

УДК 581.1

КАЛЬЦИЙ И КОМПОНЕНТЫ ЛИПИДНОГО СИГНАЛИНГА В РЕАЛИЗАЦИИ ВЛИЯНИЯ СЕРОВОДОРОДА НА СОСТОЯНИЕ УСТЬИЦ ARABIDOPSIS THALIANA

Т.О. ЯСТРЕБ^{1,1}, Ю.Е. КОЛУПАЕВ^{1,2,1}, Е.Н. ГАВВА^{1,1},
М.А. ШКЛЯРЕВСКИЙ^{1,1}, А.П. ДМИТРИЕВ^{3,2}

¹ Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева, п/о Докучаевское-2, 62483, Харьков, Украина

² Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, площадь Свободы, 4, 61022, Харьков, Украина

³ Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, 03143, Киев, ул. Академика Заболотного, 148, Украина

E-mail: plant_biology@ukr.net¹, dmitriev.ap@gmail.com²

Исследовали временную и концентрационную зависимость влияния донора сероводорода гидросульфида натрия (NaHS) на состояние устьиц листьев Arabidopsis thaliana дикого типа (Col-0), а также роль кальция и фосфолипаз в реализации его эффектов. Обработка листьев NaHS в диапазоне концентрации 5–250 мкМ вызывала уменьшение величины апертуры устьиц. Максимальный эффект закрывания устьиц наблюдали через 90 мин после начала обработки донором H₂S, а через 180 мин экспозиции апертура устьиц в вариантах с NaHS, наоборот, была значительно шире, чем в контроле. Влияние обработки листьев растворами NaHS на состояние устьиц полностью устранялось скавенджером сероводорода гидроксиламином, что свидетельствует о специфичности эффектов NaHS как донора H₂S. Вызываемое донором сероводорода уменьшение устьичной апертуры и относительного количества открытых устьиц почти полностью нивелировалось предобработкой листьев блокатором кальциевых каналов хлоридом лантана, хелатором внеклеточного кальция ЭГТА, ингибитором фосфолипазы С неомицином и антагонистом образования циклической аденозин-5'-дифосфатрибозы никотинамидом. Также устьичный эффект донора H₂S частично устранялся антагонистом кальмодулина хлорпромазином. Нивелирование действия донора сероводорода на состояние устьичного аппарата листьев арабидопсиса отмечалось и при предварительной обработке листьев бутанолом-1 – ингибитором зависимого от фосфолипазы D образования фос-

фатидной кислоты. Сделано заключение о значении поступления кальция в цитозоль из различных компартментов, а также посредников липидного сигналинга, образующихся с участием фосфолипаз С и D, в реализации действия сероводорода на состояние устьиц.

Ключевые слова: Arabidopsis thaliana, устьица, сероводород, кальций, липидный сигналинг.

Введение. В настоящее время сероводород (H₂S) наряду с монооксидом азота и монооксидом углерода рассматривается в качестве одного из важных газотрансмиттеров растительных клеток [1, 2]. Предполагается, что H₂S задействован в реализации многих адаптивных реакций растений. Показаны эффекты повышения содержания эндогенного сероводорода в растительных клетках при действии стресс-факторов различной природы: обезвоживания [3], солевого стресса [4], экстремальных температур [1], ионов тяжелых металлов [5, 6] и пр.

В последние годы накоплен значительный объем сведений о повышении устойчивости растений к различным стрессорам под влиянием экзогенного сероводорода. Так, при обработке донорами сероводорода зарегистрировано повышение резистентности растений к гипертермии [7–9], засолению [10, 11], ионам тяжелых металлов [12], УФ-В [13], засухе [14, 15].

По крайней мере, одним из механизмов участия сероводорода в адаптации растений

© Т.О. ЯСТРЕБ, Ю.Е. КОЛУПАЕВ, Е.Н. ГАВВА,
М.А. ШКЛЯРЕВСКИЙ, А.П. ДМИТРИЕВ, 2019

к обезвоживанию может быть его влияние на состояние устьиц. Так, показано, что при действии осмотического стресса, индуцируемого полиэтиленгликолем, у растений арабидопсиса Col-0 устьичная апертура уменьшалась, в то время как у мутантов *des*, дефектных по генам ферментов синтеза сероводорода цистеиндесульфгидраз, она почти не изменялась [16]. Воздействие 100 мкМ гидросульфидом натрия в течение 90 мин вызывало уменьшение апертуры устьиц у растений арабидопсиса [17]. Обработка эпидермиса листьев сладкого картофеля 100 мкМ NaHS вызывала увеличение относительного количества полностью закрытых устьиц [18]. В то же время в работах Lisjak и соавт. [19, 20] было показано увеличение устьичной апертуры у растений арабидопсиса и перца после 2,5-часовой обработки эпидермиса 100 и 200 мкМ NaHS на свету. Такая обработка предотвращала и закрытие устьиц в темноте. Выявлено увеличение относительного количества открытых устьиц у растений риса, обработанных 100 мкМ раствором гидросульфида натрия [21]. Показано, что при обработке отделенных листьев арабидопсиса органическим донором сероводорода GYY4137 (morpholin-4-ium-4-methoxyphenyl [morpholino] phosphinodithioate) в концентрации 100 мкМ через 90 мин происходило закрытие устьиц, а через 120 мин, наоборот, отмечалось увеличение апертуры с последующим уменьшением к 180 мин [22]. Таким образом, эффекты доноров сероводорода на состояние устьиц могут иметь сложную временную динамику. Однако работа Honda et al. (2015) пока единственная, в которой изучена динамика действия донора сероводорода GYY4137 на апертуру устьиц. Временные особенности влияния более популярного донора сероводорода NaHS, насколько нам известно, до сих пор не изучались.

