https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.08.073
УДК 581.1

М.А. Шкляревський [1], Ю.Є. Колупаєв [1, 2], Ю.В. Карпець [1], М.В. Швиденко [1], О.П. Дмитрієв [3]

[1] Харківський національний аграрний університет ім. В.В. Докучаєва
[2] Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна
[3] Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ
E-mail: plant_biology@ukr.net

Вплив донора монооксиду вуглецю (CO) на теплостійкість проростків пшениці та генерацію ними активних форм кисню

Представлено членом-кореспондентом НАН України О.П. Дмитрієвим

Досліджено вплив геміну (донора монооксиду вуглецю (CO), що утворюється за рахунок дії гемоксигенази) на теплостійкість проростків пшениці і можливу участь активних форм кисню (АФК) як посередників у реалізації стрес-протекторних ефектів екзогенного CO. Обробка проростків геміном у концентраціях 0,5—5,0 мкМ спричинювала істотне підвищення їх стійкості до ушкоджувального прогріву (10 хв при температурі 45 °C). За умов дії геміну спостерігалося транзиторне збільшення вмісту пероксиду водню у коренях з максимумом через 2 год від початку обробки. Також тимчасово підвищувалася активність позаклітинної пероксидази. Обробка коренів інгібітором пероксидази азидом натрію усувала як спричинюване дією геміну підвищення активності позаклітинної пероксидази, так і зростання вмісту пероксиду водню у коренях. Водночас обробка інгібітором НАДФН-оксидази імідазолом майже не впливала на прояв ефекту підвищення вмісту H_2O_2 за умов дії геміну. У разі обробки проростків скавенджером пероксиду водню диметилтіосечовиною підвищення вмісту H_2O_2 та зростання теплостійкості після дії геміну не спостерігалося. Також усі досліджувані ефекти геміну усувалися під впливом скавенджера CO гемоглобіну. Зроблено висновок про роль генерованих позаклітинною пероксидазою АФК як посередників у процесі індукування теплостійкості проростків донором CO.

Ключові слова: *монооксид вуглецю, пероксид водню, сигнальні посередники, пероксидаза, теплостійкість, Triticum aestivum.*

Монооксид вуглецю (CO) є одним із газотрансмітерів тваринних і рослинних клітин [1]. CO як сигнальна молекула взаємодіє з іншими посередниками та фітогормонами і таким чином бере участь у регуляції ростових процесів та адаптивних реакцій рослин [1]. У рослинних клітинах, як і в тваринних, монооксид вуглецю утворюється переважно за допомо-

Цитування: Шкляревський М.А., Колупаєв Ю.Є., Карпець Ю.В., Швиденко М.В., Дмитрієв О.П. Вплив донора монооксиду вуглецю (CO) на теплостійкість проростків пшениці та генерацію ними активних форм кисню. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2020. № 8. С. 73—80. https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.08.073

гою гемоксигенази, яка в присутності НАДФН/фередоксинредуктази, фередоксину або аскорбату перетворює молекулу гему на білівердин IXα з вивільненням іонів Fe^{2+} та CO [2]. Серед чотирьох виявлених у рослин генів гемоксигеназ найбільш інтенсивно експресується *HO1*. Саме експресія гена гемоксигенази-1 зазвичай посилюється в стресових умовах, зокрема у разі зневоднення [3], дії солей [4] і високих температур [5].

Для досліджень фізіологічних ефектів CO у рослинних і тваринних клітинах зазвичай використовують його донори, які є штучними субстратами для гемоксигенази, зокрема гематин [6] та гемін [7]. У ряді робіт показано підвищення стійкості рослин до осмотичного [3], сольового [8] стресів, іонів важких металів [9] 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 у разі дії гематину [6] та підвищення ендогенного вмісту CO в умовах гіпертермії [5]. 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. Водночас показано, що спричинюваний CO або його донорами ефект закривання продихів у бобів залежить від АФК, утворюваних за участю НАДФН-оксидази [10]. З іншого боку, встановлено, що протекторний вплив CO на кореневу систему пшениці за умов сольового стресу пов'язаний з пригніченням ним експресії гена НАДФН-оксидази та зниженням її активності [8]. Такий ефект запобігав розвитку програмованої загибелі клітин коренів у разі сильного сольового стресу.

