

# Uloga sumporovodika u otpornosti biljaka na stres uzrokovan teškim metalima

---

Tenžera, Laura

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of agriculture / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:390314>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-26**



Sveučilište Josipa Jurja  
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet  
agrobiotehničkih  
znanosti Osijek**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek - Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA  
**POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU**

Laura Tenžera

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Bilinogojstvo

**Uloga sumporovodika u otpornosti biljaka na stres uzrokovan  
teškim metalima**

**Završni rad**

Osijek, 2017.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA  
**POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU**

Laura Tenžera

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Bilinogojstvo

**Uloga sumporovodika u otpornosti biljaka na stres uzrokovan  
teškim metalima**

**Završni rad**

Osijek, 2017.

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA  
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU**

Laura Tenžera

Preddiplomski studij, smjer Bilinogojstvo

**Uloga sumporovodika u otpornosti biljaka na stres uzrokovan  
teškim metalima  
Završni rad**

Povjerenstvo za ocjenu završnog rada:

1. doc.dr.sc. Miroslav Lisjak, mentor
2. prof.dr.sc. Tihana Teklić, član
3. prof.dr.sc. Brigita Popović, član

Osijek, 2017.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Poljoprivredni fakultet u Osijeku  
Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda, smjer Bilinogojstvo

Završni rad

Laura Tenžera

### **Uloga sumporovodika u otpornosti biljaka na stres uzrokovan teškim metalima**

#### **Sažetak:**

Sumporovodik je treći otkriveni plinoviti prenositelj staničnog signala kod biljaka, uz ugljik monoksid i dušik oksid. Dugo se smatralo da je on toksičan za rast i razvoj biljaka zbog toga jer su se u istraživanjima koristile previsoke doze spomenutog spoja. Međutim, promjenom pristupa u istraživanjima i korištenjem mikromolarnih doza ovog plina, sve je više dokaza o njegovoj pozitivnoj ulozi kod biljaka uzgajanih u uvjetima biotskog ili abiotskog stresa. Prisustvo teških metala u povećanim koncentracijama u agrikulturnim tlima je vrlo čest problem u suvremenoj poljoprivredi, koji izazivajući stres na molekularnoj i staničnoj razini, značajno smanjuju kvalitetu i kvantitetu prinosa. Zbog dokazanih pozitivnih učinaka, vanjska upotreba donora sumporovodika može uvelike pomoći biljkama da lakše prevladaju stres izazvan teškim metalima, smanjujući štetne efekte osmotskog, ionskog te oksidativnog stresa u stanicama. U ovom je radu prikazan pregled literature i trenutnih znanstvenih spoznaja, koja se bave navedenom problematikom na staničnoj, genetskoj i molekularnoj razini.

**Ključne riječi:** sumporovodik, teški metali, stres, natrij hidrogensulfid

21 stranica, 13 slika, 21 literaturnih navoda

Završni rad je pohranjen u: Knjižnici Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku i u digitalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek  
Faculty of Agriculture in Osijek  
Undergraduate university study Agriculture, course Plant production

BSc thesis

Laura Tenžera

### **The role of hydrogen sulfide in plant heavy metal stress resistance**

#### **Summary:**

Hydrogen sulfide is the third discovered gasotransmitter, beside the carbon monoxide and nitric oxide. For a long time it has been considered as a toxic to the plant growth and development because the doses of before mentioned compound used in the researches were too high. However, by changing approach in the research and using micromolar doses of this gas, there is growing evidence of its positive role in plants grown under biotic or abiotic stress. The presence of heavy metals in increased concentrations in agricultural soils is a very common problem in modern agriculture, causing stress on molecular and cellular levels that significantly reduce the quality and quantity of yield. Due to proven positive effects, the external usage of hydrogen sulfide can greatly help plants to overcome stress caused by heavy metals, reducing the harmful effects of osmotic, ionic and oxidative stress in cells. This paper presents an overview of literature and current scientific knowledge that deals with the above-mentioned problem at the cell, genetic and molecular level.

**Key words:** hydrogen sulfide, heavy metals, stress, sodium hydrosulfide

21 pages, 13 figures, 21 references

BSc Thesis is archived in Library of Faculty of Agriculture in Osijek and in digital repository of Faculty of Agriculture in Osijek

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Sumpor.....	1
1.2. Sumporovodik i njegova uloga kod biljaka .....	1
1.3. Stres kod biljaka.....	2
2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA .....	4
2.1. Zaštitna uloga sumporovodika u uvjetima stresa izazvanog povećanom koncentracijom teških metala .....	4
3. ZAKLJUČAK.....	19
4. POPIS LITERATURE.....	20

# 1. UVOD

## 1.1. Sumpor

Sumpor (S) je halkogeni element smješten na 16. mjestu (VI. B) skupine periodnog sustava elemenata. U čistom stanju krutina je svijetložute boje bez okusa i mirisa. Elementarni sumpor koji se dobiva iz nalazišta u površinskim dijelovima Zemljine kore i iz svojih spojeva ima sposobnost stvaranja jake, jednostruke kovalentne veze između vlastitih atoma ( $-S-S-$ ). Iz nalazišta sumpor se dobiva tzv. Fraschovim postupkom koji obuhvaća više od 80 % svjetske proizvodnje sumpora i staljivanjem iz kamenja u specijalnim pećnicama, tzv. kalkaronima i fornima. Iz spojeva se dobiva oksidacijom sumporovodika ( $H_2S$ ) po Clausovu postupku koji se svodi na spaljivanje tekućine  $H_2S$  i oksidacije preostalog  $H_2S$  nastalim  $SO_2$ . Kao katalizatori u ovome postupku koriste se boksit, aktivni ugljen ili crveni mulj ( $Fe(OH)_3$ ), (Kovačević i Žugaj 1996.). Biljke najviše usvajaju sumpor kao anion  $SO_4^{2-}$  i u tom obliku se nalazi u protoplazmi biljaka kao mineralna rezerva. Kod ugradnje u organsku tvar potrebna je redukcija sumpora, ali se lako usvaja i iz atmosfere u obliku  $SO_2$  koji se također prije ugradnje u organsku tvar mora reducirati. Fiziološka funkcija sumpora je vrlo značajna jer je konstituent mnogih vitalnih spojeva i ima opće ionsko djelovanje kao elektrolit protoplazme zbog većeg prisustva sulfata. Redukcija sumpora u biljkama odvija se u kloroplastima i još uvijek je nedovoljno poznat proces (Vukadinović i Lončarić 1998.).

## 1.2. Sumporovodik i njegova uloga kod biljaka

Uloga sumporovodika ( $H_2S$ ) kao signalne molekule kod biljaka je već dugi niz godina predmet raznih istraživanja (Koch i sur., 1990.). Zbog štetnosti pri visokim koncentracijama i dokazanog toksičnog djelovanja na biološke sustave došlo je do njegovog zapostavljanja i smanjenja interesa od strane znanstvenika u daljnjem znanstvenom istraživanju o mogućim pozitivnim učincima koje  $H_2S$  može imati na čovjeka i biljke. Ovaj plin pri normalnim uvjetima posjeduje otrovnost jednaku cijanovodiku, a nekoliko puta veću otrovnost od ugljikovog monoksida. Unatoč tome, njegova uloga u biljci od značajne je važnosti jer oksidacijom ovoga spoja, biljci je pristupačna značajna količina sumpora kojega može usvojiti. U životnom ciklusu biljaka  $H_2S$  je važan makronutrijent, jer utječe na vigor sjemena, rast biljaka, prinos usjeva i dr. (Wang, 2012.; Rennenberg i sur. 1983.). Od svih sulfida može se reći da je najznačajniji upravo sumporovodik koji se otapa u vodi te nastaje sulfidna kiselina koja je kisele pH vrijednosti

(Filipović, Lipanović, 1995.). Dokazan je značajan utjecaj sumporovodika u odgovoru biljaka na stres koji izazivaju niske temperature, u uvjetima stresa izazvanoga teškim metalima te pri uvjetima stresa nastalog zbog povišenog sadržaja soli.

### **1.3. Stres kod biljaka**

Stres se često definira kao djelovanje nekog abiotskog i/ili biotskog čimbenika koji nepovoljno utječe na rast i razvitak biljaka. Prilagodba biljke uvjetima stresa može biti postignuta aklimatizacijom, odnosno jačanjem otpornosti na stres (plastično i reverzibilno) nakon kraćeg izlaganja nepovoljnom utjecaju, a adaptacija (prilagodba) se odnosi na genetski predodređen stupanj otpornosti na stres. Kako su biljke vezane za mjesto svoga rasta, imaju ograničenu mogućnost izbjegavanja nepovoljnih utjecaja u svome okruženju, npr. ekstremne temperature, nestašicu vode, nedostatak ili suvišak svjetla ili hranjivih tvari, ozljeđivanje (vremenske nepogode, herbivori) ili napad patogena (bakterije, gljivice, virusi, viroidi). Iz toga razloga biljke su razvile sofisticirane i vrlo različite oblike molekularno-kemijske strategije (morfološke i anatomske promjene, pripreme za nepovoljne uvjete tj. proces klijanja) kako bi se uspjele obraniti od abiotskog ili biotskog stresa. Priprema biljaka na stres podsjeća na sposobnost pamćenja, međutim, taj mehanizam memoriranja ne ovisi o živčanome sustavu kao kod životinja pa se najčešće koristi izraz „otisak stresa“. Ovaj fenomen vjerojatno ima uzrok u promjeni koncentracije ključnih signalnih metabolita, odnosno proteina, ili pak čimbenicima genske transkripcije (Vukadinović i sur., 2014.).

Brojna dosadašnja istraživanja razjasnila su mehanizam prilagodbe biljaka pomoću epigenetske kontrole stresa. Ona uključuje regulaciju gena i fenotipske promjene kao odgovor biljaka na stres. Pokazalo se da kao odgovor na stres dolazi do metiliranja DNA što rezultira fenotipskim varijacijama biljaka. U procesu metilacije DNA sudjeluju pokretljivost transpozona (DNA sekvence koje mogu promijeniti svoju poziciju unutar genoma), siRNA (*Small interfering RNA*) i metiltransferaza.





