

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

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

КОКОРЕВ ОЛЕКСАНДР ІГОРЕВИЧ

УДК 581.1:577.13

ДИСЕРТАЦІЯ


**СТРЕС-ПРОТЕКТОРНИЙ ВПЛИВ ПОЛІАМІНІВ НА РОСЛИНИ ТА ЙОГО
ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ ЗВ'ЯЗОК З СИГНАЛЬНИМИ ПОСЕРЕДНИКАМИ**

091 Біологія

09 Біологія


Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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

—  — О.І. Кокорев

Науковий керівник: Колупаєв Юрій Євгенович, доктор біологічних наук,
професор

Київ – 2021

Всі примірники ідентичні 

АНОТАЦІЯ

Кокорев О. І. Стрес-протекторний вплив поліамінів на рослини та його функціональний зв'язок з сигнальними посередниками. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

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

Актуальність, мета і завдання дослідження. Поліаміни являють собою аліфатичні аміни, що мають регулярне просторове розташування позитивних зарядів в молекулі. Останніми десятиліттями активно досліджуються механізми участі поліамінів в адаптації рослин до стресових чинників. Частково протекторні ефекти поліамінів пояснюють їх стабілізуючою дією на білки, нуклеїнові кислоти і мембранні структури. Однак в цілому спектр біологічних ефектів поліамінів значно ширший. Зокрема, отримано дані про їх участь в клітинному сигналінгу у рослин, що може бути зумовлено утворенням активних форм кисню (АФК) і оксиду азоту при метаболізмі поліамінів, а також їх впливом на стан іонних каналів. Крім того, є дані про вплив поліамінів на експресію генів і активність антиоксидантних ферментів та вміст низькомолекулярних антиоксидантів.

Проте в цілому уявлення про механізми стрес-протекторної дії на рослини поліамінів та про зв'язок між їх залученням у процеси клітинного сигналінгу і формуванням конкретних захисних реакцій дотепер не сформувалися.

Дисертаційна робота присвячена встановленню ролі ключових сигнальних посередників, зокрема, АФК, оксиду азоту, сірководню та іонів

кальцію у реалізації стрес-протекторної дії ді- і тетраамінів на рослини за гіпертермії та зневоднення. Основними її завданнями було дослідження впливу екзогенних поліамінів на стійкість рослин до гіпертермії та нестачі вологи у зв'язку з модифікацією активності антиоксидантних ферментів і вмісту низькомолекулярних поліфункціональних протекторних сполук; встановлення участі АФК, оксиду азоту, сірководню та іонів кальцію в реалізації захисної дії поліамінів на проростки пшениці за умов гіпертермії; дослідження впливу діамінів на активність діаміноксидази і нітратредуктази як можливих ферментів синтезу NO та встановлення функціональних зв'язків між оксидом азоту і пероксидом водню при реалізації стрес-протекторних ефектів путресцину і кадаверину; визначення дії екзогенних поліамінів на функціонування дихового апарату рослин та дослідження участі іонів кальцію і компонентів ліпідного сигналінгу в реалізації їх ефектів.

Об'єкти і методи. Для досліджень використовували рослини пшениці озимої м'якої (*Triticum aestivum* L.) сорту Досконала та рослини гороху (*Pisum sativum* L.) сорту Царевич. В експериментах зі з'ясування ролі сигнальних посередників у реалізації стрес-протекторних ефектів поліамінів як модельний об'єкт використовували етіюльовані проростки пшениці. На третю добу пророщування насіння в середовище додавали досліджувані поліаміни (путресцин, кадаверин або спермін) в концентраціях діапазону 0,05-2,5 мМ і витримували проростки на цих розчинах протягом однієї доби.

