition receptors to Ca<sup>2+</sup> decoding mechanisms. *New Phytologist.*, *204*, 782–790.
- Shafiq, F., Raza, S. H., Bibi, A., Khan, I., & Iqbal, M. (2018). Influence of proline priming on antioxidative potential and ionic distribution and its relationship with salt tolerance of wheat. *Cereal Res Commun*, *46*, 287–300.
- Shakirova, F. M., Allagulova, Ch. R., Maslennikova, D. R., Klyuchnikova, E. O., Avalbaev, A. M., & Bezrukova, M. V. (2016). Salicylic acid-induced protection against cadmium toxicity in wheat plants. *Environ. Exp. Bot.*, *122*, 19–28.

- Shakirova, F. M., Bezrukova, M. V., & Maslennikova, D. R. (2013). Endogenous ABA as a Hormonal Intermediate in the Salicylic Acid Induced Protection of Wheat Plants Against Toxic Ions. In S. Hayat, A. Ahmad, & M. N. Alyemeni (Eds.), *Salicylic Acid* (pp. 119-140). Dordrecht: Springer Science.
- Shakirova, F. M., Sakhabutdinova, A. R., Bezrukova, M. V., Fatkhutdinova, R., & Fatkhutdinova, D. (2003). Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. *Plant Sci.* *164*, 317–322.
- Shan, C., Wang, T., Zhou, Y., & Wang, W. (2018a). Hydrogen sulfide is involved in the regulation of ascorbate and glutathione metabolism by jasmonic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Biol. Plant.*, *62*, 188–193.
- Shan, C., Zhang, S., & Ou, X. (2018b). The roles of H<sub>2</sub>S and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in regulating AsA-GSH cycle in the leaves of wheat seedlings under drought stress. *Protoplasma*, *255*, 1257–1262.
- Sharma, A., Kumar, V., Thukral, A. K., & Bhardwaj, R. (2016). Epibrassinolide-imidacloprid interaction enhances non-enzymatic antioxidants in *Brassica juncea* L. *Ind J Plant Physiol*, *21*, 70–75.
- Sharma, I., Bhardwaj, R., & Pati, P. K. (2015). Exogenous application of 28-homobrassinolide modulates the dynamics of salt and pesticides induced stress responses in an elite rice variety pusa basmati-1. *J Plant Growth Regul*, *34*, 509–518.
- Sharma, I., Kaur, N., & Pati, P. K. (2017). Brassinosteroids: A promising option in deciphering remedial strategies for abiotic stress tolerance in rice. *Front Plant Sci*, *8*, 2151.
- Sharova, E. I., & Medvedev, S. S. (2017). Redox reactions in apoplast of growing cells. *Russ. J. Plant Physiol.*, *64*(1), 1–14. doi: 10.1134/S1021443717010149.
- She, X.-P., & Song, X.-G. (2008). Carbon monoxide-induced stomatal closure involves generation of hydrogen peroxide in *Vicia faba* guard cells. *J. Integr. Plant Biol.*, *50*(12), 1539–1548. doi: 10.1111/j.1744-7909.2008.00716.x



- Shekhawat, G. S., & Verma, K. (2010). Haem oxygenase (HO): an overlooked enzyme of plant metabolism and defence. *J. Exp. Bot.*, *61*(9), 2255–2270. doi:10.1093/jxb/erq074
- Shen, Q., Jiang, M., Li, H., Che, L. L., & Yang, Z. M. (2011). Expression of a *Brassica napus* heme oxygenase confers plant tolerance to mercury toxicity. *Plant Cell Environ.*, *34*(5), 752–763.
- Shevyakova, N. I., Bakulina, E. A. & Kuznetsov, V. V. (2009). Proline antioxidant role in the common ice plant subjected to salinity and paraquat treatment inducing oxidative stress. *Russ J Plant Physiol*, *56*, 663–669. <https://doi.org/10.1134/S1021443709050124>
- Shi, H., Ye, T., & Chan, Z. (2013). Exogenous application of hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide enhanced multiple abiotic stress tolerance in bermudagrass (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.). *Plant Physiol Biochem*, *71*, 226–234.
- Shi, H., Ye, T., & Chan, Z. (2014). Nitric oxide-activated hydrogen sulfide is essential for cadmium stress response in bermudagrass (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.). *Plant Physiol Biochem*, *74*, 99–107.
- Shi, H., Ye, T., Han, N., Bian, H., Liu, X., & Chan, Z. (2015). Hydrogen sulfide regulates abiotic stress tolerance and biotic stress resistance in *Arabidopsis*. *J Integr Plant Biol*, *57*, 628–640.
- Siddiqui, M. H., Alamri, S. A., Al-Khaishany, M. Y. Y., Al-Qutami, M. A., Ali, H. M., & Khan, M. N. (2017). Nitric oxide and calcium induced physio-biochemical changes in tomato (*Solanum lycopersicum*) plant under heat stress. *Fresenius Environmental Bulletin*, *26*(2a), 1663–1672.
- Sin'kevich, M. S., Deryabin, A. N., & Trunova, T. I. (2009). Characteristics of oxidative stress in potato plants with modified carbohydrate metabolism. *Russ J Plant Physiol.*, *56*(2), 168–174.
- 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