Влияние сероводорода на устьичную апертуру, как и других индукторов закрытия устьиц, связано с изменением состояния ионных каналов. В работе Paranatsiou и соавт. [23] сообщается об открывании калиевых каналов (K^{+}_{out}) замыкающих клеток устьиц табака при обработке донором сероводорода GYY4137. Каналы K^{+}_{out} у растений арабидопсиса открывались и при обработке NaHS, в этом про-

цессе как посредники задействованы внеклеточный АТФ и активные формы кислорода (АФК), генерируемые под влиянием НАДФН-оксидазы [24]. Также выявлена активация сероводородом анионных каналов S-типа (SLAC1) с участием протеинкиназы OST1 [24].

Исследованиями Honda и соавт. [22] показано, что обработка листьев арабидопсиса проницаемым для клеток хелатором кальция снимала вызываемое GYY4137 закрытие устьиц. Однако вопрос об участии внеклеточного кальция и различных его внутриклеточных пулов в индуцированном сероводородом закрытии устьиц пока остается открытым.

В регуляции состояния устьиц могут принимать участие и липидные компоненты клеточного сигналинга. Например, показано, что закрытие устьиц у *Nicotiana glauca*, вызываемое абсцизовой и жасмоновой кислотами, нивелируется при обработке эпидермиса бутанолом-1 – ингибитором образования фосфатидной кислоты, зависящего от фосфолипазы D (ФЛ D) [25]. Фосфатидная кислота рассматривается как возможный активатор НАДФН-оксидазы [26], которая генерирует АФК, задействованные в реализации устьичных эффектов сероводорода [24]. Однако на основании данных экспериментов с мутантами арабидопсиса по генам различных форм ФЛ D было высказано предположение о наличии «раздвоенного» пути передачи сигнала сероводорода, который включает в себя независимое участие НАДФН-оксидазы и фосфолипазы D в регуляции состояния устьиц [17]. В целом же экспериментальных данных о возможном участии компонентов липидного сигналинга в реализации устьичных эффектов доноров сероводорода пока недостаточно.

В связи с изложенным, целью работы было изучение ингибиторным методом вклада различных пулов кальция и фосфолипаз C и D в реализацию влияния донора сероводорода NaHS на состояние устьичного аппарата *Arabidopsis thaliana*.

Материалы и методы. В работе использовали пятидневные растения *Arabidopsis thaliana* L. дикого типа (Col-0), выращиваемые на модифицированной среде Хогланда при температуре 24/18 °С (день/ночь), освещении 6000 лк и фотопериоде 10 ч [27].

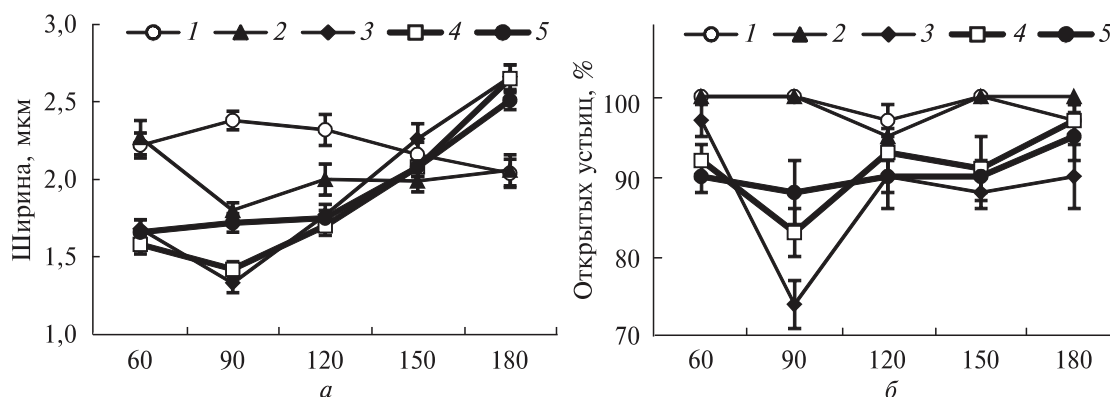


Рис. 1. Временная и концентрационная зависимости влияния донора сероводорода NaHS на ширину устьичной щели (а) и количество открытых устьиц (б); по горизонтали – время, мин. 1 – контроль; 2–5 – NaHS в концентрациях 5, 25, 100 и 250 мкМ, соответственно

Для достижения эффекта открывания устьиц розеточные листья выдерживали в течение 3 ч на холодном белом свете (8000 лк) при температуре 23 °С в чашках Петри с 10 мМ раствором KCl, приготовленном на 10 мМ Трис-HCl буфере (рН 6.15) без CO₂ [22]. После этого в среду вносили гидросульфид натрия в конечных концентрациях диапазона от 5 до 250 мкМ. Через 60, 90, 120, 150 и 180 мин инкубации в тех же световых условиях определяли аперттуру устьичной щели и относительное количество открытых устьиц. В опытах по исследованию действия скавенджера H₂S, антагонистов кальция и ингибиторов фосфолипаз на проявление устьичных эффектов донора сероводорода в среду инкубации устьиц добавляли поглотитель H₂S 1 мМ гидроксилламин, неспецифический блокатор кальциевых каналов 1 мМ LaCl₃, хелатор внеклеточного кальция 1 мМ ЭГТА, ингибитор фосфатидилинозитол-специфичной фосфолипазы С (ФИ-ФЛ С) 1 мМ неомидин, антагонист образования циклической аденозин-5'-дифосфатрибозы 5 мМ никотинамид, ингибитор зависимого от ФЛ D образования фосфатидной кислоты 0,1 % бутанол-1 или его неактивный изомер бутанол-2. Через 1 ч после инкубации листьев в среде с указанными соединениями в чашки с соответствующими вариантами вносили NaHS в конечной концентрации 25 мкМ, в присутствии которого листья инкубировали еще 90 мин. Концентрации антагонистов кальция и ингибиторов фосфолипаз, максимально модифицирующие

эффекты донора сероводорода, определяли на основании предварительных опытов. По окончании экспозиции с нижней стороны листьев снимали эпидермис и определяли устьичную аперттуру и относительное количество открытых устьиц, как описано ранее [28].