Для з'ясування участі АФК в реалізації фізіологічних ефектів поліамінів у середовище інкубації проростків відповідних варіантів вносили антиоксидант диметилтіосечовину (ДМТС – 0,15 мМ) або інгібітори діаміноксидази аміногуанідин (1 мМ) та НАДФН-оксидази імідазол (10 мкМ). При вивченні ймовірної участі оксиду азоту і кальцію в прояві стрес-протекторної дії поліамінів в окремих варіантах досліду проростки протягом 26 год обробляли скавенджером NO РТІО (2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide, 2 мМ), інгібітором діаміноксидази аміногуанідином (1 мМ), інгібітором нітратредуктази вольфраматом натрію (2 мМ) або антагоністами кальцію – 500

мкМ ЕГТА (хелатор позаклітинного Ca^{2+}) чи 200 мкМ неоміцином – інгібітором залежного від фосфоліпази C надходження кальцію в цитозоль з внутрішньоклітинних компартментів. В експериментах зі з'ясування функціональної взаємодії між путресцином і сірководнем в окремих варіантах досліду проростки обробляли інгібітором L-цістеїндесульфгідрази піруватом калію в концентрації 0,3 мМ. У варіантах з вивчення комбінованої дії поліамінів і вказаних модуляторів вмісту сигнальних посередників ці агенти вносили в середовище інкубації проростків за 2 год до додавання в нього поліамінів.

В процесі інкубації проростків на середовищі з додаванням поліамінів та інших ефекторів, а також після стресового впливу визначали вміст продукту ПОЛ малонового діальдегіду, вміст ендогенних пероксиду водню, оксиду азоту, сірководню, активність антиоксидантних ферментів (супероксиддисмутази – СОД, каталази і гваяколпероксидази), а також діаміноксидази (ДАО) та нітратредуктази.

Для досліджень впливу поліамінів на стійкість рослин пшениці до ґрунтової посухи використовували рослини пшениці, які вирощували в ґрунті у пластикових контейнерах. Перед створенням умов посухи рослини у віці 7 діб обприскували розчинами путресцину або сперміну в концентраціях 0,25, 1 і 5 мМ, контроль – обприскування дистильованою водою. Посуху створювали протягом чотирьох діб, починаючи з 8-го дня вирощування рослин, зменшенням норми поливу з поступовим зниженням вологості ґрунту до 25% від повної вологоємності (ПВ). У контролі вологість ґрунту підтримували на рівні 70% від ПВ.

У листках рослин за умов ґрунтової посухи визначали вміст фотосинтетичних пігментів, кількість проліну і цукрів, вміст вторинних метаболітів. Також як критерій для визначення стрес-протекторної дії поліамінів використовували ростові параметри рослин та величину водного дефіциту.

Для досліджень механізмів впливу поліамінів на стан продихів використовували 12–15-денні рослини гороху, які вирощували в кюветах з ґрунтом за оптимальних умов. Для досягнення ефекту відкривання продихів епідерміс з абаксіальної поверхні зрілих листків витримували протягом 2,5 год на холодному білому світлі (8000 лк) в чашках Петрі з 10 мМ розчином КСІ, приготованим на 10 мМ Тріс-НСІ буфері без CO_2 (рН 6,15). Після цього зразки епідермісу дослідних варіантів переносили на буферне середовище з додаванням путресцину або сперміну в кінцевих концентраціях від 0,25 до 5 мМ. Попередньо за допомогою розбавленого розчину НСІ рН середовища інкубації епідермісу в усіх варіантах доводили до 6,15. Через 60-180 хв інкубації епідермісу вимірювали розмір апертури продихів.

Основні результати. Встановлено, що досліджувані поліаміни (путресцин, кадаверин і спермін) спричиняли підвищення теплостійкості проростків пшениці. Мінімальна концентрація путресцину, яка викликала вірогідне підвищення виживаності проростків, становила 0,25 мМ. Найвищий захисний ефект всі поліаміни виявляли в концентрації 1 мМ. При цьому захисна дія сперміну була виражена дещо більше, ніж ефекти путресцину і кадаверину. Водночас стрес-протекторна дія двох діамінів в діапазоні концентрацій 0,5-2,5 мМ майже не відрізнялася.