АФК генеруються рослинними клітинами не лише за допомогою НАДФН-оксидази, а й інших ферментів, зокрема пероксидаз. Останні також можуть бути задіяні в реалізації ефектів монооксиду вуглецю. Наприклад, виявлено, що стимуляція розвитку коренів під дією CO пригнічувалася в присутності інгібітора пероксидази саліцилгідроксамової кислоти [11].

На час виконання нашого дослідження не було жодної роботи, в якій би вивчалася можлива участь АФК як сигнальних посередників у реалізації стрес-протекторної дії донорів CO. Зважаючи на це, ми ставили за мету встановити можливу роль АФК у реалізації фізіологічних (стрес-протекторних) ефектів CO на проростки пшениці за умов гіпертермії, а також з'ясувати, які саме АФК-генеруючі ферменти активуються внаслідок обробки коренів проростків донором CO геміном.

Матеріли і методи. Насіння пшениці озимої м'якої (*Triticum aestivum* L.) сорту Досконала після поверхневого знезараження 6 % пероксидом водню протягом 30 хв пророщували в темряві при температурі 20–22 °C впродовж трьох діб. Після цього у середовище інкубації проростків додавали гемін у кінцевих концентраціях 0,05–50 мкМ та інкубували на ньому проростки протягом доби. Контрольні зразки інкубували на очищеній водопровідній воді.

В окремих серіях експериментів вивчали вплив скавенджера CO гемоглобіну (10 мкМ), скавенджера пероксиду водню диметилтіосечовини (ДМТС, 150 мкМ), інгібітора пероксидази азиду натрію (NaN_3, 1 мМ) та інгібітора НАДФН-оксидази імідазолу (10 мкМ). Вказані речовини вводили у середовище інкубації за 2 год до внесення в нього геміну. Концентрації цих сполук вибирали за результатами попередніх дослідів.

Під час інкубації проростків на досліджуваних розчинах визначали генерацію коренями супероксидного аніон-радикала, вміст у них пероксиду водню та активність позаклітинної пероксидази. Після закінчення інкубації на розчинах геміну та досліджуваних інгі-

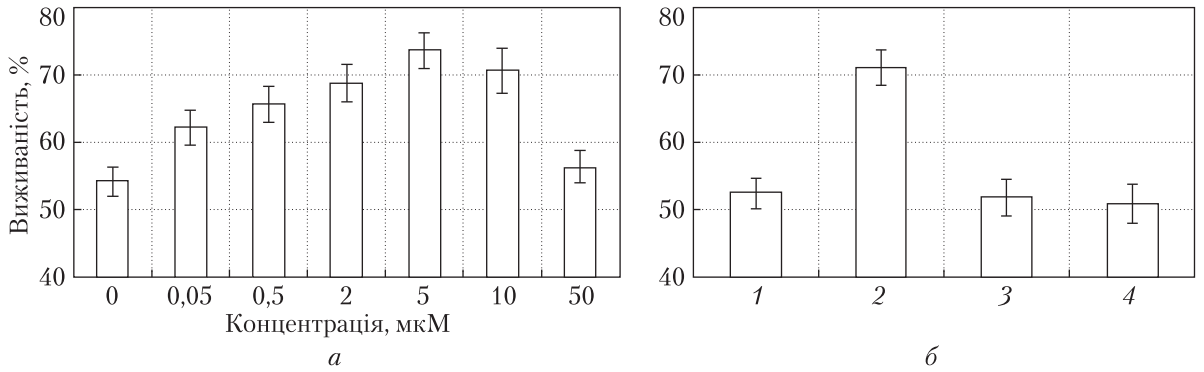

Рис. 1. Концентраційна залежність впливу геміну на виживаність (%) проростків пшениці після ушкоджувального прогріву (*а*) і модифікація ефектів скавенджером CO гемоглобіном (*б*). *1* — контроль; *2* — гемін (5 мкМ); *3* — гемоглобін (10 мкМ); *4* — гемін (5 мкМ) + гемоглобін (10 мкМ)

біторів проростки піддавали ушкоджувальному прогріву у водяному ультратермостаті при 45 °С протягом 10 хв [12]. Надалі їх переносили на очищену водопровідну воду і витримували протягом трьох діб при температурі 20–22 °С та освітленні 6000 лк для оцінки виживаності.