В каждом варианте оценивали состояние не менее 60 устьиц на листьях, взятых с шести разных растений. Опыты повторяли независимо 3–4 раза. На рисунках приведены средние величины и их стандартные ошибки. Кроме случаев, оговоренных отдельно, обсуждаются эффекты, достоверные при P ≤ 0,05.

Результаты исследований и их обсуждение. Уже через 60 мин после начала инкубации листьев в растворах, содержащих NaHS, в вариантах с концентрациями 25, 100 и 250 мкМ отмечалось достоверное уменьшение величины устьичной аперттуры (рис. 1, а). В контрольном варианте практически все устьица в той или иной степени были открытыми. В вариантах с NaHS относительное количество открытых устьиц немного, но достоверно уменьшалось (рис. 1, б). Через 90 мин экспозиции эффект проявлялся и при концентрации гидросульфидата натрия 5 мМ и усиливался при более высоких его концентрациях (рис. 1). В то же время через 150 мин проявление устьичных эффектов NaHS заметно уменьшалось и размеры аперттуры в опытных вариантах существенно не отличались от контроля, а через 180 мин, наоборот, в вариантах с 25, 100 и 250 мкМ NaHS они были достоверно выше,

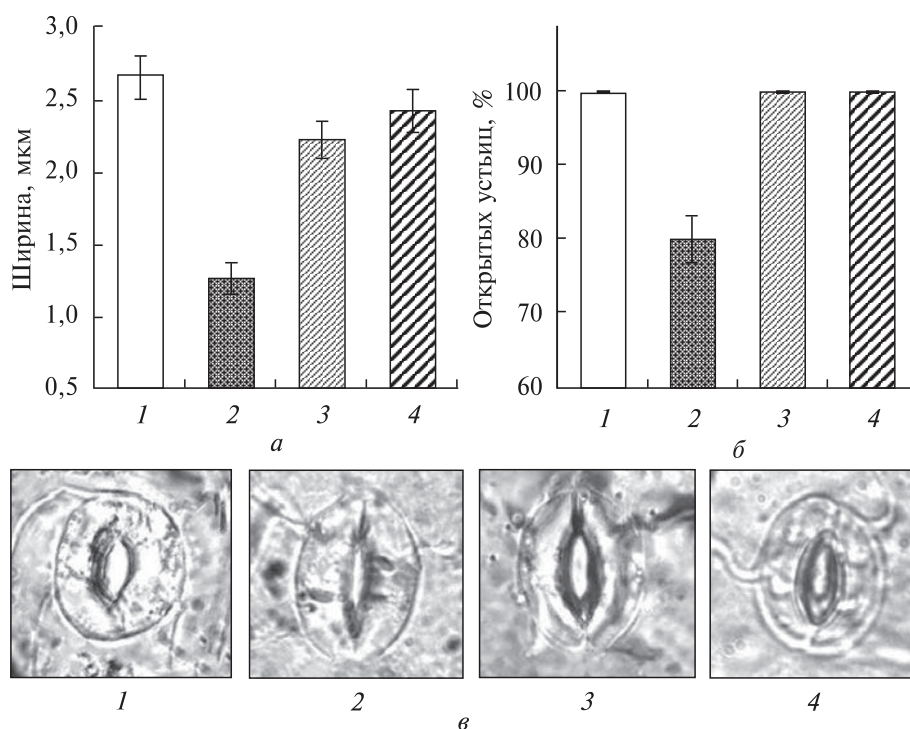


Рис. 2. Влияние сквенджера сероводорода гидроксиламина на проявление устьичных эффектов NaHS: *a* – размер устьичной щели; *б* – количество открытых устьиц; *в* – фото типичных устьиц. 1 – контроль; 2 – NaHS (25 мкМ); 3 – гидроксиламин (1 мМ); 4 – NaHS (25 мкМ) + гидроксиламин (1 мМ)

чем в контроле. При этом большая часть устьиц в опытных вариантах, как и в контрольных, была открытой (рис. 1, б). Таким образом, эффект закрывания устьиц при обработке листьев донором сероводорода был транзиторным.

Для доказательства специфичности устьичных эффектов NaHS как донора сероводорода изучали его совместное действие со сквенджером H₂S гидроксиламином. Сама по себе обработка листьев гидроксиламином вызывала небольшое уменьшение устьичной апертуры, однако этот эффект не был достоверным при $P \leq 0,05$ (рис. 2). В то же время под влиянием гидроксиламина полностью устранялся эффект NaHS как на величину апертуры, так и на количество открытых устьиц. Таким образом, есть основания полагать, что выявленные под влиянием обработки листьев гидросульфидом натрия эффекты закрывания устьиц обусловлены именно влиянием сероводорода, а не побочным действием NaHS и (или) NaOH, образующегося при его гидролизе.