Обробка всіма досліджуваними поліамінами пом'якшувала розвиток окиснювального стресу, спричинюваний прогрівом. При цьому відзначалося підвищення активності антиоксидантних ферментів СОД, каталази і гваяколпероксидази як в коренях, так і в пагонах проростків пшениці.

В реалізації стрес-протекторної дії поліамінів напевно задіяні ключові клітинні сигнальні посередники. Отримані нами результати вказують на участь АФК, іонів кальцію і газотрансмітерів (оксиду азоту і сірководню) у здійсненні фізіологічних ефектів поліамінів. Зокрема, встановлено, що під впливом як путресцину, так і кадаверину відзначалось транзиторне підвищення в коренях вмісту пероксиду водню. Такий ефект не виявлявся за попередньої обробки коренів проростків антиоксидантом ДМТС та інгібітором діаміноксидази

аміногуанідином. Водночас обробка коренів інгібітором НАДФН-оксидази імідазолом частково усувала ефект підвищення вмісту H_2O_2 , спричинюваний дією путресцину і практично не впливала на ефекти кадаверину. Ймовірно, за дії різних діамінів внесок різних ферментативних систем, що генерують АФК, відрізняється. Обробка проростків ДМТС і аміногуанідином усувала захисний вплив путресцину та кадаверину на проростки пшениці за умов гіпертермії. Водночас обробка інгібітором НАДФН-оксидази імідазолом знімала стрес-протекторний ефект путресцину, але слабо впливала на прояв такого ефекту кадаверину.

Антагоністи АФК (ДМТС, аміногуанідин, імідазол) усували спричинювані путресцином ефекти підвищення в коренях активності антиоксидантних ферментів (СОД, каталази і гваяколпероксидази). Водночас індуковане кадаверином підвищення активності СОД в коренях проростків пшениці не усувалося дією ДМТС, аміногуанідину та імідазолу. Проте підвищення активності каталази і гваяколпероксидази за дії кадаверину нівелювалося дією ДМТС. Отже, ймовірно, вплив кадаверину на активність окремих ферментів антиоксидантної системи (СОД) може здійснюватися без посередництва АФК.

З використанням антагоністів кальцію досліджували участь іонів Ca^{2+} в процесі активації антиоксидантної системи і підвищенні теплостійкості проростків пшениці екзогенним діаміном путресцином. Встановлено, що ефект посилення генерації АФК, спричинюваний путресцином, повністю усувався хелатором позаклітинного кальцію ЕГТА, але не інгібітором надходження кальцію з внутрішньоклітинних компартментів неоміцином. Обробка ЕГТА також усувала індуковане путресцином зростання активності антиоксидантних ферментів в коренях проростків. Неоміцин знімав ефекти підвищення активності каталази і гваяколпероксидази в коренях проростків пшениці, спричинювані дією путресцину. Як ЕГТА, так і неоміцин зменшували позитивний вплив путресцину на виживаність проростків після теплового стресу. Отже, встановлене значення підвищення кальцію в цитозолі за дії

путресцину насамперед за рахунок його надходження з позаклітинного простору.

Ще одним посередником в реалізації ефектів поліамінів є оксид азоту. Встановлено, що обробка проростків путресцином викликала швидке і транзиторне підвищення вмісту NO в коренях. При цьому відзначалося дворазове збільшення активності ДАО. Інгібітор ДАО аміногуанідин повністю усував підвищення вмісту NO, спричинюване путресцином. Збільшення активності ДАО і вмісту NO усувалося і при обробці проростків антагоністами кальцію (ЕГТА та неоміцином). Скавенджер оксиду азоту РТЮ повністю нівелював ефект підвищення вмісту пероксиду водню в коренях проростків пшениці при їх обробці путресцином. У той же час обробка антагоністом пероксиду водню ДМТС лише трохи зменшувала ефект підвищення вмісту NO в коренях, спричинюване путресцином. Антагоністи NO усували захисну дію путресцину при тепловому стресі. Отже, показано участь оксиду азоту, що синтезується за окиснювальним шляхом, і його функціональну взаємодію з АФК та іонами кальцію при реалізації стрес-протекторної дії путресцину на рослинні об'єкти.