Генерацію супероксидного радикала коренями інтактних проростків визначали за перетворенням нітросинього тетразолію на формазан як описано раніше [12]. Вміст пероксиду водню аналізували феротіоціанатним методом [13]. Активність позаклітинної пероксидази в інтактних коренях визначали за методом [14].

На рисунках наведені середні величини та їх стандартні похибки. Достовірність різниці результатів експериментів оцінювали з використанням *t*-критерію Стьюдента. Крім випадків, відзначених окремо, обговорюються результати, достовірні при $P \leqslant 0{,}05$.

Результати досліджень та їх обговорення. Обробка проростків геміном у концентраціях 0,5—10 мкМ спричиняла помітне підвищення їх стійкості до потенційно летального теплового стресу (рис. 1, *а*). Найбільш помітний ефект відзначався під дією 5 мкМ донора CO. Зважаючи на це, у подальших дослідженнях використовували саме цю концентрацію геміну.

Обробка проростків 10 мкМ гемоглобіном не впливала на їх теплостійкість (див. рис. 1, *б*). При цьому в присутності гемоглобіну стрес-протекторний вплив геміну повністю усувався. 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 під час перетворення геміну гемоксигеназою-1 (іони Fe^{2+} та білівердин) [2].

Обробка геміном слабо змінювала генерацію супероксидного аніон-радикала коренями проростків (рис. 2, *а*). Так, лише через 1,5—2,0 год від початку інкубації в середовищі з геміном відзначалася тенденція до посилення утворення $O_2^{\bullet -}$ (ефект достовірний при $P \leqslant 0{,}1$). Водночас у разі дії геміну спостерігалося істотне підвищення вмісту пероксиду водню в коренях проростків (див. рис. 2, *б*). Зміни були транзиторними: достовірне при $P \leqslant 0{,}05$ підвищення кількості H_2O_2 спостерігалося вже за 1 год від початку обробки, через 2 год відзначався максимальний ефект, надалі вміст пероксиду водню в коренях знижувався і на момент закінчення інкубації (24 год) не відрізнявся від контролю.

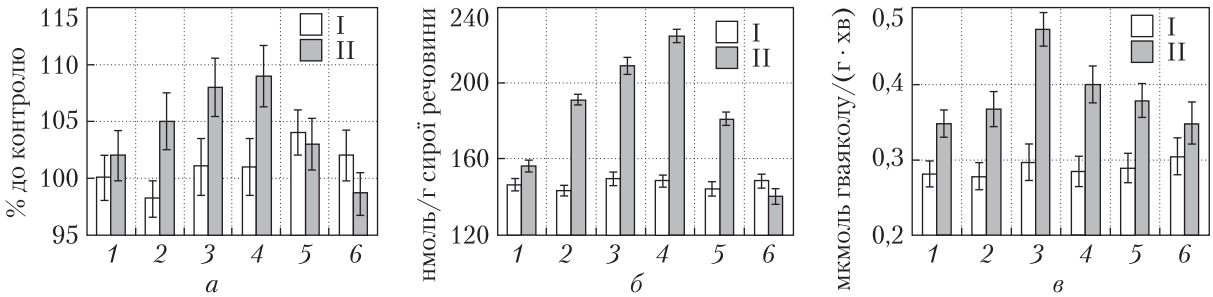

Рис. 2. Генерація супероксидного аніон-радикала (*а*, % до контролю у першій точці спостережень), вміст пероксиду водню (*б*, нмоль/г сирої речовини) і активність позаклітинної пероксидази (*в*, мкмоль гваяколу/(г · хв)) у коренях проростків пшениці. I — контроль; II — гемін (5 мкМ); *1 — 6* — через 0,5, 1, 1,5, 2, 4 і 6 год інкубації проростків на середовищі з геміном відповідно