**Slika 1.** Mehanizam memoriranja stresa (stresni otisak) biljaka. (Izvor: Vukadinović i sur. 2014.)

Moguće je da epigenetski faktori izazivaju dugoročne promjene u genima ili pak njihovoj ekspresiji, odnosno signali iz okoline utječu na regulaciju genske ekspresije (Slika 1.), što dovodi do povećane genomske fleksibilnosti te se prenosi na slijedeće generacije (Vukadinović i sur. 2014.).

## 2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

### 2.1. Zaštitna uloga sumporovodika u uvjetima stresa izazvanog povećanom koncentracijom teških metala

Ali i sur. (2014.) su istraživali ulogu sumporovodika na biljkama uljane repice izložene povećanim koncentracijama olova u hranjivoj otopini. Biljke uljane repice uzgajane do stadija petog lista u supstratu su prenešene na Hoagland hranjivu otopinu u kontroliranim uvjetima optimalnim za rast biljaka u navedenoj fazi. Nakon sedam dana aklimatizacije u dodane su dvije koncentracije olova (100 i 400  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ) te dvije različite koncentracije donora sumporovodika (100 i 200  $\mu\text{M}$  NaHS) kao i njihove kombinacije. Petnaest dana nakon tretmana ispitivani su morfološki pokazatelji stresa (svježa i suha tvar, sadržaj klorofila), mineralni sastav (Na, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu, Zn, P, S,  $\text{NO}_3$ ), izmjerene su razine lipidne peroksidacije te je određena produkcija slobodnih kisikovih radikala - ROS (vodik peroksida, superoksidnog i hidroksilnog radikala). Određena je aktivnost stresnih enzima askorbat-peroksidaze (APX), superoksid-dismutaze (SOD), katalaze (CAT) te sadržaj askorbinske kiseline i oksidiranog (GSSG) i reduciranog glutaciona (GSH) kao intermedijarnih metabolita askorbat-glutacion ciklusa. Dobiveni rezultati morfoloških pokazatelja rasta biljaka upućuju na pozitivnu zaštitnu ulogu  $\text{H}_2\text{S}$  u uvjetima stresa uzrokovanog teškim metalima. Utvrđen je manji gubitak u svježoj i suhoj masi stabljike, korijena i lista u usporedbi s tretmanima gdje nije dodan sumporovodik, gdje je došlo do prosječno 73 %-tne redukcije svježe i suhe mase. Nisu utvrđene značajne razlike u navedenim pokazateljima u odnosu na kontrolu pri tretmanima gdje olovo nije dodano. Aplikacija NaHS u hranjivu otopinu je rezultirala povećanjem sadržaja klorofila i karotenoida kod biljaka uzgajanih pri povećanoj koncentraciji olova te je najizraženiji efekt bio pri 400  $\mu\text{M}$  Pb i 200  $\mu\text{M}$  NaHS gdje je u prosjeku sadržaj fotosintetskih pigmenata povećan za 41 % u usporedbi s varijantom gdje NaHS nije dodavan. Sadržaj kalija, kalcija i magnezija u listovima i korijenu je bio značajno povećan u varijanti gdje je uz olovo (400  $\mu\text{M}$ ) dodan i NaHS (200  $\mu\text{M}$ ). Pri višoj koncentraciji olova došlo je do redukcije usvajanja mikronutrijenata (Fe, Mn, Cu, Zn) i makronutrijenata (N, P, S). Niža koncentracija sumporovodika nije rezultirala promjenama u sastavu mikro- i makroelemenata u korijenu i listu dok je viša koncentracija  $\text{H}_2\text{S}$  značajno povećala sadržaj svih nutrijenata kod biljaka pri 400  $\mu\text{M}$  olova. Primjena  $\text{H}_2\text{S}$  nije značajno utjecala na lipidnu peroksidaciju i produkciju ROS kod kontrolnih biljaka, međutim u prisustvu olova, gdje je došlo do povećanja i jednog i drugog navedenog parametra,  $\text{H}_2\text{S}$  je pokazao

zaštitnu ulogu kroz smanjenje produkcije ROS i sadržaja MDA (Slika 2.). Autori zaključuju da je uslijed aktivacije antioksidativnih mehanizama u kojima sudjeluje H<sub>2</sub>S došlo do smanjene produkcije ROS, a time posljedično i do smanjene razine lipidne peroksidacije. Povećanje aktivnosti antioksidativnih enzima u kombiniranim varijantama gdje su simultano dodavani olovo i sumporovodik, autori pripisuju posredničkoj ulozi sumporovodika u stresu induciranom prisustvom olova kroz „sakupljanje“ slobodnih kisikovih radikala te stimulatивно djelovanje na antioksidativne mehanizme. Primjena H<sub>2</sub>S povećala je akumulaciju neenzimatskih antioksidanasa poput GSH i GSSG i askorbinske kiseline u listovima i korijenu uljane repice (Slika 3. i 4.). Autori ovu zaštitnu ulogu H<sub>2</sub>S pripisuju sljedećem ciklusu: reakcija s lipidnim radikalima što zaustavlja daljnju lipidnu peroksidaciju te aktivaciju enzimatskih i neenzimatskih mehanizama obrane od oksidativnog stresa.

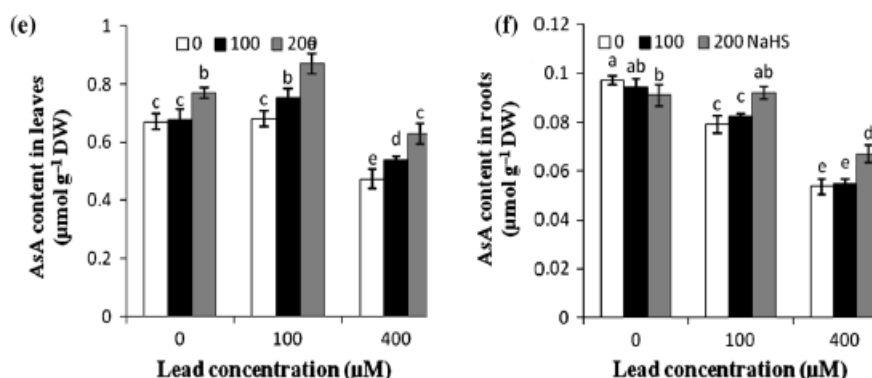
**Table 5** Effects of different treatments of NaHS ( $\mu\text{M}$ ) and lead (Pb) ( $\mu\text{M}$ ) on malondialdehyde (MDA), hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), superoxide radical ( $\text{O}_2^-$ ) and hydroxyl ion ( $^-\text{OH}$ ) contents in the leaves and roots of *Brassica napus* cv. ZS 758

NaHS conc.	Pb conc.	MDA contents ( $\text{nmol mg}^{-1}$ protein)		$\text{H}_2\text{O}_2$ contents ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW)		$\text{O}_2^-$ contents ( $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ DW)		$^-\text{OH}$ contents ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW)	
		Leaf	Root	Leaf	Root	Leaf	Root	Leaf	Root
0	0	8.14 $\pm$ 0.45 e	14.22 $\pm$ 0.56 e	19.73 $\pm$ 1.86 e	9.57 $\pm$ 0.48 e	66.59 $\pm$ 2.68 ef	23.45 $\pm$ 1.67 e	0.60 $\pm$ 0.01 f	0.076 $\pm$ 0.001 ef
	100	13.58 $\pm$ 0.68 c	17.66 $\pm$ 0.41 d	27.63 $\pm$ 1.81 c	16.50 $\pm$ 0.95 c	73.81 $\pm$ 3.47 d	34.52 $\pm$ 1.16 c	1.34 $\pm$ 0.02 c	0.084 $\pm$ 0.003 cd
	400	18.22 $\pm$ 0.49 a	26.98 $\pm$ 0.92 a	36.95 $\pm$ 1.67 a	23.59 $\pm$ 1.31 a	136.62 $\pm$ 4.55 a	47.42 $\pm$ 1.71 a	1.53 $\pm$ 0.01 a	0.098 $\pm$ 0.003 a
100	0	8.18 $\pm$ 0.34 e	14.55 $\pm$ 0.95 e	20.52 $\pm$ 1.84 de	9.45 $\pm$ 0.50 e	64.66 $\pm$ 2.71 ef	21.52 $\pm$ 2.04 ef	0.61 $\pm$ 0.01 f	0.074 $\pm$ 0.003 ef
	100	10.63 $\pm$ 0.49 d	13.27 $\pm$ 0.54 e	23.37 $\pm$ 2.07 d	13.57 $\pm$ 0.77 d	69.99 $\pm$ 3.10 de	31.19 $\pm$ 2.28 d	0.87 $\pm$ 0.01 e	0.079 $\pm$ 0.002 de
	400	15.08 $\pm$ 0.53 b	22.36 $\pm$ 0.43 b	31.42 $\pm$ 2.09 b	19.32 $\pm$ 1.23 b	122.28 $\pm$ 4.59 b	42.71 $\pm$ 1.68 b	1.42 $\pm$ 0.04 b	0.092 $\pm$ 0.001 b
200	0	8.09 $\pm$ 0.38 e	14.57 $\pm$ 0.89 e	19.64 $\pm$ 1.65 e	9.78 $\pm$ 0.42 e	61.80 $\pm$ 3.01 f	19.80 $\pm$ 1.05 f	0.57 $\pm$ 0.03 f	0.067 $\pm$ 0.003 g
	100	8.32 $\pm$ 0.27 e	11.48 $\pm$ 0.75 f	19.56 $\pm$ 2.01 e	9.45 $\pm$ 0.39 e	51.46 $\pm$ 2.66 g	24.18 $\pm$ 2.31 e	0.62 $\pm$ 0.02 f	0.073 $\pm$ 0.002 f
	400	12.78 $\pm$ 0.43 c	19.50 $\pm$ 0.84 c	28.55 $\pm$ 1.69 bc	17.20 $\pm$ 0.51 c	103.74 $\pm$ 4.51 c	39.04 $\pm$ 1.93 b	1.05 $\pm$ 0.03 d	0.087 $\pm$ 0.003 bc

Values are mean  $\pm$  SD (n = 3). Means followed by the same letter did not significantly differ at  $P \leq 0.05$  according to Duncan's multiple range test