Досліджували також можливу участь ендогенного сірководню в прояві протекторної дії діаміну путресцину на проростки пшениці при тепловому стресі і активність антиоксидантних ферментів в їх коренях. Інкубація коренів інтактних проростків в середовищі з додаванням путресцину, спричиняла посилення генерації сірководню. Обробка коренів проростків інгібітором основного ферменту синтезу H_2S (L-цистеїндесульфгідрази) піруватом калію частково нівелювала спричинюване путресцином підвищення стійкості проростків до ушкоджуючого прогріву. Підвищення активності СОД і каталази, яке викликала обробка путресцином, також усувалося дією пірувату калію. Це дозволяє зробити висновок про можливу участь сірководню як посередника у підвищенні путресцином теплостійкості проростків пшениці та активації їх антиоксидантної системи.

Встановлено також підвищення під впливом путресцину і сперміну стійкості етіюльованих проростків пшениці до зневоднення, спричинюваного дією ПЕГ, та резистентності дорослих рослин до ґрунтової посухи. Обробка обома поліамінами запобігала індукованому осмотичним стресом підвищенню вмісту пероксиду водню в пагонах проростків. Крім того, вплив на проростки путресцину і сперміну запобігав спричинюваному стресом зниженню активності СОД. Обробка путресцином викликала підвищення вмісту в проростках проліну при осмотичному стресі, в той час як під впливом сперміну він знижувався. Екзогенні поліаміни не чинили помітного впливу на вміст цукрів, але сприяли підвищенню вмісту антоціанів і флавоноїдів у пагонах.

Обприскування рослин путресцином в концентраціях діапазону 0,25-5 мМ істотно зменшувало рістінгбуючий вплив ґрунтової посухи, дія сперміну була менш ефективною, але також вірогідною при $p \leq 0,05$. Путресцин істотно зменшував прояв водного дефіциту, спричинюваний посухою. За дії сперміну відзначалася лише тенденція до зниження водного дефіциту листків.

Посуха спричиняла ефект окиснювального стресу, що проявлявся у збільшенні у листках вмісту МДА. За попередньої обробки рослин сперміном зростання вмісту МДА нівелювалося частково, а за дії путресцину майже повністю. Обробка рослин обома поліамінами сприяла збереженню пулу хлорофілів і каротиноїдів у листках за стресових умов та спричиняла накопичення цукрів у листках. Під впливом посухи у листках істотно знижувався вміст антоціанів і флавоноїдів, що поглинають в області УФ-В. Передобробка сперміном дещо пом'якшувала негативний вплив посухи на вміст антоціанів. За дії як путресцину, так і сперміну відзначалася стабілізація вмісту у листках флавоноїдів, що поглинають в УФ-В. Отже, захисний вплив поліамінів на рослини пшениці за умов посухи зумовлений насамперед регуляцією водного обміну та попередженням розвитку окиснювальних пошкоджень, хоча внесок окремих складових протекторного впливу на етіюльовані проростки пшениці при осмотичному стресі і дорослі рослини за посухи у ґрунтовій культурі має певні відмінності.

Отримані результати також вказують на участь поліамінів у регуляції стану продихів у рослин. Показано, що інкубація епідермісу листків гороху в середовищі з додаванням путресцину або сперміну спричиняла зменшення величини продихової апертури. Вплив поліамінів на функціонування продихового апарату є кальційзалежним. У присутності блокатора кальцієвих каналів LaCl_3 вплив путресцину і сперміну на стан продихів виявлявся слабо. Їх ефекти частково нівелювалися хелатором позаклітинного кальцію ЕГТА, проте повністю усувалися інгібітором фосфоліпази *C* неоміцином.