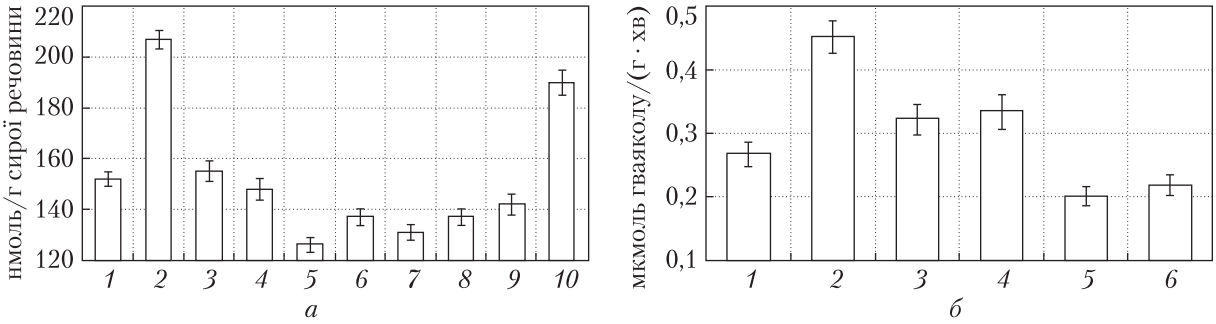

Рис. 3. Вплив геміну, гемоглобіну, ДМТС, азиду натрію та імідазолу на вміст пероксиду водню (*а*, нмоль/г сирої речовини) і активність позаклітинної пероксидази в коренях проростків пшениці (*б*, мкмоль гваяколу/(г · хв)). *а*: *1* — контроль; *2* — гемін (5 мкМ); *3* — гемоглобін (10 мкМ); *4* — гемін (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); *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).

Примітка. Вміст пероксиду водню у коренях визначали через 2 год від початку обробки геміном та/або через 4 год від початку обробки антагоністами СО або АФК; активність позаклітинної пероксидази аналізували через 1,5 год від початку дії геміну та/або через 3,5 год від початку обробки гемоглобіном або азидом натрію

Одним із можливих ферментативних джерел утворення пероксиду водню клітинами коренів можуть бути позаклітинні (апопластні) форми пероксидази [14]. Зважаючи на це, визначали її динаміку під час впливу геміну на корені проростків. Гемін спричиняв підвищення активності ферменту вже через 0,5 год від початку обробки (див. рис. 2, *в*). Максимальні величини відзначалися через 1,5 год інкубації коренів у присутності донора СО. Таким чином, динаміка активності позаклітинної пероксидази за характером була подібною до динаміки вмісту пероксиду водню, а підвищення активності ферменту дещо випереджало зростання кількості H_2O_2. Це вказує на те, що саме позаклітинна пероксидаза може бути ферментативним джерелом при посиленні утворення пероксиду водню коренями за умов обробки геміном.

Спричинюване дією геміну підвищення вмісту пероксиду водню в коренях проростків пшениці нівелювалося їх обробкою скавенджером СО гемоглобіном (рис. 3, *а*). При цьому

сам по собі гемоглобін не впливав на вміст H_2O_2 в коренях. Обробка коренів проростків антиоксидантом ДМТС знижувала вміст пероксиду водню і повністю усувала його підвищення у разі дії донора CO. Тенденція до зниження вмісту пероксиду водню відзначалася і у варіанті з обробкою інгібітором пероксидази азидом натрію. Він також повністю знімав підвищення кількості H_2O_2, спричинюване дією геміну. Водночас інгібітор НАДФН-оксидази імідазол практично не впливав на вміст пероксиду водню за умов обробки проростків донором CO.

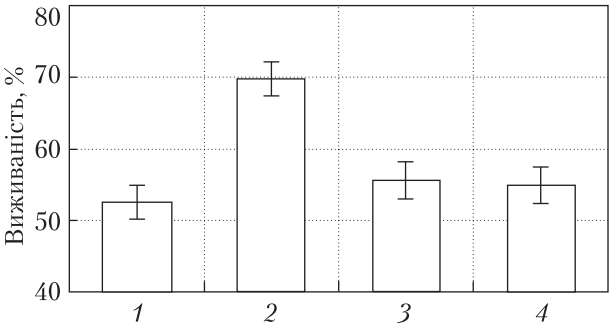

Рис. 4. Вплив геміну та ДМТС на виживаність (%) проростків пшениці після ушкоджувального прогріву. *1* — контроль; *2* — гемін (5 мкМ); *3* — ДМТС (150 мкМ); *4* — гемін (5 мкМ) + ДМТС (150 мкМ)