В следующей серии опытов изучали роль изменений кальциевого гомеостаза в проявлении устьичных эффектов донора сероводорода. Обработка листьев блокатором кальциевых каналов разных типов хлоридом лантана сама по себе вызывала тенденцию к незначительному уменьшению устьичной апертуры, при этом предобработка LaCl₃ полностью устраняла влияние донора H₂S на состояние устьиц (рис. 3). Под влиянием хелатора внеклеточного кальция ЭГТА отмечалось заметное увеличение устьичной апертуры по сравнению с контролем, что согласуется с данными Suhita и соавт. [25], полученными на листьях растений *Nicotiana glauca*. При этом комплексон, как и блокатор кальциевых каналов, полностью снимал эффект экзогенного сероводорода.

При обработке листьев неомицином – ингибитором ФИ-ФЛ С, которая может быть задействована в образовании 1,4,5-инозитол-3-фосфата (IP₃), способного влиять на состояние внутриклеточных кальциевых каналов,

величина устьичной апертуры не изменялась (рис. 3). При этом неомицин нивелировал проявление устьичных эффектов NaHS. Никотинамид (антагонист образования циклической аденозин-5'-дифосфатрибозы, которая может открывать внутриклеточные кальциевые каналы, в частности, локализованные в тонопласте [29]) сам по себе не оказывал влияния на устьичную апертуру, однако в значительной степени уменьшал проявление действия донора сероводорода. Антагонист кальмодулина хлорпромазин, сам по себе не влияя на состояние устьиц, несколько уменьшал устьичный эффект донора сероводорода (рис. 3). Таким образом, все антагонисты кальция в той или иной степени угнетали проявление влияния донора сероводорода на величину устьичной апертуры. Следует отметить, что в их присутствии не только нивелировался эффект NaHS на ширину апертуры, но и отмечалось, по крайней мере частичное, открывание всех устьиц (результаты не приведены).

Известно, что бутанол-1 используется в качестве ингибитора образования фосфатидной кислоты в реакции, катализируемой ФЛ D [30]. Под его влиянием отмечалось незначительное (не достоверное при $P \leq 0,05$) уменьшение величины устьичной апертуры (рис. 4). При этом предобработка листьев 0,1%-ным бутанолом-1 по крайней мере частично снимала действие гидросульфида натрия на величину апертуры и количество открытых устьиц. В то же время неактивный изомер бутанол-2 слабо влиял на проявление устьичных эффектов донора сероводорода (рис. 4).

Итак, наши исследования показали транзитный характер закрывания устьиц при обработке листьев арабидопсиса NaHS (рис. 1). Эффект уменьшения величины апертуры под влиянием 25, 100 и 250 мкМ гидросульфида натрия, четко проявляющийся через 90 мин после начала обработки, сменялся ее увеличением через 180 мин эксперимента. Наши результаты во многом согласуются с данными о влиянии на апертуру замыкающих клеток другого донора сероводорода – GYY4137 [22]. По-видимому, сложной временной динамикой можно объяснить противоречие полученных разными авторами эффектов индуцирования

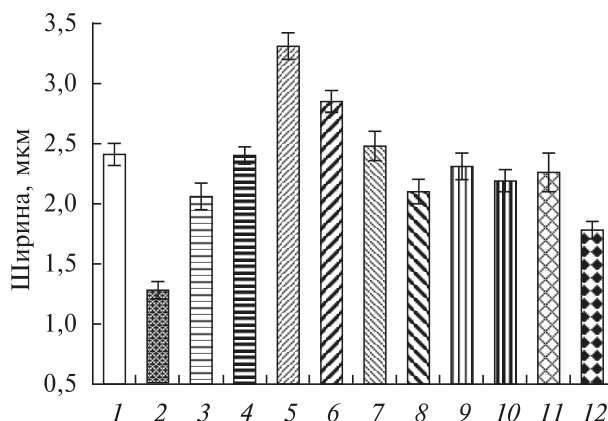


Рис. 3. Влияние антагонистов кальция на проявление устьичных эффектов NaHS: 1 – контроль; 2 – NaHS (25 мкМ); 3 – LaCl₃ (1 мМ); 4 – NaHS (25 мкМ) + LaCl₃ (1 мМ); 5 – ЭГТА (1 мМ); 6 – NaHS (25 мкМ) + ЭГТА (1 мМ); 7 – неомицин (1 мМ); 8 – NaHS (25 мкМ) + неомицин (1 мМ); 9 – никотинамид (5 мМ); 10 – NaHS (25 мкМ) + никотинамид (5 мМ); 11 – хлорпромазин (50 мкМ); 12 – NaHS (25 мкМ) + хлорпромазин (50 мкМ)

закрывания [17, 18] и открывания [19, 20] устьиц донорами сероводорода.

Вероятно, в реализации устьичных эффектов сероводорода участвуют различные пулы кальция. Действие донора сероводорода на состояние устьиц устранялось не только неспецифическим блокатором кальциевых каналов хлоридом лантана, но и соединениями, избирательно влияющими на поступление кальция в цитозоль из внеклеточного пространства и внутриклеточных компартментов (рис. 3). Нами впервые выявлено полное нивелирование эффекта донора сероводорода на состояние устьиц действием хелатора внеклеточного кальция ЭГТА (рис. 3). Однако, хотя и менее выраженный, но вполне достоверный эффект угнетения действия сероводорода проявлялся и при обработке листьев соединениями, предположительно влияющими на состояние внутриклеточных кальциевых каналов. Так, индуцируемое сероводородом закрывание устьиц угнеталось никотинамидом (рис. 3), подавляющим образование цАДФ-рибозы, способной открывать кальциевые каналы, локализованные в тонопласте [29]. В работе [22] получены косвенные данные, указывающие на роль этих кальциевых каналов в реализации устьичных