- Singh, S., & Parniske, M. (2012). Activation of calcium- and calmodulin-dependent protein kinase (CCaMK), the central regulator of plant root endosymbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, *15*, 444–453.
- Singh, S., Kumar, V., Kapoor, D., Kumar, S., Singh, S., Dhanjal, D. S., ... Singh J. (2020). Revealing on hydrogen sulfide and nitric oxide signals co-ordination for plant growth under stress conditions. *Physiol. Plant.*, *168*(2), 301–317.
- Slathia, S., Sharma, A., & Choudhary, S. P. (2012). Influence of exogenously applied epibrassinolide and putrescine on protein content, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in *Lycopersicon esculentum* under salinity stress. *Amer J Plant Sci*, *3*, 714–720.
- Song, X. G., She, X. P., & Zhang, B. (2008). Carbon monoxide-induced stomatal closure in *Vicia faba* is dependent on nitric oxide synthesis. *Physiol. Plant.*, *132*(4), 514–525.
- Swarbreck, S. M., Colaco, R., & Davies, J. M. (2013). Plant calciumpermeable channels. *Plant Physiology*, *163*, 514–522.
- Syvash, O. O., & Zolotareva, O. K. (2017). Regulation of chlorophyll degradation in plant tissues. *Biotechnologia Acta.*, *10*(3), 20–30.
- Szabados, L., & Savoure, A. (2009). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.*, *15*, 89–97.
- Talaat, N. B., & Shawky, B. T. (2013). 24-Epibrassinolide alleviates salt-induced inhibition of productivity by increasing nutrients and compatible solutes accumulation and enhancing antioxidant system in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Acta Physiol. Plant*, *35*, 729–740.
- Tarchevsky, I. A., Yakovleva, V. G., & Egorova, A. M. (2010) Salicylate-induced modification of plant proteomes (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, *46*(3), 241–252.
- Tatsumi, H., Toyota, M., Furuichi, T., & Sokabe, M. (2014). Calcium mobilizations in response to changes in the gravity vector in Arabidopsis seedlings: possible cellular mechanisms. *Plant Signaling & Behavior*, *9*:e29099.