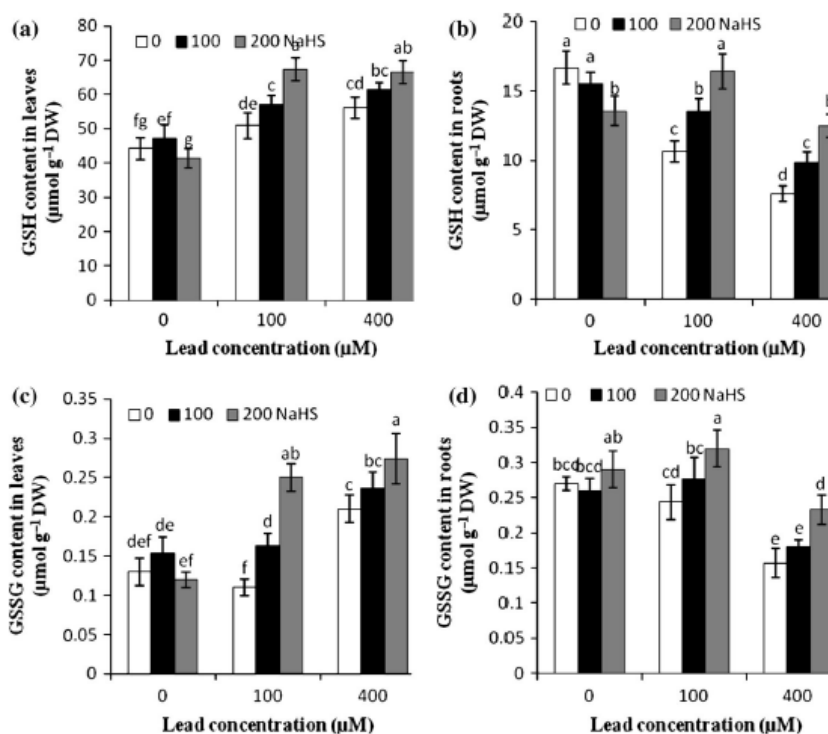
**Slika 2.** Utjecaj različitih tretmana NaHS ( $\mu\text{M}$ ) i olova ( $\mu\text{M}$ ) na sadržaj malondialdehida (MDA), vodik peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), superoksida ( $\text{O}_2^-$ ) i hidroksil iona ( $^-\text{OH}$ ) u listovima i korijenu kod *Brassica napus* cv. ZS 758. (Izvor: Ali i sur. 2014.)

**Fig. 2** Effects of different treatments of NaHS ( $\mu\text{M}$ ) and lead (Pb) ( $\mu\text{M}$ ) on glutathione reductase (GR) in a leaves and b roots, soluble protein contents (TSP) in c leaves and d roots and ascorbic acid (AsA) content in e leaves and f roots of *Brassica napus* cv. ZS 758. Values are mean  $\pm$  SD (n = 3). Means followed by the same letter did not significantly differ at  $P \leq 0.05$  according to Duncan's multiple range test



**Slika 3.** Utjecaj različitih tretmana NaHS ( $\mu\text{M}$ ) i olova ( $\mu\text{M}$ ) na sadržaj askorbinske kiseline (AsA) u listovima (e) i korijenu (f) *Brassica napus* cv. ZS 758. (Izvor: Ali i sur. 2014.)

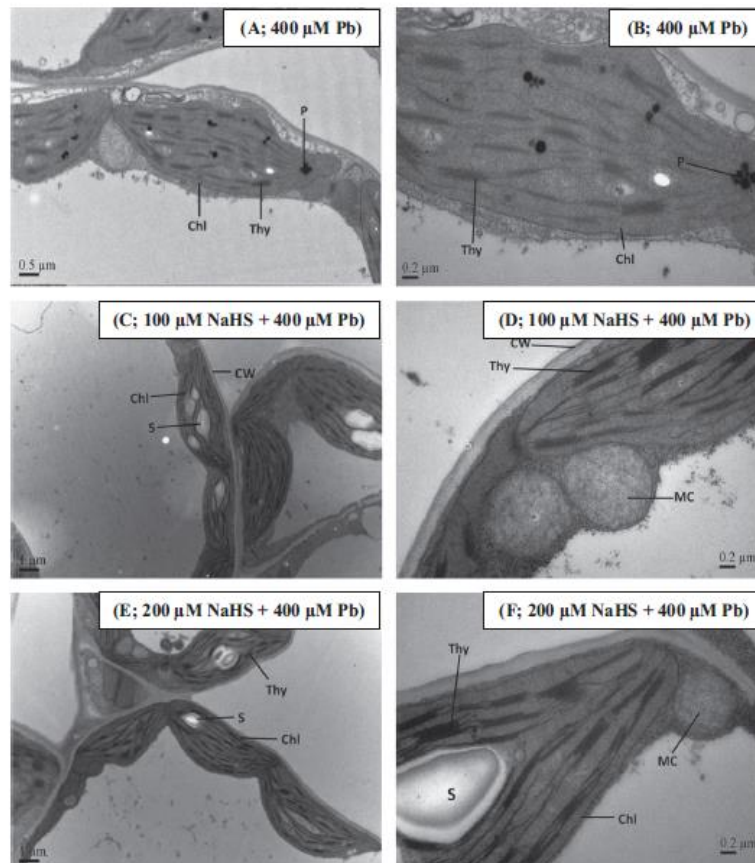
**Fig. 3** Effects of different treatments of NaHS ( $\mu\text{M}$ ) and lead (Pb) ( $\mu\text{M}$ ) on reduced glutathione (GSH) content in a leaves and b roots, oxidized glutathione (GSSG) content in c leaves and d roots, total glutathione (GSH + GSSG) content in e leaves and f roots, and reduced/oxidized glutathione (GSH/GSSG) ratio in g leaves and h roots of *Brassica napus* cv. ZS 758. Values are mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Means followed by the same letter did not significantly differ at  $P \leq 0.05$  according to Duncan's multiple range test



**Slika 4.** Utjecaj različitih tretmana NaHS ( $\mu\text{M}$ ) i olova ( $\mu\text{M}$ ) na sadržaj reduciranog glutationa (GSH) u (a) listovima i korijenu (b), oksidiranog glutationa (GSSG) u (c) listovima i (d) korijenu *Brassica napus* cv. ZS 758. (Izvor: Ali i sur. 2014.)

Ali i sur. (2014.) su u istom pokusu ispitivali utjecaj toksičnih koncentracija olova te zaštitne uloge sumporovodika na morfološke, fiziološke i histološke pokazatelje efikasnosti procesa fotosinteze. Dokazali su da više koncentracije olova ( $400 \mu\text{M}$ ) značajno mijenjaju morfologiju listova i korijena smanjujući lisnu površinu, ukupni volumen korijena, promjer glavnog vretena te broj korijenovih izdanaka. Toksični efekt olova pripisuje se njegovom štetnom utjecaju na širok spektar fizioloških procesa, poremećajima biljne ishrane, inhibiciji stanične diobe što se naravno negativno odražava i na samu morfologiju (Sharma i Dubey, 2005.; Eun i sur., 2000.; Islam i sur. 2007.). Značajno smanjenje negativnog učinka olova na morfologiju listova i korijena je utvrđeno kod biljaka u varijanti gdje je uz olovo dodano i  $200 \mu\text{M}$  NaHS. Autori ovakav rezultat pripisuju zaštitnoj ulozi sumporovodika koja se očituje kroz povećanje aktivnosti antioksidativnih enzima koji sudjeluju u detoksifikaciji reaktivnih kisikovih jedinki. Tretman olovom značajno je smanjio pokazatelje efikasnosti fotosinteze: ukupnu fotosintezu i transpiraciju, provodljivost puči te unutarstaničnu koncentraciju  $\text{CO}_2$ .

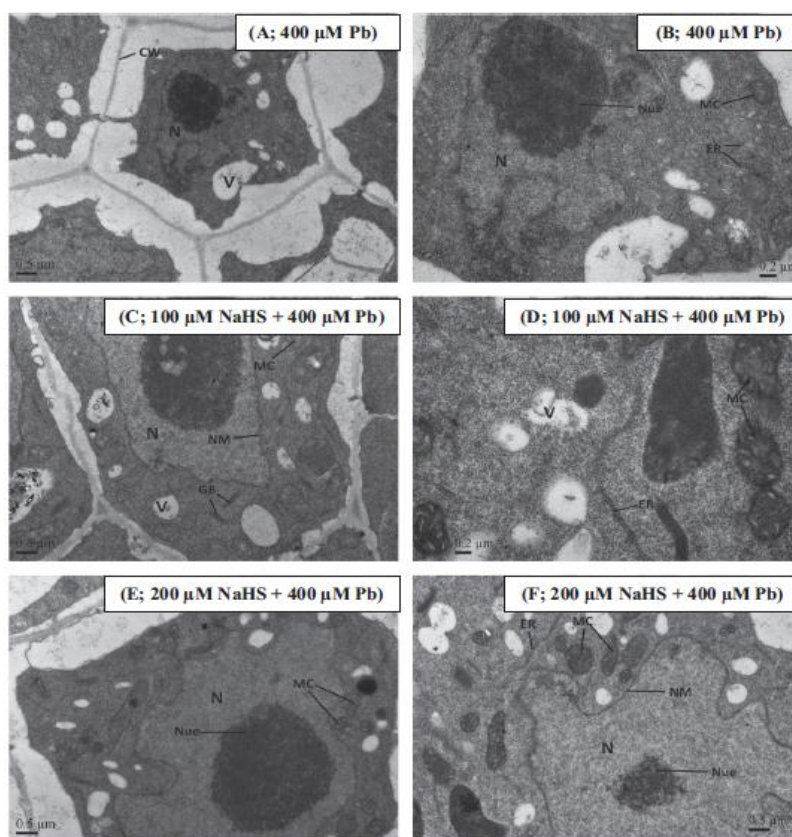
Međutim, u usporedbi s kontrolnim biljkama, u varijantama tretmana gdje je dodan sumporovodik ovaj pad pokazatelja fotosinteze nije bio tako izražen. Aplikacija H<sub>2</sub>S kod biljaka uzgajanih pri povećanim koncentracijama olova rezultirala je značajno većim SPAD indeksom u listovima, u usporedbi s tretmanom gdje H<sub>2</sub>S nije apliciran, te poboljšanjem fotokemijske efikasnosti procesa fotosinteze (Fv/Fm; varijabilna/maksimalna fluorescencija).