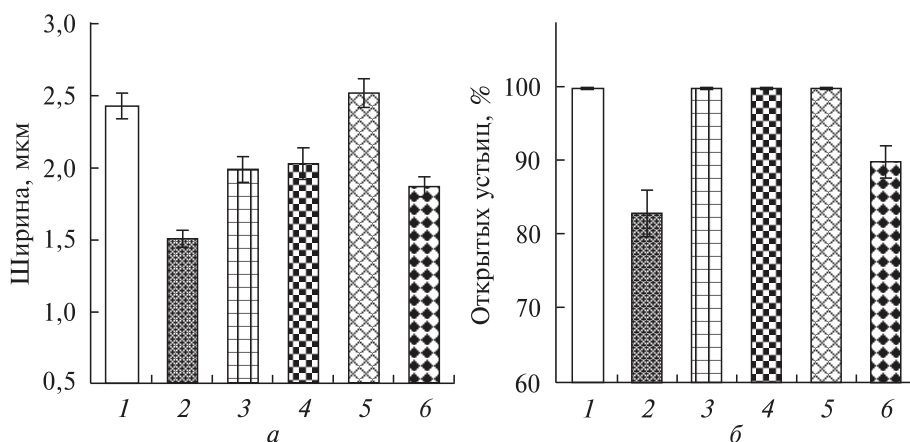


Рис. 4. Влияние бутанола-1 и бутанола-2 на проявление устьичных эффектов NaHS: а – размер устьичной щели; б – количество открытых устьиц. 1 – контроль; 2 – NaHS (25 мкМ); 3 – бутанол-1 (0,1%); 4 – NaHS (25 мкМ) + бутанол-1 (0,1%); 5 – бутанол-2 (0,1%); 6 – NaHS (25 мкМ) + бутанол-2 (0,1%)

эффектов донора сероводорода СУУ4137. При этом активация кальциевых каналов тонопласта, вероятно, происходит вследствие усиления синтеза NO под влиянием H₂S [22]. Иными словами, действие сероводорода на внутриклеточные кальциевые каналы может быть опосредовано оксидом азота.

В то же время в реализации влияния сероводорода на устьичный аппарат, вероятно, задействованы не только зависимые от цАДФ-рибозы кальциевые каналы. Так, нивелирование устьичного эффекта сероводорода, в частности, проявлялось при действии неомицина, который, связывая фосфатидилинозитолбифосфаты, может ингибировать ФИ-ФЛ С [31] и тем самым препятствовать накоплению продукта реакции – IP₃, влияющего на поступление кальция в цитозоль из внутриклеточных компартментов [32]. Правда, однозначно интерпретировать результаты экспериментов с использованием неомицина сложно. Как известно, в клетках животных ФИ-ФЛ С, катализируя процесс образования IP₃ и диацилглицерола (DAG), стимулирует поступление кальция в цитозоль. Это связано с открыванием под влиянием IP₃ чувствительных к нему внутриклеточных кальциевых каналов, а также с активацией DAG протекиназы С, участвующей в регуляции потенциалзависимых кальциевых каналов плазмалеммы. Несмотря на то, что в растениях до сих пор не обнаружены гомологи мишеней IP₃, известно,

что неомицин может уменьшать поступление кальция в цитозоль растительных клеток. Например, это соединение снимало эффект повышения концентрации кальция в клетках табака, вызываемый действием элиситора криптогеина [33]. Нивелирование неомицином закрывания устьиц, вызываемого АБК, также связывают с нарушением мобилизации кальция, зависимой от содержания IP₃ и активности ФИ-ФЛ С [34]. Следует отметить, что другой посредник, образующийся с участием ФИ-ФЛ С – DAG в растительных клетках в настоящее время рассматривается как предшественник фосфатидной кислоты, выполняющей разнообразные сигнальные функции [35]. Кроме того, фосфатидилинозитолбифосфат, который связывается неомицином, является кофактором фосфолипазы D, также участвующей в образовании фосфатидной кислоты [36].

В нашей работе получены результаты, косвенно указывающие на участие фосфатидной кислоты в реализации устьичных эффектов донора сероводорода. Вызываемое NaHS закрывание устьиц частично подавлялось бутанолом-1 (рис. 4), специфично ингибирующим образование фосфатидной кислоты [30]. Таким образом, на основании результатов ингибиторного анализа можно полагать, что в сложном пути действия сероводорода на состояние устьиц принимают участие два фермента липидного сигналинга – фосфолипазы С и D. Какова конкретная роль продуктов ре-

акций, катализируемых этими ферментами, в проявлении влияния сероводорода на состояние устьиц, пока не ясно. Возможно, что посредники, образующиеся под влиянием ФИ-ФЛ С, участвуют в регуляции кальциевого гомеостаза, а фосфатидная кислота, которая образуется под влиянием ФЛ D, может активировать НАДФН-оксидазу, генерирующую сигнал АФК, по-видимому, также необходимый для проявления индуцированного сероводородом эффекта закрытия устьиц у растений арабидопсиса. Так, у мутантов арабидопсиса по двум формам НАДФН-оксидазы (*rbohD* и *rbohE*) не происходило закрытия устьиц в ответ на обработку NaHS [17]. Хотя, как упоминалось выше, имеются и данные, указывающие на возможное влияние фосфатидной кислоты на состояние устьиц путем, независимым от АФК [17].

Наконец, ингибиторным методом нами получены результаты, указывающие на значение не только цитозольного кальция, но и кальмодулина в проявлении устьичных эффектов сероводорода (рис. 3). Следует отметить, что его участие в реализации действия H₂S на состояние устьиц до сих пор не исследовалось, хотя ингибиторным методом получены данные, указывающие на роль кальмодулина в устьичных эффектах АБК и метилжасмоната [25].