- Tewari, R. K., & Paek, K. Y. (2011). Salicylic Acid-induced Nitric Oxide and ROS Generation Stimulate Ginsenoside Accumulation in *Panax ginseng* Roots. *J. Plant Growth Regul.*, 30(4), 396–404.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., ... Browse, J. (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF<sup>COI1</sup> complex during jasmonate signalling. *Nature*, 448(7154), 661–666.
- Tian, B., Zhang, Y., Jin, Z., Liu, Z., & Pei, Y. (2017). Role of hydrogen sulfide in the methyl jasmonate response to cadmium stress in foxtail millet. *Front. Biosci. (Landmark)*, 22, 530–538.
- Ton, J., Flors, V., & Mauch-Mani, B. (2009). The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends Plant Sci.*, 14, 310–317.
- Trewavas, A. J., Rodrigues, C., Rato, C., & Malho, R. (2002). Cyclic nucleotides: the current dilemma. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5, 425–429.
- Van Aken, O., Giraud, E., Clifton, R., & Whelan, J. (2009). Alternative oxidase: a target and regulator of stress responses. *Physiol. Plant.*, 37(4), 354–361.
- Vardhini, B. V., & Rao, S. S. R. (2003). Amelioration of osmotic stress by brassinosteroids on seed germination and seedling growth of three varieties of sorghum. *Plant Growth Regul.*, 41, 25–31.
- Vardhini, B. V., Sujatha, E. S., & Rao, S. R. (2012). Brassinosteroids on the oxidizing and hydrolyzing enzymes of radish plants. *J. Phytol.*, 4, 1–4.
- Vasyukova, N. I., & Ozeretskovskaya, O. L. (2009). Jasmonate-dependent defense signaling in plant tissues. *Russ J Plant Physiol.*, 56, 581–590. <https://doi.org/10.1134/S102144370905001X>
- Verma, K., Dixit, S., Shekhawat, G. S., & Alam, A. (2015). Antioxidant activity of heme oxygenase 1 in *Brassica juncea* (L.) Czern. (Indian mustard) under salt stress. *Turk. J. Biol.*, 39, 540–549. doi:10.3906/biy-1501-28
- Vlot, A. C., Dempsey, D. A., & Klessig, D. F. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 177–206.
- Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid Biosynthesis. *Mol. Plant.*, 3, 2–20.

- Voss, L. J., Hedrich, R., & Roelfsema, M. R. G. (2016). Current injection provokes rapid expansion of the guard cell cytosolic volume and triggers  $\text{Ca}^{2+}$  signals. *Molecular Plant.*, 9, 471–480.
- Wang, J., Song, L., Gong, X., Xu, J., & Li, M. (2020). Functions of Jasmonic Acid in Plant Regulation and Response to Abiotic Stress. *Int. J. Mol. Sci.*, 21(4), Art. 1446. <https://doi.org/10.3390/ijms21041446>
- Wang, L., Hou, Z., Hou, L., Zhao, F., & Liu, X. (2012a).  $\text{H}_2\text{S}$  induced by  $\text{H}_2\text{O}_2$  mediates drought-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Chinese Bull Bot*, 47, 217–225.
- Wang, L.-J., & Li, S.-H. (2006). Salicylic acid-induced heat or cold tolerance in relation to  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and antioxidant systems in young grape plants. *Plant Science*, 170(4), 685–694. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.09.005>
- Wang, M., & Liao, W. (2016). Carbon monoxide as a signaling molecule in plants. *Front. Plant Sci.*, 7, 572. doi: 10.3389/fpls.2016.00572
- Wang, S. Y. (1999). Methyl Jasmonate Reduces Water Stress in Strawberry. *J. Plant Growth Regul.*, 18(3), 127–134.
- Wang, W., Wang, X., Huang, M., Cai, J., Zhou, Q., Dai, T., ... Jiang D. (2018). Hydrogen peroxide and abscisic acid mediate salicylic acid-induced freezing tolerance in wheat. *Front. Plant Sci.* 3(9), 1137. doi:10.3389/fpls.2018.01137
- Wang, Y., Li, L., Cui, W., Xu, S., Shen, W., & Wang, R. (2012b). Hydrogen sulfide enhances alfalfa (*Medicago sativa*) tolerance against salinity during seed germination by nitric oxide pathway. *Plant Soil*, 351, 107–119.
- Wei, M. Y., Chao, Y. Y., & Kao, C. H. (2013). NaCl-induced heme oxygenase in roots of rice seedlings is mediated through hydrogen peroxide. *Plant Growth Regul.*, 69, 209–214.
- Whiteman, M., Li, L., Kostetski, I., Chu, S. H., Siau, J. L., Bhatia, M., & Moore, P. K. (2006). Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulphide. *Biochem Biophys Res Commun*, 343, 303–310.