**Fig. 2.** Electron micrographs of leaf mesophyll cells of 15-day-hydroponically grown seedlings of *Brassica napus* cv. ZS 758. (A, B) TEM micrographs of mesophyll cells of leaves of ZS 758 at 400  $\mu$ M Pb alone at low and high magnifications respectively show a chloroplast (Chl) with swollen thylakoid membranes (Thy) and without starch grain (S) as well as a number of plastoglobuli (P). (C, D) TEM micrographs of mesophyll cells of ZS 758 at 100  $\mu$ M NaHS under 400  $\mu$ M Pb concentration at low and high magnifications respectively show a well developed chloroplast (Chl) with thylakoids (Thy), grana, and a number of starch grains (S). Cell wall (CW) and cell membrane (CM) are also clear. (E, F) TEM micrographs of mesophyll cells of ZS 758 at 200  $\mu$ M NaHS under 400  $\mu$ M Pb concentration at low and high magnifications respectively show a well developed chloroplast (Chl) with thylakoids (Thy), grana, and a big starch grain (S).

**Slika 5.** Elektronska snimka (TEM) mezofilnih stanica lista 15 dana starog klijanca *Brassica napus* cv. ZS 758 uzgajanog u hidroponu. A i B manje i veće povećanje kloroplasta pri tretmanu s 400  $\mu$ M olova, pokazuje kloroplast (Chl) sa uvijenim tilakoidnim membranama (Thy) bez zrnaca škroba (S) i s povećanim brojem plastoglobula (P). C i D kombinacija tretmana olovom i sumporovodikom pokazuje dobro razvijen kloroplast s tilakoidima, zrnacima škroba staničnom stijenkom (CW) i membranom (CM). E i F, također prikazuju dobro razvijen kloroplast kod klijanca gdje je uz olovo dodavano i 200  $\mu$ M sumporovodika. (Izvor: Ali i sur. 2014.)

Dokazano je da H<sub>2</sub>S može smanjiti štetni učinak toksičnosti teških metala na proces fotosinteze povećanjem karboksilacije (Chen i sur. 2011.), utjecajem na smanjenje otvora puči (Garcia-Matta i Lamattina, 2010.), što doprinosi smanjenju gubitka vode te povećanju unutarstanične koncentracije CO<sub>2</sub>. Osim toga, aplicirani H<sub>2</sub>S je i doprinjeo značajnom smanjenju usvojenog olova u korijenu i izdancima, međutim ovaj mehanizam je još uvijek nedovoljno poznat. U navedenoj studiji olovo je potpuno oštetilo ultrastrukturu listova i korijena. Povećan je broj plastoglobula u listovima, smanjenjem broja škrobnih zrnaca i otapanjem membrana unutar kloroplasta (Slika 5.).

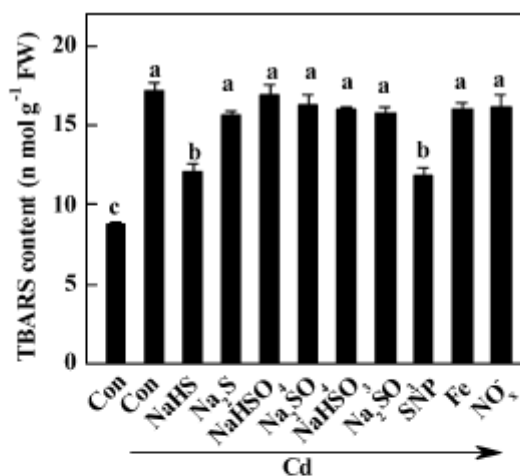


**Fig. 4.** Electron micrographs of root tip cells of 15-day-hydroponically grown seedlings of *Brassica napus* cv. ZS 758. (A, B) TEM micrographs of root tip cells of ZS 758 at 400  $\mu$ M Pb alone at low and high magnifications respectively show a nucleus (N) with ruptured nuclear membrane (NM), undeveloped mitochondria (MC) and a number of pieces of endoplasmic reticulum (ER). Moreover, Pb concentration increased in the form of electron dense granules in the vacuole (V) and along the cell wall (CW). (C, D) TEM micrographs of root tip cells of ZS 758 at 100  $\mu$ M NaHS under 400  $\mu$ M Pb concentration at low and high magnifications respectively show a clear nucleolus (Nue) with nuclear membrane (NM), developed mitochondria (MC) and a continuous endoplasmic reticulum (ER). (E, F) TEM micrographs of root tip cells of ZS 758 at 200  $\mu$ M NaHS under 400  $\mu$ M Pb concentration at low and high magnifications respectively show a clear cell with big nucleus (N), number of developed mitochondria (MC) and a long endoplasmic reticulum (ER).

**Slika 6.** Elektronska snimka (TEM) vrška korijena 15 dana starog klijanca *Brassica napus* cv. ZS 758 uzgajanog u hidroponu. A i B manje i veće povećanje pri tretmanu s 400  $\mu$ M olova, pokazuje jezgru (N) s oštećenom membranom (NM), nerazvijenim mitohondrijima (MC) i značajnim oštećenjem endoplazmatskog retikuluma (ER). Također je vidljiva akumulacija olova u vakuoli i duž staničnog zida (CW). C i D prikazuju jezgru i jezgrinu ovojnicu koje su neoštećene, razvijene mitohondrije i nenarušeni endoplazmatski retikulum. E i F prikazuju isto tako nenarušenu strukturu navedenih staničnih organela pri tretmanu gdje je uz olovo dodavan i sumporovodik u koncentraciji od 200  $\mu$ M. (Izvor: Ali i sur. 2014.)

U korijenu je došlo do narušavanja funkcija staničnih membrana te deponiranja olova u stanične stijenke i vakuole (Slika 6.). Međutim, pri kombiniranim tretmanima olova i sumporovodika, utvrđen je povećan broj membrana u granumu, biosinteza klorofila što je rezultiralo pojačanom biogenezom kloroplasta a time i povećanjem procesa fotosinteze, u usporedbi s njihovim kontrolama gdje H<sub>2</sub>S nije dodavan.

Li i suradnici 2012. ispituju utjecaj H<sub>2</sub>S i NO (dušik oksida) na smanjenje oksidativnog oštećenja induciranog prisustvom kadmija u korijenu lucerne.



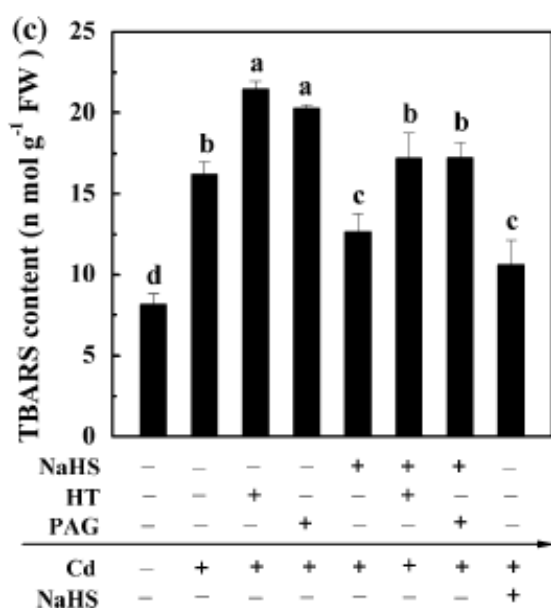
**Fig. 2** H<sub>2</sub>S or HS<sup>-</sup> and NO, but not other compounds derived from NaHS or SNP contributed to the alleviation of lipid peroxidation in alfalfa seedling roots upon Cd exposure. Seedling roots were incubated in quarter-strength Hoagland's solution for 5 days, then transferred to the same solution containing 100 μM NaHS, 100 μM Na<sub>2</sub>S, 100 μM NaHSO<sub>4</sub>, 100 μM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 μM NaHSO<sub>3</sub>, 100 μM Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 100 μM SNP, K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>/K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> (100/100 μM, Fe) and NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (100/100 μM, NO<sub>x</sub><sup>-</sup>) for 6 h, and then exposed to 100 μM CdCl<sub>2</sub> for another 12 h. Sample without chemicals was the control (Con). Values are the mean ± SE of three independent experiments. Bars denoted by the same letter did not differ significantly at *P* < 0.05 according to Duncan's multiple range test

**Slika 7.** H<sub>2</sub>S ili HS<sup>-</sup> i NO su jedini oblici sumporovodika odnosno dušik oksida oslobođenih iz NaHS ili SNP koji doprinose smanjenju razine lipidne peroksidacije u korijenu klijanaca lucerne izložene kadmiju. Klijaneci su inkubirani u ¼ Hoagland hranjivoj otopini 5 dana te nakon toga prenešeni u istu otopinu koja je sadržavala 100 μM NaHS, 100 μM Na<sub>2</sub>S, 100 μM NaHSO<sub>4</sub>, 100 μM NaHSO<sub>3</sub>, 100 μM Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 100 μM SNP, K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>/K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> (100/100 μM), NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (100/100 μM, NO<sub>x</sub><sup>-</sup>) na 6 sati te nakon toga prenešeni na 12 sati u medij koji je sadržavao CdCl<sub>2</sub>. (Izvor: Li i sur. 2012.)

Osim NaHS kao donora H<sub>2</sub>S, ispitali su i utjecaj drugih spojeva sa sumporom kod biljaka uzgajanih u istim uvjetima (Na<sub>2</sub>S, NaHSO<sub>4</sub>, NaHSO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) na razinu lipidne

peroksidacije te utvrdili da se zaštitna uloga sumpora u uvjetima stresa, manifestira jedino ako je on u obliku sumporovodika, dakle dodan NaHS-om (Slika 7.).

Također dokazuju da blokada enzima odgovornih za intrinzičnu produkciju HS, D- i L-cistein-desulfhidraze (CSE/L CDES) s DL-propagilglicinom (PAG) kao i blokada produciranog H<sub>2</sub>S-a korištenjem hipotaurina (HT), rezultira porastom razine lipidne peroksidacije izazvane usvojenim kadmijem (Slika 8.). Kada se sumporovodik dodaje egzogeno, primjenom NaHS, a istovremeno je i dodan HT ili PAG, pozitivni učinak smanjenja lipidne peroksidacije izostaje. Autori ovo objašnjavaju pojačanom ekspresijom gena, odnosno povećanje transkripata i aktivnosti enzima Cu/Zn SOD i peroksidaze (POD) dok je aktivnost lipoksigenaze (LOX) bila u skladu s razinom lipidne peroksidacije pri svim tretmanima.