Таким образом, в целом можно констатировать, что действие сероводорода на состояние устьичного аппарата реализуются с участием цитозольного кальция (рис. 3), компонентов липидного сигналинга (рис. 4), АФК [17] и, вероятно, оксида азота [22]. По-видимому, эти посредники функционируют как взаимосвязанные элементы большой сигнальной сети, однако характер этих взаимосвязей еще предстоит исследовать.

CALCIUM AND COMPONENTS OF LIPID SIGNALING IN REALIZATION OF HYDROGEN SULFIDE INFLUENCE ON STATE OF STOMATA IN *ARABIDOPSIS THALIANA*

T.O. Yastreb, Yu.E. Kolupaev, E.N. Havva,
M.A. Shkliarevskiy, A.P. Dmitriev

Dokuchaev Kharkov National Agrarian University,
Kharkov, Ukraine
E-mail: plant_biology@ukr.net
Karazin Kharkov National University, Kharkov, Ukraine

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering,
NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
E-mail: dmitriev.ap@gmail.com

A time and concentration dependence of the hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide (NaHS) influence on the state of stomata of *Arabidopsis thaliana* (Col-0) leaves, as well as the role of calcium and phospholipases in the realization of its effects, was studied. Treatment of leaves with NaHS in concentration range of 5–250 μM caused a decrease in the size of stomatal aperture. The maximal effect of stomatal closure was observed 90 minutes after the beginning of the H₂S donor treatment and after 180 minutes of exposure the stomatal aperture in NaHS variants was, on the contrary, much wider than in the control. The effect of leaves' treatment with NaHS solutions on the stomata state was completely eliminated by hydroxylamine, the hydrogen sulfide scavenger, which indicates the specificity of NaHS effects as a H₂S donor. The decrease in stomatal aperture and relative number of open stomata caused by the donor of hydrogen sulfide was almost completely leveled off by the pre-treatment of leaves with the calcium channel blocker lanthanum chloride, the extracellular calcium chelator EGTA, the phospholipase C inhibitor neomycin, and the antagonist of the cyclic adenosine-5'-diphosphate ribose formation nicotinamide. Also, the stomatal effect of the H₂S donor was partially eliminated by the calmodulin antagonist chlorpromazine. The leveling of the hydrogen sulfide donor action on the state of stomatal apparatus of *Arabidopsis* leaves was also noted at the pre-treatment of leaves with butanol-1, an inhibitor of phospholipase D-dependent formation of phosphatidic acid. A conclusion was made about the value of calcium intake into the cytosol from various compartments, as well as lipid signaling mediators formed with the participation of phospholipases C and D, in the action of hydrogen sulfide on the state of stomata.

КАЛЬЦІЙ І КОМПОНЕНТИ ЛІПІДНОГО СИГНАЛІНГУ У РЕАЛІЗАЦІЇ ВПЛИВУ СІРКОВОДНЮ НА СТАН ПРОДИХІВ *ARABIDOPSIS THALIANA*

Т.О. Ястреб, Ю.Є. Колупаєв, К.М. Гавва,
М.А. Шклярєвський, О.П. Дмитрієв

Досліджували часову та концентраційну залежність впливу донора сірководню гідросульфід натрію (NaHS) на стан продихів листків *Arabidopsis thaliana* дикого типу (Col-0), а також роль кальцію та фосфоліпаз у реалізації його ефектів. Обробка листків NaHS в діапазоні концентрацій 5–250 мкМ викликала зменшення величини апертури продихів. Максимальний ефект закриття продихів спостерігали через 90 хв після початку обробки донором H₂S, а через 180 хв експозиції апертура продихів у