- Wilkins, K. A., Matthus, E., Swarbreck, S. M., & Davies, J. M. (2016). Calcium-mediated abiotic stress signaling in roots. *Frontiers in Plant Science*, 7. Article 1296. doi:10.3389/fpls.2016.01296
- Wilkinson, W. J., & Kemp, P. J. (2011). Carbon monoxide: an emerging regulator of ion channels. *J. Physiol.*, 589(13), 3055–3062. doi: 10.1113/jphysiol.2011.206706
- Wirtz, M., & Hell, R. (2006). Functional analysis of the cysteine synthase protein complex from plants: structural, biochemical and regulatory properties. *J Plant Physiol*, 163, 273–286.
- Wong, H. L., Pinontoan, R., Hayashi, K., Tabata, R., Yaeno, T., Hasegawa, K., ... Shimamoto, K. (2007). Regulation of Rice NADPH-Oxidase by Rac GTPase to Its NTerminal Extension. *Plant Cell*, 19, 4022–4034.
- Wu, X., Zhu, W., Zhang, H., Ding, H., & Zhang, H. J. (2011). Exogenous nitric oxide protects against salt-induced oxidative stress in the leaves from two genotypes of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Acta Physiol. Plant.*, 33, 1199.
- Xia, X. J., Wang, Y. J., Zhou, Y. H., Tao, Y., Mao, W. H., Shi, K., ... 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
- Xie, Y. J., Zhang, C., Lai, D. W., Sun, Y., Samma, M. K., Zhang, J., & Shen, W. (2014). Hydrogen sulfide delays GA-triggered programmed cell death in wheat aleurone layers by the modulation of glutathione homeostasis and heme oxygenase-1 expression. *J. Plant Physiol.*, 171, 53–62.
- Xie, Y., Ling, T., Han, Y., Liu, K., Zheng, Q., Huang, L., ... Shen, W. (2008). Carbon monoxide enhances salt tolerance by nitric oxide-mediated maintenance of ion homeostasis and up-regulation of antioxidant defence in wheat seedling roots. *Plant Cell Environ.*, 31, 1864–1881.

- Xing, H., Tan, L., An, L., Zhao, Z., Wang, S., & Zhang, C. (2004). Evidence for the involvement of nitric oxide and reactive oxygen species in osmotic stress tolerance of wheat seedlings: inverse correlation between leaf abscisic acid accumulation and leaf water loss. *Plant Growth Regul.*, *42*, 61.
- Xu, S., Sa, Z.-S., Cao, Z.-Y., Xuan, W., Huang, B.-K., Ling, T.-F., ... Shen, W.-B. (2006). Carbon monoxide alleviates wheat seed germination inhibition and counteracts lipid peroxidation mediated by salinity. *J. Integr. Plant Biol.*, *48*, 1168–1176.
- Xu, Y. H., Liao, Y. C., Zhang, Z., Liu, J., Sun, P. W., Gao, Z. H., ... Wei, J. H. (2020). Jasmonic acid is a crucial signal transducer in heat shock induced sesquiterpene formation in *Aquilaria sinensis*. *Sci. Rep.*, *6*, 21843. <https://doi.org/10.1038/srep21843>
- Xuan, W., Huang, L., Li, M., Huang, B., Xu, S., Liu, H., ... Shen, W. (2007). Induction of growth elongation in wheat root segments by heme molecules: a regulatory role of carbon monoxide in plants? *Plant Growth Regul.*, *52*(1), 41–51. doi: 10.1007/s10725-007-9175-1
- Xuan, Y., Zhou, S., Wang, L., Cheng, Y., & Zhao, L. (2010). Nitric oxide functions as a signal and acts upstream of atcam3 in thermotolerance in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiology*, *153*, 1895–1906.
- Yan, Z., Zhang, W., Chen, J., & Li, X. (2015). Methyl jasmonate alleviates cadmium toxicity in *Solanum nigrum* by regulating metal uptake and antioxidative capacity. *Biol. Plant.*, *59*, 373–381.
- Yang, D.-L., Shi, Z., Bao, Y., Yan, J., Yang, Z., Yu, H., ... Hua, J. (2017). Calcium pumps and interacting BON1 protein modulate calcium signature, stomatal closure, and plant immunity. *Plant Physiology*, *175*, 424–437. doi 10.1104/pp.17.00495
- Yang, L., Ji, J., Wang, H., Harris-Shultz, K. R., Abd Allah, E. F., Luo, Y., ... Hu, X. (2016a). Carbon monoxide interacts with auxin and nitric oxide to cope with iron deficiency in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci.*, *7*, 112. doi: 10.3389/fpls.2016.00112