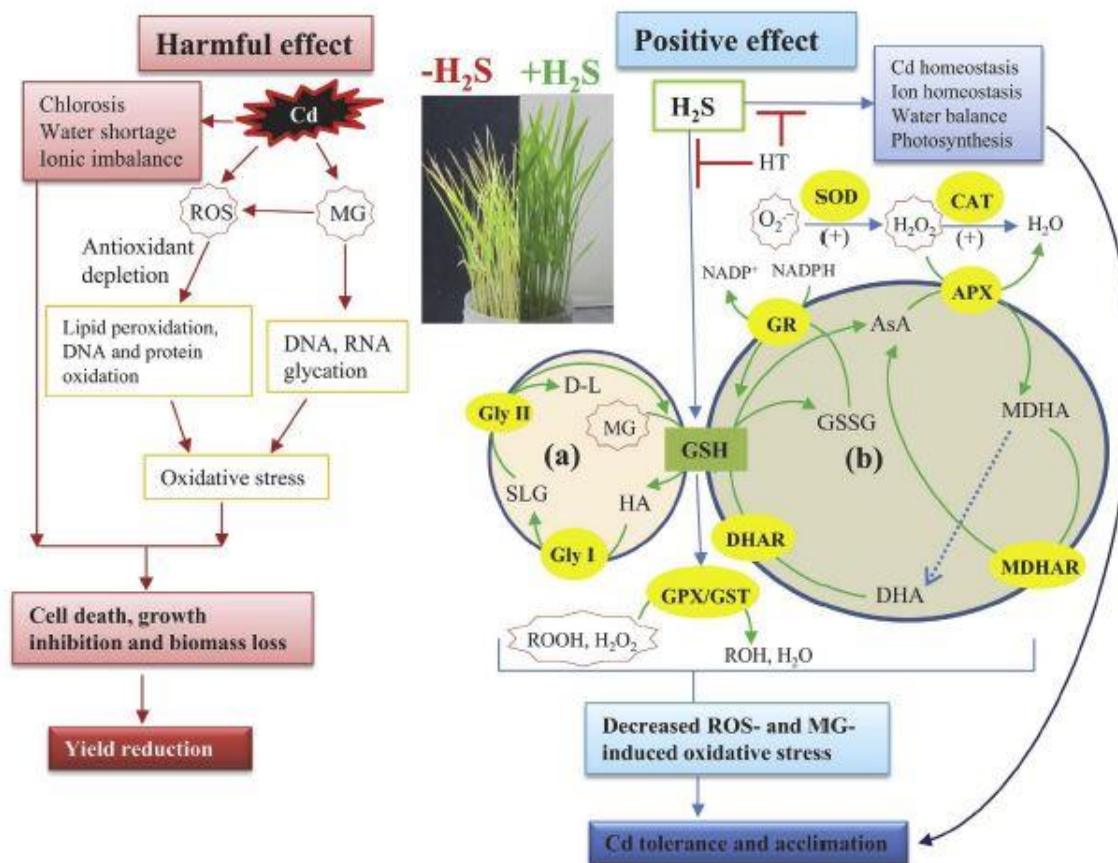


**Fig. 1** Effects of NaHS, SNP, HT and PAG on TBARS concentration in alfalfa seedling roots upon Cd exposure. Seedling roots were incubated in quarter-strength Hoagland's solution for 5 days, then transferred to the same solution containing increasing concentrations of NaHS or 100  $\mu$ M SNP for 6 h, followed by another 12 h incubation in 100  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> (a), or incubating the roots in solution supplemented with 100  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> and 100  $\mu$ M NaHS or 100  $\mu$ M SNP together for 12 h, or incubating the roots in 100  $\mu$ M NaHS for 6 h followed by another 12 h incubation in 100  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub>, or incubating the roots in 100  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> for 12 h followed by another 6 h incubation in 100  $\mu$ M NaHS (b), or incubating the roots in solution supplemented with 100  $\mu$ M NaHS, 1 mM HT, 2 mM PAG alone, or the combination treatments for 6 h, followed by 100  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> with or without 100  $\mu$ M NaHS for another 12 h (c). Values are the mean  $\pm$  SE of at least three independent experiments. Bars with different letters were significantly different in comparison with control or Cd stressed alone samples at  $P < 0.05$  according to Duncan's multiple range test

**Slika 8.** Efekt NaHS, SNP, HT i PAG na razinu lipidne peroksidacije u korijenu klijanaca lucerne izložene kadmiju. Klijanci su inkubirani u 1/4 Hoagland hranjivoj otopini 5 dana te nakon toga prenešeni na 6 sati u istu otopinu koja je sadržavala 100  $\mu$ M NaHS, 100  $\mu$ M SNP, odnosno 1 mM HT ili 2 mM PAG, te njihove različite kombinacije nakon čega su klijanci prenešeni na 12 sati u medij koji je sadržavao CdCl<sub>2</sub>. (Izvor: Li i sur. 2012.)



Zaštitnu ulogu sumporovodika kod riže pri stresu uzrokovanu kadmijem, ispitali su i Mostofa i sur. (2015.). Na temelju dobivenih rezultata aktivnosti antioksidativnih enzima, razine lipidne peroksidacije, sadržaja neenzimatskih antioksidanasa (askorbinska kiselina i glutation) i sadržaja pojedinih elemenata mineralne ishrane, zaključuju da sumporovodik smanjuje štetni efekat kadmija. Zaštitna uloga očituje se u smanjenju usvajanja i akumulacije kadmija, povećanjem mineralne homeostaze i saadržaja fotosintetskih pigmenata te kroz redukciju oksidativnog stresa indukcijom detoksifikacije slobodnih kisikovih radikala (ROS) i metilglioksala (MG), produkata metabolizma u uvjetima stresa koji mogu oštetiti stanične biomembrane, ali i ostale molekularne strukture (Hossain i sur. 2012.). Na temelju dobivenih rezultata, autori shematski prikazuju fiziološke i biokemijske mehanizme toksičnosti inducirane kadmijem i mehanizme tolerancije u koje je uključen sumporovodik (Slika 9.).



**Figure 6.** A Schematic diagram representing Cd-induced toxicity and protective mechanism of H<sub>2</sub>S underlying rice tolerance to Cd stress. Cd stress exerted harmful effects by inhibiting photosynthesis and affecting water status and ionic balance. Excessive Cd can induce reactive oxygen species (ROS) production by depleting antioxidant levels. Cd can also overaccumulate methylglyoxal (MG) that is highly toxic to DNA, RNA and proteins. ROS and MG contribute to oxidative stress, resulting in lipid peroxidation, DNA and protein oxidation, all of which cause growth inhibition, biomass loss and ultimate yield reduction. In contrast, elevated H<sub>2</sub>S level following sodium hydrosulfide (NaHS) application showed protective mechanism against Cd-induced toxicity by re-establishing Cd homeostasis, ionic balance and water balance, and by enhancing photosynthesis. H<sub>2</sub>S enhanced the detoxification of ROS by stimulating the activities of SOD and CAT. H<sub>2</sub>S also replenished the Cd-induced reduction in glutathione (GSH) level, which in turn enhanced the ROS and MG detoxifications as well as redox homeostases, leading to alleviation of oxidative stress. As a consequence, H<sub>2</sub>S enhanced Cd stress tolerance by retaining better growth of Cd-stressed rice plants. (+) indicates stimulatory effect of H<sub>2</sub>S. Dotted arrow indicates spontaneous conversion. Blunted arrow indicates inhibitory effect of hypotaurine (HT). (a,b) indicate Gly system and AsA-GSH system, respectively. AsA, ascorbic acid; DHA, dehydroascobate; GSSG, oxidized GSH; Gly, glyoxalase; HA, hemithioacetals; SLG, S-D-lactoylglutathione; D-L, D-lactic acid; O<sub>2</sub><sup>-</sup>, superoxide; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hydrogen peroxide; SOD, superoxide dismutase; CAT, catalase; APX, ascorbate peroxidase; MDHAR, monodehydroascorbate reductase; DHAR, dehydroascorbate reductase; GR, GSH reductase; GPX/GST, GSH peroxidase; GST, GSH S-transferase; ROOH, lipid hydroperoxide; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate.

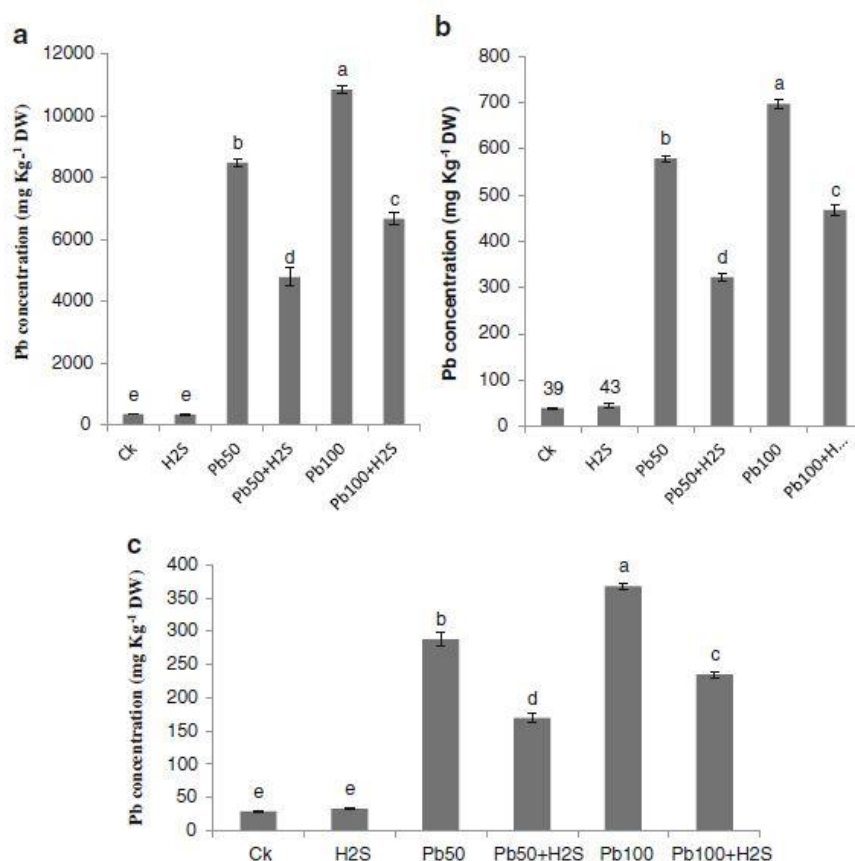
**Slika 9.** Shematski dijagram koji prikazuje toksičnost induciranu kadmijem te zaštitne mehanizme tolerancije na stres kod riže. Cd stres se manifestira kroz štetne efekte inhibicije fotosinteze te utjecajem na vodni režim i ionski balans. Povećane koncentracije kadmija induciraju produkciju reaktivnih kisikovih jedinica (ROS) smanjujući razinu antioksidanasa. Cd također može uzrokovati pojačano nakupljanje metilgliksala (MG) koji je jako štetan za DNA, RNA i proteine. ROS i MG doprinose oksidativnom stresu,