Отримано дані, що вказують також на причетність компонентів ліпідного сигналіngu до регуляторного впливу поліамінів на стан продихів. Вплив путресцину і сперміну на величину апертури продихів не виявлявся у присутності *n*-бутанолу – інгібітору залежного від фосфоліпази *D* утворення фосфатидної кислоти, але не його неактивного ізомеру бутанолу-2. Таким чином, отримані результати вказують на можливу роль надходження кальцію в цитозоль з внутрішньоклітинних компартментів та значення сигнальних інтермедіатів, що утворюються за участю фосфоліпаз *C* і *D*, в реалізації продихових ефектів поліамінів.

Отже, дисертаційне дослідження поглиблює уявлення про механізми стрес-протекторної дії поліамінів на рослини, пов'язані з їх залученням в процеси клітинного сигналіngu. Це створює підґрунтя для включення поліамінів в групу практично значимих фізіологічно активних речовин зі стрес-протекторними ефектами. Встановлений у ґрунтовій культурі за умов посухи, наближених до природних, стрес-протекторний вплив фоліарної обробки путресцином і сперміном на інтактні зелені рослини пшениці дозволяє розглядати цей прийом як перспективний для підвищення посухостійкості рослин у польових умовах.

SUMMARY

Kokorev O. I. Stress-protective effect of polyamines on plants and its functional relationship with signaling mediators. – Qualifying scientific work as manuscript.

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

Relevance, purpose and objectives of the study. Polyamines are aliphatic amines that have a regular spatial arrangement of positive charges in the molecule. In recent decades, the mechanisms of polyamines participation in the adaptation of plants to stressors have been actively studied. The protective effects of polyamines are partly explained by their stabilizing effect on proteins, nucleic acids and membrane structures. However, in general, the range of biological effects of polyamines is much wider. In particular, data on their participation in cellular signaling in plants, which may be due to the formation of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide in the metabolism of polyamines, as well as their effect on the state of ion channels. In addition, there is evidence of the influence of polyamines gene expression and activity of antioxidant enzymes and low molecular content of antioxidants.

However, the overall understanding about the mechanisms of stress protective action on plants by polyamines and their relationship between involvement to cell signaling and formation of specific defense reactions has not yet been formed.

PhD thesis is devoted to study the role of key signaling mediators, in particular, ROS, nitric oxide, hydrogen sulfide and calcium ions in the implementation of the stress-protective effect of di- and tetraamines on plants during hyperthermia and dehydration. The main objectives were to examine the effect of exogenous polyamines on plants resistance to hyperthermia and lack of moisture due to the

modification of antioxidant enzymes activity and the content of low molecular weight polyfunctional protective compounds; establishing the participation of ROS, nitric oxide, hydrogen sulfide and calcium ions in the implementation of the protective effect of polyamines on wheat seedlings under conditions of hyperthermia; establishing the effect of diamines on the activity of diamine oxidase (DAO) and nitrate reductase as possible enzymes of NO synthesis and the establishment of functional relationships between nitric oxide and hydrogen peroxide in the implementation of the stress-protective effects of putrescine and cadaverine; determining the effect of exogenous polyamines on the functioning of plant stomatal system and the study of the participation of calcium ions and lipid signaling components in the implementation of their effects.

Objects and methods. Winter soft wheat plants (*Triticum aestivum* L.) of the Doskonala variety and pea plants (*Pisum sativum* L.) of the Tsarevich variety were used for research. To elucidate the role of signaling mediators in the realization of the stress-protective effects of polyamines, etiolated wheat seedlings were used in experiments as a model object. On the third day of seed germination, the test polyamines (putrescine, cadaverine or spermine) were added to the environment in concentrations in the range of 0.05 to 2.5 mM and the seedlings were kept in these solutions for one day.

To determine the participation of ROS in the implementation of the physiological effects of polyamines in the incubation environment of seedlings of the respective variants, the antioxidant dimethylthiourea (DMTU – 0.15 mM) or inhibitors of DAO aminoguanidine (1 mM) and NADPH-oxidase imidazole (10 μ M) were added. In the study of probable participation of nitric oxide and calcium in the manifestation of the stress-protective effect of polyamines in some versions of the experiment seedlings were treated for 26 h with a scavenger NO PTIO (2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide, 2 mM), nitrate reductase inhibitor sodium tungstate (2 mM) or calcium antagonists – 500 μ M EGTA (extracellular Ca^{2+} chelator) or 200 μ M neomycin – an inhibitor of phospholipase C-dependent calcium entry into the cytosol from intracellular compartments.