- Yang, M., Qin, B., Ma, X., Wang, P., Li, M., Chen, L., ... Yin, Y. (2016b). Foliar application of sodium hydrosulfide (NaHS), a hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) donor, can protect seedlings against heat stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Integr Agricult.*, 15(12), 2745–2758.
- Yao, Y., Yang, Y., Li, C., Huang, D., Zhang, J., Wang, C., ... Liao, W. (2019). Research progress on the functions of gasotransmitters in plant responses to abiotic stresses. *Plants (Basel)*, 8(12), 605. doi: 10.3390/plants8120605
- Yastrebo T.O., Kolupaev Yu.E., Shvidenko N.V., & Dmitriev A.P. (2018). Action of methyl jasmonate and salt stress on antioxidant system of *Arabidopsis* plants defective in jasmonate signaling genes. *Ukr. Biochem. J.*, 90(5), 50–59.
- Yastrebo, T. O., Kolupaev, Yu. E., Karpets, Yu. V., & Dmitriev, A. P. (2017). Effect of nitric oxide donor on salt resistance of *Arabidopsis jin1* mutants and wild-type plants. *Russ J Plant Physiol*, 64, 207–214. <https://doi.org/10.1134/S1021443717010186>
- Yastrebo, T. O., Kolupaev, Yu. E., Lugovaya, A. A., & Dmitriev, A. P. (2016). Content of Osmolytes and Flavonoids under Salt Stress in *Arabidopsis thaliana* Plants Defective in Jasmonate Signaling. *Appl Biochem Microbiol.*, 52, 210–215. <https://doi.org/10.1134/S0003683816020186>
- Yastrebo, T. O., Kolupaev, Yu. E., Shvidenko, N. V., Lugovaya, A. A., & Dmitriev, A. P. (2015). Salt stress response in *Arabidopsis thaliana* plants with defective jasmonate signaling. *Appl Biochem Microbiol.*, 51, 451–454. <https://doi.org/10.1134/S000368381504016X>
- Yastrebo, T. O., Kolupaev, Yu. E., Shkliarevskiy, M. A., Dyachenko, A. I., & Dmitriev, A. P. (2020). Involvement of Jasmonate Signaling Components in Salt Stress-Induced Stomatal Closure in *Arabidopsis thaliana*. *Cytology and Genetics*, 54(4), 318–323.
- Yemets, A. I., Karpets, Yu. V., Kolupaev, Yu. E., & Blume, Ya. B. (2019). Emerging Technologies for Enhancing ROS/RNS Homeostasis. In M. Hasanuzzaman, V. Fotopoulos, K. Nahar, M. Fujita (Eds.), *Reactive Oxygen, Nitrogen and Sulfur*

- Species in Plants: Production, Metabolism, Signaling and Defense Mechanisms* (pp. 873-922). Wiley.
- Yuan, X. X., Wang, J., Xie, Y. J., & Shen, W. B. (2009). Effects of carbon monoxide on salt tolerance and proline content of roots in wheat seedling. *Plant Physiol. Commun.*, *45*(6), 567–570.
- Yun, B. W., Feechan, A., Yin, M., Saidi, N. B. B., Bihan, T. L., Yu, M., ... Loake, G. J. (2011). S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature*, *478*, 264–268.
- Yusuf, M., Fariduddin, Q., Hayat, S., Hasan, S. A., & Ahmad, A. (2011). Protective response of 28-homobrassinolide in cultivars of *Triticum aestivum* with different levels of nickel. *Arch Environ Contam Toxicol*, *60*, 68–76.
- Yusuf, M., Fariduddin, Q., Khan, T. A., Faizan, M., & Faraz, A. (2019). Interplay Between Antioxidant Enzymes and Brassinosteroids in Control of Plant Development and Stress Tolerance. In S. Hayat, M. Yusuf, R. Bhardwaj, & A. Bajguz (Eds.), *Brassinosteroids: Plant Growth and Development* (pp. 323–348). Singapore: Springer Nature.
- Zeng, H., Xu, L., Singh, A., Wang, H., Du, L., & Poovaiah, B. W. (2015). Involvement of calmodulin and calmodulin-like proteins in plant responses to abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, *6*. Article 600. doi 10.3389/fpls.2015.00600
- 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.
- 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.
- Zhang, C., Li, Y., Yuan, F., Hu, S., & He, P. (2012). Effects of hematin and carbon monoxide on the salinity stress responses of *Cassia obtusifolia* L. seeds and seedlings. *Plant Soil*, *359*, 85–105.