rezultirajući pojačanom lipidnom peroksidacijom, oksidacijom proteina i DNA, što uzrokuje inhibiciju rasta, gubitak biomase i značajnom redukcijom prinosa. Nasuprot tome, povećani sadržaj H<sub>2</sub>S kao rezultat aplikacije NaHS pokazuje zaštitnu ulogu u uvjetima stresa induciranih kadmijem, ponovnim uspostavljanjem Cd homeostaze, ionskog balansa, vodenog statusa i povećanjem procesa fotosinteze. H<sub>2</sub>S povećava detoksifikaciju ROS stimulirajući aktivnost SOD i CAT, te također podiže razinu glutationa (GSH) potrošenog u antioksidativnom odgovoru na stres, što posljedično rezultira poboljšanom detoksifikacijom ROS i MG kao i poboljšanom redoks homeostazom rezultirajući poboljšanim rastom biljaka riže u uvjetima stresa izazvanog s Cd. (+) označava pozitivni efekt H<sub>2</sub>S. Točkaste strelice označavaju spontane konverzije koji se događaju u stanici. Stop linije označavaju inhibitorni efekt hipotaurina (HT). (a, b) označava glioksalni ciklus i AsA-GSH ciklus. (Izvor: Mostofa i sur. 2015.)

Bharwana i sur. (2014.) su istraživali ulogu sumporovodika u uvjetima stresa uzrokovanim povećanom koncentracijom olova te pratili biokemijske, morfološke, fotosintetske i oksidativne promjene na biljkama pamuka. Zdrave sjemenke pamuka naklijavane su u klima komori s fotoperiodom od 16 sati svjetla i 8 sati tame i relativnom vlagom 85 %. Jednolični klijanci su nakon dva tjedna prenešeni na uzgoj u modificiranu Hoagland-ovu hranjivu otopinu. Nakon dva tjedna dodano je olovo u koncentracijama 50 i 100  $\mu$ M u obliku Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> te 200  $\mu$ M NaHS. Kontrola nije sadržavala olovo, odnosno NaHS. Nakon 45 dana ispitivani su morfološki i fiziološki pokazatelji rasta te je utvrđen značajan pozitivni utjecaj sumporovodika na razvoj biljaka, fotosintezu, sadržaj klorofila, razinu oksidacijskog stresa, aktivnost antioksidativnih enzima, ispiranje elektrolita, u prisustvu spomenutog teškog metala. Obje koncentracije olova su značajno reducirale visinu biljaka, dužinu korijena, njihovu svježiu i suhu masu te lisnu površinu i broj listova po biljci. Pri tretmanima gdje je uz olovo dodavan i NaHS, negativni efekt olova bio je značajno manji pri obje razine stresa te su svi prethodno navedeni pokazatelji rasta bili značajno veći u usporedbi s tretmanima gdje nije dodan NaHS. To upućuje na pozitivno djelovanje H<sub>2</sub>S na rast i razvoj biljaka u uvjetima olovnog stresa. Olovo je također smanjilo sadržaj fotosintetskih pigmenata, SPAD vrijednosti, ukupnu fotosintezu, provodljivost puči te koeficijent transpiracije i efikasnost iskorištenja vode. Kao i kod prethodnih pokazatelja, NaHS je značajno utjecao na povećanje navedenih parametara u usporedbi s tretmanima gdje ovaj donor H<sub>2</sub>S nije dodan. Aktivnost antioksidativnih enzima SOD-a, POD-a, CAT-a i APX-a u korijenu i lišću biljaka izloženih olovnom stresu je bila značajno povećana u usporedbi s kontrolom. NaHS je dodatno povećao njihovu aktivnost što je rezultiralo smanjenjem sadržaja vodik peroksida, smanjenjem razine lipidne peroksidacije i manjim

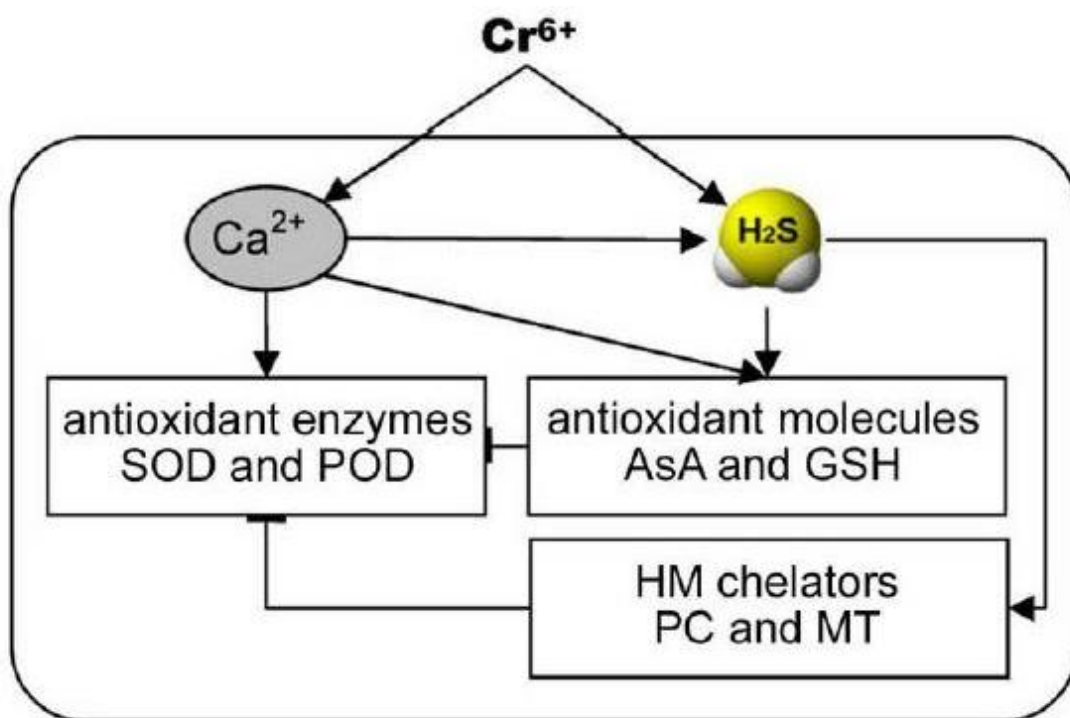
oštećenjem bioloških membrana. Pri obje razine olova utvrđeno je značajno povećanje njegova usvajanja u korijen pamuka (Slika 10.). Osim što je primjena NaHS rezultirala slabijim usvajanjem olova, također je u ovim tretmanima zabilježena i znatno manja translokacija spomenutog teškog metala u nadzemne dijelove biljke što je utvrđeno mjerenjem njegova sadržaja u stabljici i listovima. Autori dokazuju da su slijed povećanih koncentracija olova, znatno narušene fiziološke funkcije kod biljaka pamuka te da su ova oštećenja izraženija pri većim koncentracijama ovog teškog metala. Međutim, primjenom donora H<sub>2</sub>S takve se štetne posljedice za biljku mogu značajno smanjiti što upućuje na moguću zaštitnu uloga ovoga spoja u uvjetima oksidacijskog stresa koja se očituje kroz poboljšanje antioksidativne aktivnosti i procesa fotosinteze što se odražava kroz povećanu akumulaciju suhe i svježje tvari.

**Fig. 8** Effect of different concentrations of lead (Pb) (0, 50, and 100  $\mu$ M) and H<sub>2</sub>S (0 and 200  $\mu$ M) on concentrations of lead (Pb) in roots (a), stem (b), and leaves (c) in cotton plants. Values show the means of three replicates  $\pm$  SE. Means followed by same small letters are not significantly different at  $P < 0.05$  by using the Tukey test



**Slika 10.** Efekt različitih koncentracija olova (Pb) (0, 50 i 100  $\mu$ M) i H<sub>2</sub>S (0 i 200  $\mu$ M) na koncentraciju olova u korijenu (a), stabljici (b) i listovima (c) u biljkama pamuka. (Izvor: Bharwana i sur. 2014.)