варіантах з NaHS, навпаки, була значно ширшою, ніж у контролі. Вплив обробки листків розчинами NaHS на стан продохів повністю усувався скавенджером сірководню гідроксиламіном, що свідчить про специфічність ефектів NaHS як донора H₂S. Спричинюване донором сірководню зменшення продигової апертури і відносної кількості відкритих продохів майже повністю нівелювалося передобробкою листків блокатором кальцієвих каналів хлоридом лантану, хелатором позаклітинного кальцію ЕГТА, інгібітором фосфоліпази С неоміцином і антагоністом утворення циклічного аденозин-5'-дифосфатрибози нікотинамідом. Так само продиговий ефект донора H₂S частково усувався антагоністом кальмодуліну хлорпромазином. Нівелювання дії донора сірководню на стан продигового апарату листків арабідопсису відзначалося і за попередньої обробки листків бутанолом-1 – інгібітором залежного від фосфоліпази D утворення фосфатидної кислоти. Зроблено висновок про значення надходження кальцію в цитозоль з різних компартментів, а також посередників ліпідного сигналу, що утворюються з участю фосфоліпаз С і D, при здійсненні впливу сірководню на стан продохів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Lisjak, M., Teklic, T., Wilson, I.D., Whiteman, M. and Hancock, J.T., Hydrogen sulfide: environmental factor or signalling molecule?, *Plant Cell Environ.*, 2013, vol. 36, no. 9, pp. 1607–16. doi: 10.1111/pce.12073.
2. Zhang, H., Hydrogen sulfide in plant biology. In: *Signaling and Communication in Plants. Gasotransmitters in Plants*, eds. Lamattina L., Garcia-Mata C. Switzerland: Springer International Publishing, 2016, pp. 23–51. doi: org/10.1007/978-3-319-40713-5_2.
3. Jin, Z.P., Shen, J.J., Qiao, Z.J., Yang, G.D., Wang, R. and Pei, Y.X., Hydrogen sulfide improves drought resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2011, vol. 414, no. 3, pp. 481–6. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.09.090.
4. Lai, D.W., Mao, Y., Zhou, H., Li, F., Wu, M., Zhang, J., He, Z., Cui, W. and Xie, Y., Endogenous hydrogen sulfide enhances salt tolerance by coupling the reestablishment of redox homeostasis and preventing salt-induced K⁺ loss in seedlings of *Medicago sativa*. *Plant Sci.*, 2014, vol. 225, pp. 117–29. doi: 10.1016/j.plantsci.2014.06.006.
5. Fang, H.H., Pei, Y.X., Tian, B.H., Zhang, L.P., Qiao, Z.J. and Liu, Z.Q., Ca²⁺ participates in H₂S induced Cr⁶⁺ tolerance in *Setaria italica*. *Chin. J. Cell Biol.* 2014, vol. 36, no. 6, pp. 758–65.
6. Shi, H., Ye, T. and Chan, Z., Nitric oxide-activated hydrogen sulfide is essential for cadmium stress response in bermudagrass (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.). *Plant Physiol. Biochem.*, 2014, vol. 74, pp. 99–107. doi: 10.1016/j.plaphy.2013.11.001.
7. Li, Z.G. and Zhu, L.P. Hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide-induced accumulation of betaine is involved in the acquisition of heat tolerance in maize seedlings. *Braz. J. Bot.*, 2014, vol. 38, no. 1, pp. 31–8. doi: org/10.1007/s40415-014-0106-x.
8. Yang, M., Qin, B.P., Ma, X.L., Wang, P., Li, M.L., Chen, L.L., Chen, L.T., Sun, A.Q., Wang, Z.L. and Yin, Y.P., Foliar application of sodium hydrosulfide (NaHS), a hydrogen sulfide (H₂S) donor, can protect seedlings against heat stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Integr. Agricult.*, 2015, vol. 15, no. 12, pp. 2745–58. doi: org/10.1016/S2095-3119(16)61358-8.
9. Kolupaev, Yu.E., Firsova, E.N., Yastreb, T.O. and Lugovaya, A.A., 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.*, 2017, vol. 53, no. 5, pp. 573–9. doi: org/10.1134/S0003683817050088.
10. Wang, Y., Li, L., Cui, W., Xu, S., Shen, W. and Wang, R., Hydrogen sulfide enhances alfalfa (*Medicago sativa*) tolerance against salinity during seed germination by nitric oxide pathway. *Plant Soil*, 2012, vol. 351, no. 1–2, pp. 107–119. doi: org/10.1007/s11104-011-0936-2.
11. Lai, D.W., Mao, Y., Zhou, H., Li, F., Wu, M., Zhang, J., He, Z., Cui, W. and Xie, Y., Endogenous hydrogen sulfide enhances salt tolerance by coupling the reestablishment of redox homeostasis and preventing salt-induced K⁺ loss in seedlings of *Medicago sativa*. *Plant Sci.*, 2014, vol. 225, pp. 117–129. doi: 10.1016/j.plantsci.2014.06.006.
12. Shi, H., Ye, T. and Chan, Z., Exogenous application of hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide enhanced multiple abiotic stress tolerance in bermudagrass (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.). *Plant Physiol. Biochem.*, 2013, vol. 71, pp. 226–234. doi: 10.1016/j.plaphy.2013.07.021.
13. Li, Z.G., Min, X. and Zhou, Z.H., Hydrogen sulfide: A signal molecule in plant cross-adaptation. *Front. Plant Sci.*, 2016, vol. 7, 1621. doi: 10.3389/fpls.2016.01621.
14. Zhang, H., Ye, Y.K., Wang, S.H., Luo, J.P., Tang, J. and Ma, D.F., Hydrogen sulfide counteracts chlorophyll loss in sweet potato seedling leaves and alleviates oxidative damage against osmotic stress. *Plant Growth Regul.*, 2009, vol. 58, no. 3, pp. 243–50. doi: org/10.1007/s10725-009-9372-1.
15. Kolupaev, Yu.E., Firsova, E.N., Yastreb, T.O., Kirichenko, V.V. and Ryabchun, N.I., Influence of hydrogen sulfide donor on state of antioxidant system and resistance of wheat plants to soil drought. *Russ. J. Plant Physiol.*, 2019, vol. 66 (in press).
16. Jin, Z., Wang, Z., Ma, Q., Sun, L., Zhang, L., Liu, Z., Liu, D., Hao, X. and Pei, Y. Hydrogen sulfide mediates ion fluxes inducing stomatal closure in response to drought stress in *Arabidopsis thaliana*.