Активність позаклітинної пероксидази у присутності гемоглобіну дещо перевищувала величини контролю (див. рис. 3, *б*). При цьому у варіанті з поєднанням геміну та гемоглобіну активність ферменту була істотно нижчою порівняно з варіантом, коли застосовувався лише гемін. Це свідчить про зняття впливу геміну як донора CO його скавенджером гемоглобіном. Деяке зростання активності ферменту у варіанті з самим гемоглобіном, імовірно, пов'язане з його побічним ефектом. Можна припустити, що як гемовмісна сполука гемоглобін здатний посилювати синтез гемовмісних ферментів, до яких належить і пероксидаза. Водночас такий ефект у короткочасних експериментах є незначним, що дає змогу спостерігати принаймні часткове усунення гемоглобіном ефекту підвищення активності позаклітинної пероксидази, спричинюваного дією геміну.

У результаті обробки коренів проростків азидом натрію відзначалося зниження активності позаклітинної пероксидази (див. рис. 3, *б*). NaN_3 також знімав ефект підвищення активності ферменту у варіанті з дією на корені донора CO.

Таким чином, дані інгібіторного аналізу узгоджуються з результатами дослідження динаміки активності позаклітинної пероксидази та вмісту пероксиду водню у коренях проростків за умов їх обробки геміном і свідчать про те, що причиною посилення утворення АФК у них може бути підвищена активність позаклітинної пероксидази, а не НАДФН-оксидази.

Зростання вмісту пероксиду водню в коренях проростків під дією геміну, ймовірно, є процесом, необхідним для трансдукції сигналу CO в генетичний апарат і реалізації його стрес-протекторних ефектів. Про це свідчить нівелювання ефекту підвищення виживаності оброблених геміном проростків у разі їх одночасної обробки скавенджером пероксиду водню ДМТС (рис. 4).

Отже, спричинюване донором CO геміном підвищення теплостійкості проростків є залежним від АФК, які генеруються переважно позаклітинною пероксидазою. Ймовірною уявляється активація антиоксидантної системи за рахунок сигнального шляху CO/АФК. Варто відзначити, що феномен активації багатьох компонентів цієї системи дією CO отримано на різних об'єктах і за умов дії стресорів різної природи [3, 8].

Як уже зазначалося, участь АФК у реалізації стрес-протекторної дії CO на рослинні об'єкти спеціально не досліджувалася. Проте показано, що стимуляція розвитку кореневої

системи проростків пшениці, зумовлена дією геміну або гематину, пригнічувалася в присутності інгібітора пероксидази саліцилгідроксамової кислоти і скавенджера пероксиду водню йодиду калію [11]. Також залежним від АФК є спричинюване монооксидом вуглецю закривання продихів [10]. Але такий ефект, за даними авторів, ймовірно, залежить від іншого ферментативного джерела АФК — НАДФН-оксидази [10].