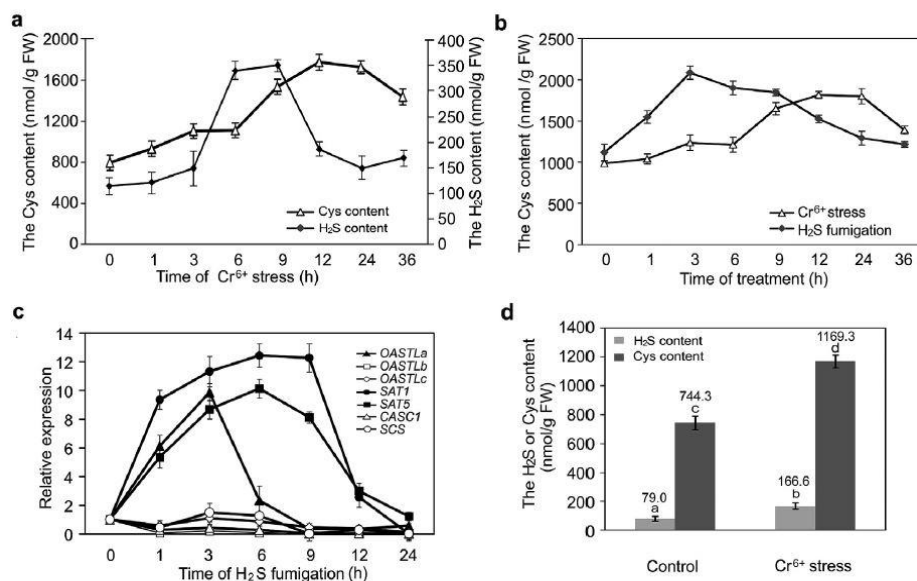
Fang i sur. (2014.) istražuju ispreplitanje između  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{H}_2\text{S}$  signalnih puteva kod biljke *Setaria italica* te zaključuju kako ova dva signalna puta djeluju zajednički u uvjetima stresa uzrokovanog prisustvom kroma ( $\text{Cr}^{6+}$ ). Autori navode da  $\text{Ca}^{2+}$  može stimulirati sintezu antioksidativnih molekula ovisno ili neovisno o prisutnosti  $\text{H}_2\text{S}$  te prema tome  $\text{H}_2\text{S}$  signalni put može biti samo alternativa u aktivaciji antioksidanasa induciranih  $\text{Ca}^{2+}$ , jer inaktivacijom  $\text{H}_2\text{S}$  puta ne blokira se funkcija  $\text{Ca}^{2+}$  signalinga. Autori su utvrdili da se pri prisutnosti kroma  $\text{Ca}^{2+}$  može smanjiti štetni efekat kroma povećanjem aktivnosti SOD i POD dok je predtretman egzogenim  $\text{H}_2\text{S}$ -om zadržao aktivnost ova dva enzima na bazalnoj razini. Njihovi rezultati upućuju da sumporovodik može smanjiti štetni utjecaj stresa, ali ne direktnim utjecajem na enzimatsku aktivnost već regulacijom sinteze neenzimatskih antioksidanasa ili pak kroz smanjenje produkcije ROS utječući na inhibiciju aktivnosti NADPH oksidaze (Pan i sur. 2013.). U usporedbi s sumporovodikom, kalcij osim povećanja enzimatske aktivnosti povećava i antioksidativnu aktivnost povećanjem sadržaja askorbinske kiseline i glutationa što autore navodi na zaključak da je uloga  $\text{Ca}^{2+}$ , u usporedbi s sumporovodikom, puno intenzivnija i izraženija (Slika 11.).



**Slika 11.** Ispreplitanje  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{H}_2\text{S}$  signalinga kod biljke *Setaria italica* kao posljedica odgovora na stres izazvan prisustvom kroma. Strelice označavaju povećanu ekspresiju dok stop linije označavaju smanjenu ekspresiju signalinga. (Izvor: Fang i sur. 2014.)

Autori stoga navode da je signalni put u kojem sudjeluje sumporovodik samo dio  $\text{Ca}^{2+}$  signalnog puta te na taj način djelomično doprinosi antioksidativnim mehanizmima obrane od stresa. Osim toga, sumporovodik, kao dio  $\text{Ca}^{2+}$  signalnog puta, značajno doprinosi povećanoj ekspresiji gena zaduženih za sintezu kelatora teških metala metalotioneina i fitokelatina.

Fang i sur. (2016.) su istraživali i ulogu sumporovodika u metabolizmu cisteina, na povećanje tolerancije stresa uzrokovanog prisustvom kroma kod *Arabidopsis thaliana* (At), na biljkama divljeg tipa (Col-0), dva eng. „*knock out*“ (KO) mutanta (LCD, L-cistein desulfhidraza i DES1, O-acetil-L-serin-(tiol)-liaza) te dva eng. „*over express*“ (OE) mutanta (OE-LCD, OE-DES1). Sedmi dan nakon sjetve, klijanci su fumigirani u zatvorenim Petrijevim zdjelicama koristeći otopinu NaHS. Nakon tri dana fumigacije biljke su prenešene na ½ Murishage-Skoog (MS) medij koji je sadržavao različite koncentracije kroma (0, 100, 200, 300, 400, 500  $\mu\text{M Cr}^{6+}$ ). Cistein je također kao predtretman dodan u ½ MS medij od sedmog do desetog dana. Utvrđivali su dužinu korijena kao morfološki pokazatelj stresa te sadržaj cisteina, glutationa, razinu lipidne peroksidacije te je utvrđena ekspresija gena odgovornih za sintezu fitokelata i metalotioneina, koji mogu kompleksirati teške metale te time smanjiti njihov štetni efekat (MT3, MTA2 – metalotionein-sintaze, PCS 1, PCS 2-fitokelatin-sintaze) kao i za metabolizam cisteina (OASTL O-acetil-L-serin-(tiol)-liaza, SAT1 i SAT5 serin acetil-transferaze). Utvrdili su da sadržaj sumporovodika i cisteina u biljkama At značajno raste u prisustvu  $\text{Cr}^{6+}$ . Fumigacija  $\text{H}_2\text{S}$ -om je rezultirala značajno bržim povećanjem sadržaja cisteina nego stres uzrokovan dodatkom kroma. Krom je stimulirao unutarstaničnu produkciju  $\text{H}_2\text{S}$  koji je u ulozi signalne molekule pokrenuo daljnju akumulaciju cisteina te autori zaključuju da vanjskom primjenom  $\text{H}_2\text{S}$ -a možemo regulirati metabolizam navedene aminokiseline (Slika 12.). Razina ekspresije gena vezanih uz metabolizam cisteina (OASTLa, SAT1 i SAT5) su bile značajno povećane pri tretmanu s  $\text{H}_2\text{S}$  te su SAT1 i SAT5 zadržale povećanu ekspresiju znatno duže vrijeme (Slika 12.). To navodi na zaključak da  $\text{H}_2\text{S}$  povećava produkciju intermedijera O-acetil-L-serina indukcijom povećane ekspresije SAT1 i SAT5 gena, što posljedično dovodi do povećanja sadržaja cisteina u stanicama.

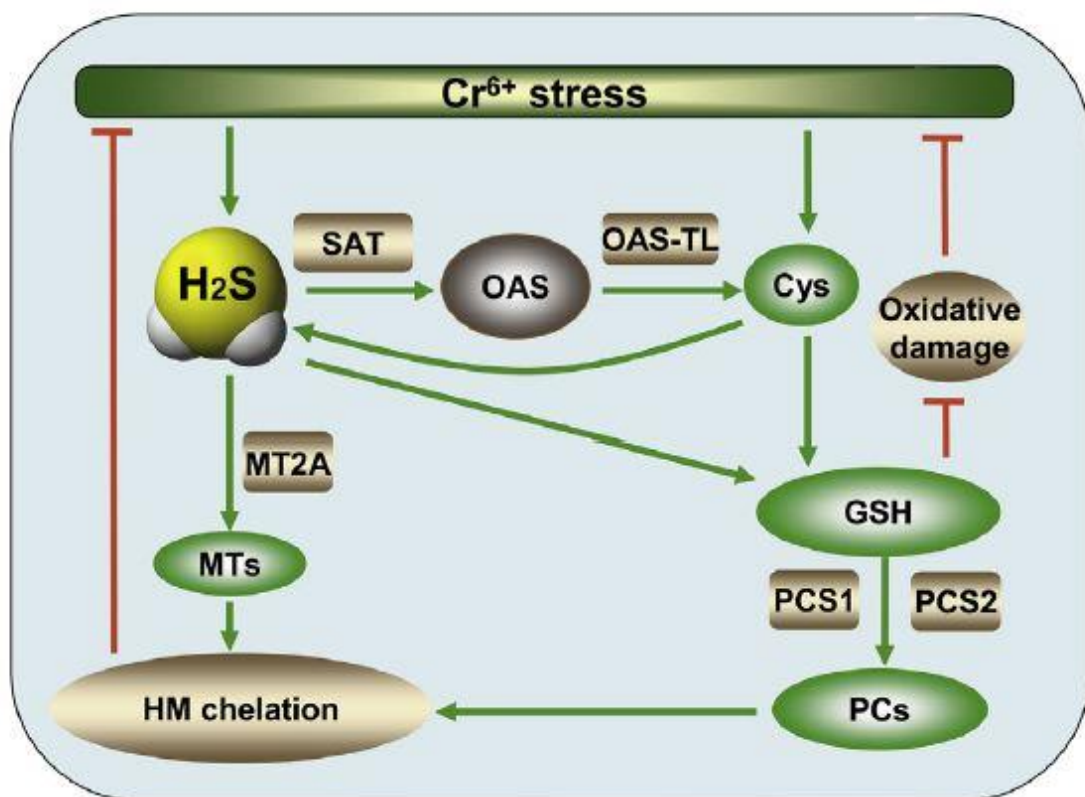


**Fig. 2.** The response pattern of the H<sub>2</sub>S-Cys system in *Arabidopsis* to Cr<sup>6+</sup> stress. (a) The effects of Cr<sup>6+</sup> stress on the H<sub>2</sub>S and Cys contents. (b) The regulation of the Cys content induced by H<sub>2</sub>S fumigation and Cr<sup>6+</sup> stress. (c) The expression patterns of Cys metabolism-related genes in seedlings fumigated with H<sub>2</sub>S. Ten-day-old seedlings exposed to different treatments were used to conduct the time-course analyses of the H<sub>2</sub>S and Cys contents, and the expression levels of Cys metabolism-related genes. (d) The contents of H<sub>2</sub>S and Cys in Cr<sup>6+</sup>-stressed *Arabidopsis*. Ten-day-old seedlings were stressed with or without 300 μmol/L Cr<sup>6+</sup> (150 μmol/L K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>). After 5 d of stress exposure, the H<sub>2</sub>S and Cys contents were detected. Data are means ± SE of three biological repeats, error bars indicate error standard and bars with different letters are different (*P* < 0.05).

**Slika 12.** Vremenski tijek odgovora H<sub>2</sub>S-cistein (Cys) puta kod *Arabidopsis* na stres uzrokovan prisustvom kroma (Cr<sup>6+</sup>). (a) Utjecaj Cr<sup>6+</sup> stresa na sadržaj H<sub>2</sub>S i Cys. (b) Regulacija sadržaja Cys induciranog fumigacijom s H<sub>2</sub>S i stresa uzrokovanog sa Cr<sup>6+</sup>. (c) Vremenski tijek ekspresije gena vezanih uz metabolizam Cys u klijancima fumigiranim s H<sub>2</sub>S. Korišteni su deset dana stari klijanci izloženi različitim tretmanima da bi se prikazao vremenski tijek sadržaja H<sub>2</sub>S i Cys te razina ekspresije gena vezanih uz metabolizam Cys. (d) Sadržaj H<sub>2</sub>S i Cys kod klijanca *At* klijanaca. Deset dana stari klijanci tretirani su s 300 μM Cr<sup>6+</sup> (150 M K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>). (Izvor: Fang i sur. 2016.)