To elucidate the functional interaction between putrescine and hydrogen sulfide, in some versions of experiments, seedlings were treated with an inhibitor of L-cysteine disulphydrase potassium pyruvate at a concentration of 0.3 mM. In variants of investigation the combined action of polyamines and these modulators of signaling mediators content, these agents were injected into the incubation environment with seedlings 2 h before adding polyamines.

During the incubation in a medium with the addition of polyamines and other effectors, as well as after stress, the content of lipid peroxidation product (LPO) of malonic dialdehyde, the content of endogenous hydrogen peroxide, nitric oxide, hydrogen sulfide, antioxidant activity enzymes (superoxide dismutase (SOD), catalase and guaiacolperoxidase), as well as DAO and nitrate reductase.

To investigate the effect of polyamines on the resistance of wheat plants to soil drought, we used wheat plants grown in plastic containers with soil. Before creating drought conditions, plants at the age of 7 days were sprayed with solutions of putrescine or spermine in concentrations of 0.25, 1 and 5 mM, control – spraying with distilled water. Drought was created for four days, starting from the 8th day of cultivation, reducing the rate of watering with a gradual decrease in soil moisture to 25% of total moisture content (TMC). In the control, soil moisture was maintained at 70% of TMC.

The content of photosynthetic pigments, the amount of proline and sugars, and the content of secondary metabolites were determined in the leaves of plants under conditions of soil drought. Plant growth parameters and water deficit were also used as a criterion for determining the stress-protective effect of polyamines.

To investigate the mechanisms of the influence of polyamines on the condition of the stomata, 12 – 15-day-old pea plants were used, which were grown in plastic containers with soil under optimal conditions. To achieve the effect of opening the stomata, the epidermis from the abaxial surface of mature leaves was kept for 2.5 h in cold white light (8000 lux) in Petri dishes with 10 mM KCl solution prepared on 10 mM Tris-HCl buffer without CO₂ (pH 6.15). After that, the epidermal samples of the experimental variants were transferred to buffer medium with the addition of

putrescine or spermine in final concentrations from 0.25 to 5 mM. Previously, using a dilute solution of HCl, the pH of the epidermis incubation medium in all variants was adjusted to 6.15. Epidermis after 60-180 min incubation, the stomata aperture size was measured.

The main results. It was found that the studied polyamines (putrescine, cadaverine and spermine) caused an increase in heat resistance of wheat seedlings. The minimum concentration of putrescine, which caused a probable increase in seedling survival, was 0.25 mM. The highest protective effect of all polyamines was found at a concentration of 1 mM. The protective effect of spermine was expressed slightly more than the effects of putrescine and cadaverine. At the same time, the stress-protective effect of the two diamines in the concentration range of 0.5 – 2.5 mM almost did not differ.

Treatment with all studied polyamines mitigated the development of oxidative stress caused by heating. There was an increase in the activity of antioxidant enzymes SOD, catalase and peroxidase in the roots and shoots of wheat seedlings.

Key cellular signaling mediators are probably involved in the implementation of the stress-protective action of polyamines. Our results indicate the participation of ROS, calcium ions and gas transmitters (nitric oxide and hydrogen sulfide) in the manifestation of the physiological effects of polyamines. In particular, it was found that under the influence of both putrescine and cadaverine there was a transient increase in the roots of hydrogen peroxide. This effect was not detected by pre-treatment of seedling roots with the antioxidant DMTU and the DAO inhibitor aminoguanidine. At the same time, treatment of the roots with the NADPH-oxidase inhibitor imidazole partially eliminated the effect of increasing the H₂O₂ content caused by the action of putrescine and had practically no effect on the effects of cadaverine. Probably, under the action of different diamines, the contribution of different enzyme systems that generate ROS differs. Treatment with DMTU and aminoguanidine eliminated the protective effect of putrescine and cadaverine on wheat seedlings under conditions of hyperthermia. At the same time, treatment with

the NADPH-oxidase inhibitor imidazole relieved the stress-protective effect of putrescine, but had little effect on the manifestation of such an effect of cadaverine.