- Plant Soil*, 2017, vol. 419, no. 1–2, pp. 141–52. doi: org/10.1007/s11104-017-3335-5.
17. Scuffi, D., Nietzel, T., Di Fino, L.M., Meyer, A.J., Lamattina, L., Schwarzländer, M., Laxalt, A.M. and García-Mata, C., Hydrogen sulfide 10 increases production of NADPH oxidase-dependent hydrogen peroxide and phospholipase D-derived phosphatidic acid in guard cell signaling. *Plant Physiol.*, 2018, vol. 176, no. 3, pp. 2532–42. doi: 10.1104/pp.17.01636.
 18. Hu, K.D., Tang, J., Zhao, D.L., Hu, L.Y., Li, Y.H., Liu, Y.S., Jones, R. and Zhang, H. Stomatal closure in sweet potato leaves induced by sulfur dioxide involves H₂S and NO signaling pathways. *Biol. Plant.*, 2014, vol. 58, no. 4, pp. 676–80. doi: org/10.1007/s10535-014-0440-7.
 19. Lisjak, M., Srivastava, N., Teklic, T., Civale, L., Lewandowski, K., Wilson, I., Wood, M.E., Whiteman, M. and Hancock, J.T., A novel hydrogen sulfide donor causes stomatal opening and reduces nitric oxide accumulation. *Plant Physiol. Biochem.*, 2010, vol. 48, no. 12, pp. 931–5. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.09.016.
 20. Lisjak, M., Teklić, T., Wilson, I.D., Wood, M.E., Whiteman, M. and Hancock, J.T. Hydrogen sulfide effects on stomatal apertures. *Plant Signal. Behav.* 2011, vol. 6, no. 10, pp. 1444–6. doi: 10.4161/psb.6.10.17104.
 21. Duan, B., Ma, Y., Jiang, M., Yang F., Ni, L and Lu, W. Improvement of photosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) as a result of an increase in stomatal aperture and density by exogenous hydrogen sulfide treatment. *Plant Growth Regul.*, 2015, vol. 75, no. 1, pp. 33–44. doi: org/10.1007/s10725-014-9929-5.
 22. Honda, K., Yamada, N., Yoshida, R., Ihara, H., Sawa, T., Akaike, T. and Iwai, S. 8-Mercapto-Cyclic GMP mediates hydrogen sulfide-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 2015, vol. 56, no. 8, pp. 1481–9. doi: 10.1093/pcp/pcv069.
 23. Papanatsiou, M., Scuffi, D., Blatt, M.R. and García-Mata, C. Hydrogen sulfide regulates inward-rectifying K⁺ channels in conjunction with stomatal closure. *Plant Physiol.*, 2015, vol. 168, no. 1, pp. 29–35. doi: org/10.1104/pp.114.256057.
 24. Wang, L., Ma, X., Che, Y., Hou, L., Liu, X. and Zhang, W. Extracellular ATP mediates H₂S-regulated stomatal movements and guard cell K⁺ current in a H₂O₂-dependent manner in *Arabidopsis*. *Sci. Bull.*, 2015, vol. 60, no. 4, pp. 419–27. doi: org/10.1007/s11434-014-0659-x.
 25. Suhita, D., Kolla, V.A., Vavasseur, A. and Raghavendra, A.S. Different signaling pathways involved during the suppression of stomatal opening by methyl jasmonate or abscisic acid. *Plant Sci.*, 2003, vol. 164, no. 4, pp. 481–8. doi: org/10.1016/S0168-9452(02)00432-6.
 26. Marino, D., Dunand, C., Puppo, A. and Pauly, N. A burst of plant NADPH oxidases. *Trends Plant Sci.*, 2012, vol. 17, no. 1, pp. 9–15. doi: 10.1016/j.tplants.2011.10.001.
 27. Yastreb, T.O., Kolupaev, Yu.E., Shvidenko, N.V., Lugovaya, A.A., and Dmitriev, A.P. Salt stress response in *Arabidopsis thaliana* plants with defective jasmonate signaling, *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2015, vol. 51, no. 4, pp. 451–4. doi: org/10.1134/S000368381504016X.
 28. Yastreb, T.O., Kolupaev, Yu.E., Lugovaya, A.A., and Dmitriev, A.P., Formation of adaptive reactions in *Arabidopsis thaliana* wild-type and mutant *jin1* plants under action of abscisic acid and salt stress, *Cytol. Genet.*, 2017, vol. 51, no. 5, pp. 325–30. doi: org/10.3103/S0095452717050115.
 29. Neill, S., Bright, J., Desikan, R., Hancock, J., Harrison, J. and Wilson I. Nitric oxide, evolution and perception. *J. Exp. Bot.* 2008, vol. 59, no. 1, pp. 25–35. doi: org/10.1093/jxb/erm218.
 30. Lanteri, M.L., Laxalt, A.M. and Lamattina, L. Nitric oxide triggers phosphatidic acid accumulation via phospholipase D during auxin-induced adventitious root formation in Cucumber. *Plant Physiol.*, 2008, vol. 147, no. 1, pp. 188–98. doi: 10.1104/pp.107.111815.
 31. Liu, H.T., Huang, W.D., Pan, Q.H., Weng, F.H., Zhan, J.C., Liu, Y., Wan, S.B. and Liu Y.Y. Contributions of PIP2-specific-phospholipase C and free salicylic acid to heat acclimation-induced thermotolerance in pea leaves. *J. Plant Physiol.*, 2006, vol. 163, no. 4, pp. 405–16. doi: org/10.1016/j.jplph.2005.04.027.
 32. Lee, Y. and Lee, Y. Roles of phosphoinositides in regulation of stomatal movements. *Plant Signal. Behav.*, 2008, vol. 3, no. 4, pp. 211–3.
 33. Lecourieux, D., Mazars, C., Pauly, N., Ranjeva, R. and Pugin, A. Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana glauca* cells. *Plant Cell*, 2002, vol. 14, no. 10, pp. 2627–41. doi: 10.1105/tpc.005579.
 34. Iakovenko, O.M., Kretynin, S.V., Kabachevskaya, E.M., Lyakhnovich, G.V., Volotovskii, D.I., and Kravets, V.S. Role of phospholipase C in ABA regulation of stomata function, *Ukr. Botan. Journ.*, 2008, vol. 65, no. 4, pp. 605–13.
 35. Arisz, S.A., Wijk, R., Roels, W., Zhu, J.K., Harling, M.A. and Munnik T. Rapid phosphatidic acid accumulation in response to low temperature stress in *Arabidopsis* is generated through diacylglycerol kinase. *Front. Plant Sci.*, 2013, vol. 4, 1. doi: 10.3389/fpls.2013.00001.
 36. Pappan, K., Zheng, S. and Wang, X. Identification and characterization of a novel plant phospholipase D that requires polyphosphoinositides and submicromolar calcium for activity in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, no. 11, pp. 7048–54. doi: 10.1074/jbc.272.11.7048.

Поступила в редакцию 16.07.18
 После доработки 12.10.18
 Принята к публикации 18.03.19