Таким чином, у нашій роботі вперше показана участь пероксиду водню як сигнального посередника в індукуванні стійкості проростків пшениці дією донора CO і роль позаклітинної пероксидази в утворенні АФК, причетних до передачі сигналу CO. Варто відзначити, що CO, ймовірно, реалізує свої сигнальні функції за рахунок взаємодії не тільки з АФК, а й з іншими посередниками, зокрема з NO [3] та іонами кальцію [15]. З'ясування їх ролі в сигналінгу CO, а також функціональної взаємодії цих посередників з АФК за умов індукування монооксидом вуглецю стійкості рослин до екстремальних температур може стати предметом подальших досліджень. Так само доцільним є встановлення конкретних протекторних систем, що активуються у разі дії на рослинні об'єкти екзогенного CO за участю АФК та інших сигнальних посередників.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Wang M., Liao W. Carbon monoxide as a signaling molecule in plants. *Front. Plant Sci.* 2016. **7.** Art. 572. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00572
2. Shekhawat G.S., Verma K. Haem oxygenase (HO): an overlooked enzyme of plant metabolism and defence. *J. Exp. Bot.* 2010. **61**, № 9. P. 2255–2270. https://doi.org/10.1093/jxb/erq074
3. Liu Y., Xu S., Ling T., Xu L., Shen W. Heme oxygenase/carbon monoxide system participates in regulating wheat seed germination under osmotic stress involving the nitric oxide pathway. *J. Plant Physiol.* 2010. **167**, № 16. P. 1371–1379. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.05.021
4. Verma K., Dixit S., Shekhawat G.S., Alam A. Antioxidant activity of heme oxygenase 1 in *Brassica juncea* (L.) Czern. (Indian mustard) under salt stress. *Turk. J. Biol.* 2015. **39**. P. 540—549. https://doi.org/10.3906/biy-1501-28
5. Cheng T., Hu L., Wang P., Yang X., Peng Y., Lu Y., Chen J., Shi J. Carbon monoxide potentiates high temperature-induced nicotine biosynthesis in Tobacco. *Int. J. Mol. Sci.* 2018. **19**. Art. 188. https://doi.org/10.3390/ijms19010188
6. Li Z.-G., Gu S.-P. Hydrogen sulfide as a signal molecule in hematin-induced heat tolerance of tobacco cell suspension. *Biol. Plant.* 2016. **60**. P. 595–600. https://doi.org/10.1007/s10535-016-0612-8
7. Chen Q., Gong C., Ju X., Zhu Z., Shen W., Shen Z., Cui J. Hemin through the heme oxygenase 1/ferrous iron, carbon monoxide system involved in zinc tolerance in *Oryza Sativa* L. *J. Plant Growth Regul.* 2018. **37**. P. 947–957. https://doi.org/10.1007/s00344-018-9793-z
8. Ling T., Zhang B., Cui W., Wu M., Lin J., Zhou W., Huang J., Shen W. 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.* 2009. **177**, № 4. P. 331—340. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.06.004
9. Meng D.K., Chen J., Yang Z.M. Enhancement of tolerance of Indian mustard (*Brassica juncea*) to mercury by carbon monoxide. *J. Hazard. Materials.* 2011. **186**, № 2—3. P. 1823—1829. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.12.062
10. She X.-P., Song X.-G. Carbon monoxide-induced stomatal closure involves generation of hydrogen peroxide in *Vicia faba* guard cells. *J. Integr. Plant Biol.* 2008. **50**. P. 1539—1548. https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00716.x
11. Xuan W., Huang L., Li M., Huang B., Xu S., Liu H., Gao Y., Shen W. Induction of growth elongation in wheat root segments by heme molecules: a regulatory role of carbon monoxide in plants? *Plant Growth Regul.* 2007. **52**. P. 41–51. https://doi.org/10.1007/s10725-007-9175-1

12. Kolupaev Yu.E., Oboznyi A.I., Shvidenko N.V. Role of hydrogen peroxide in generation of a signal inducing heat tolerance of wheat seedlings. *Russ. J. Plant Physiol.* 2013. **60**, № 2. P. 227—234. https://doi.org/10.1134/S102144371302012X
13. Sagisaka S. The occurrence of peroxide in a perennial plant, *Populus gelrica*. *Plant Physiol.* 1976. **57**, № 2. P. 308–309. https://doi.org/10.1104/pp.57.2.308
14. Minibayeva F.V., Gordon L.K., Kolesnikov O.P., Chasov A.V. Role of extracellular peroxidase in the superoxide production by wheat root cells. *Protoplasma*. 2001. **217**, № 1—3. P. 125—128. https://doi.org/10.1007/BF01289421
15. Sa Z.S., Huang L.Q., Wu G.L., Ding J.P., Chen X.Y., Yu T., Ci S., Shen W.B. Carbon monoxide: a novel antioxidant against oxidative stress in wheat seedling leaves. *J. Integr. Plant Biol.* 2007. **49**. P. 638—645. https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00461.x