- Zhang, S., Li, Y., & Pei, F. (2014). Carbon monoxide fumigation improved the quality, nutrients, and antioxidant activities of postharvest peach. *Int. J. Food Sci.*, Article ID 834150
- Zhao, K., Fan, H., Zhou, S., & Song, J. (2003). Study on the salt and drought tolerance of *Suaeda salsa* and *Kalanchoe claigremontiana* under isoosmotic salt and water stress. *Plant Sci.*, 165, 837–844.
- Zhou, B., Guo, Z., Xing, J., & Huang, B. (2005). Nitric oxide is involved in abscisic acid-induced antioxidant activities in *Stylosanthes guianensis*. *J. Exp. Bot.*, 56, 3223.
- Zilli, C. G. Santa-Cruz, D. M., & Balestrasse, K. B. (2014). Heme oxygenase-independent endogenous production of carbon monoxide by soybean plants subjected to salt stress. *Environ. Exp. Bot.*, 102, 11–16.

## ДОДАТОК А

### Список публікацій за темою дисертації та відомості про апробацію результатів дисертації

#### Статті у наукових виданнях, що індексовані у наукометричній базі даних Scopus:

1. Shkliarevskiy, M. A., Karpets, Yu. V., Kolupaev, Yu. E., Lugovaya, A. A., & Dmitriev, A. P. (2020). Calcium-Dependent Changes in Cellular Redox Homeostasis and Heat Resistance of Wheat Plantlets under Influence of Hemin (Carbon Monoxide Donor). *Cytology and Genetics*, 54(6), 522–530. (Особистий внесок дисертанта: проведенні експериментів, обробка та інтерпретація результатів, участь у підготовці тексту статті)

2. Karpets, Yu. V., Shkliarevskiy, M. A., Khripach, V. A., & Kolupaev, Yu. E. (2021). State of enzymatic antioxidative system and heat resistance of wheat plantlets treated by combination of 24-epibrassinolide and NO donor. *Cereal Research Communications*, 49, 207–216. DOI: 10.1007/s42976-020-00090-5 (Особистий внесок дисертанта: участь у проведенні експериментів, обробці результатів, підготовці тексту статті)

3. Yastreb, T. O., Kolupaev, Yu. E., Shkliarevskiy, M. A., Dyachenko, A. I., & Dmitriev, A. P. (2020). Involvement of Jasmonate Signaling Components in Salt Stress-Induced Stomatal Closure in *Arabidopsis thaliana*. *Cytology and Genetics*, 54(4), 318–323. (Особистий внесок дисертанта: участь у проведенні експериментів, обробка результатів)

#### Статті у наукових фахових виданнях України:

4. Шклярєвський, М.А., Карпець, Ю.В., Лугова, Г.А., & Горєлова, О.І. (2019). Комбінована дія нітропрусиду натрію та 24-епібрасиноліду на редокс-гомеостаз і теплостійкість проростків пшениці. *Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія*, 2(47), 71–81. (Особистий внесок дисертанта: участь у проведенні експериментів, обробці та інтерпретації результатів, підготовці тексту статті)

5. Шкляревський, М. А., Тарабан, Д. А., Павлов, Ю. П., & Карпець, Ю. В. (2019). Індукування неспецифічної стійкості сіянців сосни звичайної дією 24-епібрасиноліду. *Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія*, 3(48), 75–86. (Особистий внесок дисертанта: проведення експериментів, обробка та інтерпретація результатів, участь у підготовці тексту статті)