Iznenadujuće, MT2A PCS1 i PCS2 ekspresija je značajno bila povećana kod OE mutanta izloženih djelovanju kroma dok je pri KO mutantima bila neznačajno promijenjena. To upućuje da možda postoji neki drugi unutarstanični signal koji poboljšava negativni utjecaj pada sadržaja H<sub>2</sub>S na ekspresiju navedenih gena. Krom nije značajno promijenio ekspresiju gena MT3 kod divljeg tipa, KO kao ni kod OE mutanata. Općenito, navedeni rezultati dokazuju da aplikacija vanjskog H<sub>2</sub>S povećava toleranciju na krom povećanjem ekspresije MT2A PCS1 i PCS2, ali ne i MT3 gena koji je odgovoran za akumulaciju metalotioneina i fitokelatina. Pošto je dokazano da sumporovodik nema direktan utjecaj na povećanje ekspresije gena MT3, autori navode da je put indukcije tolerancije na stres teškim metalima u koji je uključen sumporovodik, različit od onoga koji je induciran prisustvom Cr<sup>6+</sup>, ili je to dokaz da postoji neka posttranslacijska modifikacija proteina, koja doprinosi povećanoj toleranciji na navedeni teški metal. Vanjska aplikacija sumporovodika i cisteina rezultirala je povećanjem akumulacije glutationa inducirane prisustvom Cr<sup>6+</sup>.

Glutation služi kao prekursor u sintezi fitokelatina čime dolazi do njihove akumulacije što povećava kelatizaciju teških metala u stanici.



**Fig. 5.** The response patterns of the H<sub>2</sub>S-Cys system in *Arabidopsis* to Cr<sup>6+</sup> stress. Arrows indicate enhanced effects and hyphens indicate suppressed effects.

**Slika 13.** Odgovor H<sub>2</sub>S-Cys ciklusa kod *Arabidopsisa* na stres uzrokovan dodatkom Cr<sup>6+</sup>. Strelice pokazuju stimulativni efekt, a stop linije inhibitorni efekt. (Izvor: Fang i sur. 2016.)

Pošto glutation ima i antioksidativno djelovanje, također doprinosi u efikasnijoj neutralizaciji slobodnih kisikovih radikala koji se javljaju u stanici zbog narušavanja oksidoreduktivnih procesa uslijed ulaska kroma. Bazirano na rezultatima koje su dobili autori predlažu model molekularnih mehanizama i staničnog signalinga u koje je uključen H<sub>2</sub>S i cistein, u otpornosti na stres uzrokovan prisustvom teških metala (Slika 13.).



### 3. ZAKLJUČAK

Sumporovodik kao treći otkriveni plinoviti prenositelj staničnog signala, uz ugljik monoksid i dušik oksid, već dugi niz godina je predmet istraživanja biljnih fiziologa. Dokazani su brojni pozitivni učinci ovog spoja u stresnim uvjetima okoline. U koje god stanične metaboličke puteve se uključuje ova molekula, vanjska primjena niskih doza sumporovodika stimulatивно djeluje na svim staničnim razinama obrane od stresa, bilo da se radi o abiotskom ili biotskom uzročniku. Dokazano je da se ovaj spoj može uključiti u stanični metabolizam gdje se sumpor direktno ugrađuje u aminokiseline poput cisteina ili u tripeptid glutation koji je vrlo značajan antioksidans. Posljedično dolazi i do stimulacije askorbat-glutation ciklusa što sve skupa dovodi do povećane tolerancije na stres kroz smanjenje štetnog učinka oksidativnog stresa u kojem dolazi do značajnog narušavanja oksidoreduktivnih procesa u stanici. Osim toga H<sub>2</sub>S utječe na posttranslacijske modifikacije proteina stvaranjem disulfidnih mostova, modifikacijom tiolnih skupina, itd. Time proteini odnosno enzimi mogu biti aktivirani ili pak dodatno stimulirani. Nadalje, dokazano je da ovaj spoj sudjeluje u nizvodnom prijenosu signala što rezultira pojačanom ekspresijom gena koji kodiraju antioksidativne enzime značajne u smanjenju štetnog učinka oksidativnog stresa, poput superoksid-dizmutaze, katalaze, askorbat-peroksidaze, glutation-reduktaze itd. Također, može stimulirati i gene zaslužne za kelatizaciju i kompartmenizaciju teških metala čime se smanjuje ili lokalizira štetni učinak ionskog stresa. Stres izazvan povećanom pristupačnošću teških metala ima na staničnoj i molekularnoj razini višestruki štetni efekt poput narušavanja ionske homeostaze, narušavanje oksidoreduktivnih procesa, poremećaja vodnog balansa itd., aplikacija egzogenog H<sub>2</sub>S može doprinijeti lakšem prevladavanju stresnih uvjeta uz manje posljedice za gubitak već stvorene biomase, što je od velikog značaja u biljnoj proizvodnji. Pošto je utvrđen pozitivan efekt sumporovodika u uvjetima stresa uzrokovanog prisustvom teških metala, daljnja istraživanja bi trebala biti usmjerena na utvrđivanje kemijskog oblika (vrste donora H<sub>2</sub>S), doze te optimalnog vremena primjene za pojedine biljne vrste s ciljem komercijalizacije spojeva koji otpuštaju sumporovodik i njihove praktične primjene u biljnoj proizvodnji u uvjetima stresa izazvanog povećanom pristupačnošću teških metala.

#### 4. POPIS LITERATURE

1. Ali, B., Mwamba, T. M., Gill, R. A., Yang, C., Ali, S., Daud, M. K., Wu, J., Zhou, W. (2014). Improvement of element uptake and antioxidative defense in *Brassica napus* under lead stress by application of hydrogen sulfide. *Plant growth regulation*, 74(3), 261-273.
2. Ali, B., Song, W. J., Hu, W. Z., Luo, X. N., Gill, R. A., Wang, J., Zhou, W. J. (2014). Hydrogen sulfide alleviates lead-induced photosynthetic and ultrastructural changes in oilseed rape. *Ecotoxicology and environmental safety*, 102, 25-33.
3. Bharwana, S. A., Ali, S., Farooq, M. A., Ali, B., Iqbal, N., Abbas, F., Ahmad, M. S. A. (2014). Hydrogen sulfide ameliorates lead-induced morphological, photosynthetic, oxidative damages and biochemical changes in cotton. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(1), 717-731.
4. Chen, J., Wu, F. H., Wang, W. H., Zheng, C. J., Lin, G. H., Dong, X. J., ... & Zheng, H. L. (2011). Hydrogen sulphide enhances photosynthesis through promoting chloroplast biogenesis, photosynthetic enzyme expression, and thiol redox modification in *Spinacia oleracea* seedlings. *Journal of Experimental Botany*, 62(13), 4481-4493.
5. Eun, S. O., Shik Youn, H., & Lee, Y. (2000). Lead disturbs microtubule organization in the root meristem of *Zea mays*. *Physiologia Plantarum*, 110(3), 357-365.
6. Fang, H., Jing, T., Liu, Z., Zhang, L., Jin, Z., & Pei, Y. (2014). Hydrogen sulfide interacts with calcium signaling to enhance the chromium tolerance in *Setaria italica*. *Cell Calcium*, 56(6), 472-481.
7. Fang, H., Liu, Z., Jin, Z., Zhang, L., Liu, D., & Pei, Y. (2016). An emphasis of hydrogen sulfide-cysteine cycle on enhancing the tolerance to chromium stress in *Arabidopsis*. *Environmental Pollution*, 213, 870-877.
8. Filipović, I., Lipanović, S. (1995.): *Opća i anorganska kemija*. Školska knjiga, Zagreb, 1143.
9. Vukadinović, V., Lončarić, Z. (1998.): *Ishrana bilja*. IBL d.o.o., Osijek, 293.
10. Kovačević, Lj., Žugaj, I. (1996.): *Kemijski elementi*. MEDIA SCI, Zagreb, 168.
11. García-Mata, C., & Lamattina, L. (2010). Hydrogen sulphide, a novel gasotransmitter involved in guard cell signalling. *New Phytologist*, 188(4), 977-984.

12. Hossain, M. A., Piyatida, P., da Silva, J. A. T., & Fujita, M. (2012). Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. *Journal of Botany*, 2012.
13. Islam, E., Yang, X., Li, T., Liu, D., Jin, X., & Meng, F. (2007). Effect of Pb toxicity on root morphology, physiology and ultrastructure in the two ecotypes of *Elsholtzia argyi*. *Journal of hazardous materials*, 147(3), 806-816.
14. Koch, M. S., Mendelssohn, I. A., & McKee, K. L. (1990). Mechanism for the hydrogen sulfide-induced growth limitation in wetland macrophytes. *Limnology and Oceanography*, 35(2), 399-408.
15. Li, L., Wang, Y., & Shen, W. (2012). Roles of hydrogen sulfide and nitric oxide in the alleviation of cadmium-induced oxidative damage in alfalfa seedling roots. *Biometals*, 25(3), 617-631.
16. Mostofa, M. G., Rahman, A., Ansary, M. M. U., Watanabe, A., Fujita, M., & Tran, L. S. P. (2015). Hydrogen sulfide modulates cadmium-induced physiological and biochemical responses to alleviate cadmium toxicity in rice. *Scientific reports*, 5, 14078.
17. Pan, L. L., Liu, X. H., Shen, Y. Q., Wang, N. Z., Xu, J., Wu, D., ... & Zhu, Y. Z. (2013). Inhibition of NADPH oxidase 4-related signaling by sodium hydrosulfide attenuates myocardial fibrotic response. *International Journal of Cardiology*, 168(4), 3770-3778.
18. Rennenberg, H. (1983). Role of O-acetylserine in hydrogen sulfide emission from pumpkin leaves in response to sulfate. *Plant Physiology*, 73(3), 560-565.
19. Sharma, P., & Dubey, R. S. (2005). Lead toxicity in plants. *Brazilian journal of plant physiology*, 17(1), 35-52.
20. Vukadinović, V., Jug, I., Đurđević, B. (2014.): Ekofiziologija bilja. Zebra, Vinkovci, 223.
21. Wang, R. (2012). Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiological reviews*, 92(2), 791-896.