Надійшло до редакції 21.05.2020

REFERENCES

1. Wang, M. & Liao, W. (2016). Carbon monoxide as a signaling molecule in plants. Front. Plant Sci., 7, art. 572. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00572
2. Shekhawat, G. S. & Verma, K. (2010). Haem oxygenase (HO): an overlooked enzyme of plant metabolism and defence. J. Exp. Bot., 61, No. 9, pp. 2255-2270. https://doi.org/10.1093/jxb/erq074
3. 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, No. 16, pp. 1371-1379. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.05.021
4. 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, pp. 540-549. https://doi.org/10.3906/biy-1501-28
5. Cheng, T., Hu, L., Wang, P., Yang, X., Peng, Y., Lu, Y., Chen, J. & Shi, J. (2018). Carbon monoxide potentiates high temperature-induced nicotine biosynthesis in Tobacco. Int. J. Mol. Sci., 19, art. 188. https://doi.org/10.3390/ijms19010188
6. 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, pp. 595-600. https://doi.org/10.1007/s10535-016-0612-8
7. 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, pp. 947-957. https://doi.org/10.1007/s00344-018-9793-z
8. Ling, T., Zhang, B., Cui, W., Wu, M., Lin, J., Zhou, W., Huang, J. & 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, No. 4, pp. 331-340. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.06.004
9. 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, No. 2-3, pp. 1823-1829. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.12.062
10. 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, pp. 1539-1548. https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00716.x
11. Xuan, W., Huang, L., Li, M., Huang, B., Xu, S., Liu, H., Gao, Y. & 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, pp. 41-51. https://doi.org/10.1007/s10725-007-9175-1
12. 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, No. 2, pp. 227-234. https://doi.org/10.1134/S102144371302012X
13. Sagisaka, S. (1976). The occurrence of peroxide in a perennial plant, *Populus gelrica*. Plant Physiol., 57, No. 2, pp. 308-309. https://doi.org/10.1104/pp.57.2.308

14. 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, No. 1-3, pp. 125-128. https://doi.org/10.1007/BF01289421
15. Sa, Z.S., Huang, L. Q., Wu, G. L., Ding, J. P., Chen, X. Y., Yu, T., Ci, S. & Shen, W. B. (2007). Carbon monoxide: a novel antioxidant against oxidative stress in wheat seedling leaves. J. Integr. Plant Biol., 49, pp. 638-645. https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00461.x

Received 21.05.2020

M.A. Shkliarevskyi [1], *Yu.E. Kolupaev* [1, 2],
Yu.V. Karpets [1], *M.V. Shvidenko* [1], *O.P. Dmitriev* [3]

[1] V.V. Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University
[2] V.N. Karazin Kharkiv National University
[3] Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of the NAS of Ukraine, Kyiv
E-mail: plant_biology@ukr.net

INFLUENCE OF CARBON MONOXIDE (CO) DONOR
ON HEAT RESISTANCE OF WHEAT PLANTLETS
AND GENERATION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES BY THEM

The influence of hemin (donor of carbon monoxide CO formed due to action of heme oxygenase) on the heat resistance of wheat plantlets and the possible participation of reactive oxygen species (ROS) as mediators in the realization of stress-protective effects of exogenous CO have been studied. The treatment of plantlets with hemin in the concentrations of 0.5-5.0 μM caused a significant increase in their resistance to the damaging heating (10 min at a temperature of 45 °C). Under the action of hemin, the transient increase in the content of hydrogen peroxide in roots was observed with the maximum in 2 hours after the treatment start. In addition, the extracellular peroxidase activity increased temporarily. The treatment of roots with the inhibitor of peroxidase — sodium azide — eliminated both the increase in the activity of extracellular peroxidase and the rise in the content of hydrogen peroxide in roots caused by the action of hemin. At the same time, the treatment with the inhibitor of NADPH oxidase — imidazole — had almost no influence on the effect of an increase in the content of H_2O_2 under the action of hemin. Under the treatment of plantlets with a scavenger of hydrogen peroxide — dimethylthiourea — both the rise in the H_2O_2 content and the increase in the heat resistance after the action of hemin are not observed. All studied effects of hemin were eliminated under the influence of CO scavenger hemoglobin. The conclusion is made about the role of ROS, generated by extracellular peroxidase, as the mediators in the process of induction of the heat resistance of plantlets by the CO donor.

Keywords: *carbon monoxide, hydrogen peroxide, signal mediators, peroxidase, heat resistance, Triticum aestivum.*