6. Шкляревський, М. А., Колупаєв, Ю. Є., Карпець, Ю. В., Швиденко, М. В., & Дмитрієв, О. П. (2020). Вплив донора монооксиду вуглецю (CO) на теплостійкість проростків пшениці та генерацію ними активних форм кисню. *Доповіді Національної академії наук України*, 8, 73–80. (Особистий внесок дисертанта: проведення експериментів, обробка результатів, участь в їх інтерпретації та підготовці тексту статті)

7. Ястреб, Т. О., Шкляревський, М. А., Колупаєв, Ю. Є., Карпець, Ю. В., & Дяченко, А. І. (2021). *Arabidopsis thaliana* у водній культурі як модельний об'єкт для досліджень фізіологічних ефектів сигнальних посередників і стресових фітогормонів. *Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія*, 1(52), 89–97. (Особистий внесок дисертанта: участь у проведенні експериментів, обробці та інтерпретації результатів)

8. Колупаєв, Ю.Є., Бесчасный, С.П., Шкляревский, М.А., & Карпец, Ю.В. (2020). Монооксид углерода (CO) у растений: участие в клеточном сигналинге и адаптивных реакциях. *Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія*, 2(50), 35–53. (Особистий внесок дисертанта: аналіз і узагальнення даних літератури, участь у підготовці тексту статті)

#### **Матеріали конференцій:**

9. Shkliarevskiy, M. A., Karpets, Yu. V., Kolupaev, Yu. E., Lugova, G. A., & Bessonova, V. P. (2020). Nitric oxide as mediator in induction of heat resistance of wheat seedlings by donor of carbon monoxide hemine. *Сучасні проблеми генетики, біотехнології і біохімії сільськогосподарських рослин. Тези доповідей Міжнародної наукової конференції (Одеса, Україна, 21 жовтня 2020 р.)* (С. 136–137). Одеса: СГІ–НЦНС.

10. Shkliarevskiy, M. A., Kolupaev, Yu. E., Yastreb, T. O., Karpets, Yu. V., & Dmitriev, A. P. (2021). Participation of the jasmonate signaling transcription factor JIN1/MYC2 in implementing protective effects of NO, H<sub>2</sub>S, and CO on Arabidopsis plants under salt stress. *Plants stress and adaptation. Proceedings of the International scientific conference (Kharkiv, Ukraine, February 25-26, 2021)* (pp. 24–25). Kharkiv: KhNAU.

11. Шкляревский, М. А., Карпец, Ю. В., Швиденко, Н. В., & Колупаев, Ю. Е. (2020). Сероводород как возможный посредник индуцирования теплоустойчивости проростков пшеницы экзогенной салициловой кислотой. *Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем. Тезисы докладов Международной научной конференции (Минск, Беларусь, 17–19 июня 2020 г.)* (С. 100). Минск: БГУ.

12. Kolupaev, Yu. E., Karpets, Yu. E., Shkliarevskiy, M. A., & Svidenko, M. V. (2019). Nitric oxide, synthesized by nitrate reductase, as participant of transduction of hydrogen sulphide signal at induction of heat resistance of wheat plantlets. *Proceedings of 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation* (Yaremche, Ukraine, June 18-21, 2019) (P. 126). Lviv: IFNMU.

13. Kolupaev, Yu. E., Karpets, Yu. V., Shkliarevskiy, M. A., Yemets, A. I., & Blume, Ya. B. (2021). Gasotransmitters and plant adaptation to hyperthermia. *Plants stress and adaptation. Proceedings of the International scientific conference (Kharkiv, Ukraine, February 25-26, 2021)* (pp. 14–15). Kharkiv: KhNAU.

### **Апробація результатів дисертації**

Основні положення роботи викладено та обговорено на наукових конференціях:

1. Міжнародна наукова конференція «6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation» (Яремче, Україна, 18-21 червня 2019 р., форма участі – заочна)

2. Міжнародна наукова конференція «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» (Мінськ, Білорусь, 17–19 червня 2020 р., форма участі – заочна);

3. Міжнародна наукова конференція «Сучасні проблеми генетики, біотехнології і біохімії сільськогосподарських рослин» (Одеса, Україна, 21 жовтня 2020 р., форма участі – заочна);

4. Міжнародна наукова конференція «Plants stress and adaptation» (Харків, Україна, 25-26 лютого 2021 р., форма участі – усна доповідь).