ROS antagonists (DMTU, aminoguanidine, imidazole) eliminated the putrescine-induced effects of increased root activity of antioxidant enzymes (SOD, catalase and peroxidase). At the same time, the increase in cadaverine-induced SOD activity in the roots of wheat seedlings was not eliminated by the action of DMTU, aminoguanidine and imidazole. However, the increase in catalase and peroxidase activity under the action of cadaverine was offset by the action of DMTU. Therefore, it is likely that the effect of cadaverine on the activity of individual enzymes of the antioxidant system (SOD) can be carried out without mediation of ROS.

Using calcium antagonists, the participation of Ca^{2+} ions in the process of activation of the antioxidant system and increase of heat resistance of wheat seedlings by exogenous diamine putrescine was investigated. It was found that the increase effect of ROS generation caused by putrescine was completely eliminated by the extracellular calcium chelator EGTA, but not by the inhibitor of calcium intake from intracellular compartments neomycin. EGTA treatment also eliminated the putrescine-induced increase in antioxidant enzyme activity in seedling roots. Neomycin removed the increased effects of catalase and guaiacolperoxidase activity in the roots of wheat seedlings caused by the action of putrescine. Both EGTA and neomycin reduced the positive effect of putrescine on seedling survival after heat stress. Therefore, the value of the increase calcium in the cytosol due to the action of putrescine primarily due to its receipt from the extracellular space.

Another mediator in the implementation effects of polyamines is nitric oxide. It was found that treatment of seedlings with putrescine caused a rapid and transient increase in NO content in the roots. There was a twofold increase in DAO activity. The DAO inhibitor aminoguanidine completely eliminated the increase in NO content caused by putrescine. The increase in DAO activity and NO content was eliminated by treatment of seedlings with calcium antagonists (EGTA and neomycin). PTIO (nitric oxide scavenger) completely eliminated the effect of increasing the content of hydrogen peroxide in the roots of wheat seedlings when

they were treated with putrescine. At the same time, treatment with DMTU (hydrogen peroxide scavenger) only slightly reduced the effect of increasing the NO content in the roots caused by putrescine. NO antagonists eliminated the protective effect of putrescine under heat stress. Therefore, the participation of nitric oxide synthesized by the oxidative pathway and its functional interaction with ROS and calcium ions in the implementation of the stress-protective effect of putrescine on plant objects is shown.

The possible participation of endogenous hydrogen sulfide in the protective effect of putrescine diamine on wheat seedlings under heat stress and the activity of antioxidant enzymes in their roots were also investigated. Roots of intact seedlings incubation in the medium with the addition of putrescine, caused increased generation of hydrogen sulfide. Treatment with an inhibitor of the main enzyme of H₂S synthesis (L-cysteine disulfhydrase) potassium pyruvate partially offset the increase in resistance of seedlings to damaging heat caused by putrescine. The increase in SOD and catalase activity caused by treatment with putrescine was also eliminated by the action of potassium pyruvate. This allows us to conclude about the possible participation of hydrogen sulfide as a mediator in increasing putrescine heat resistance of wheat seedlings and activation of their antioxidant system.

An increase in the resistance of etiolated wheat seedlings to dehydration caused by PEG and the resistance of adult plants to soil drought has also been found under the influence of putrescine and spermine. Treatment with both polyamines prevented the osmotic stress-induced increase in hydrogen peroxide content in seedling shoots. In addition, exposure to putrescine and spermine seedlings prevented a stress-induced decrease in SOD activity. Treatment with putrescine caused an increase in the content of proline in seedlings under osmotic stress, while under the influence of spermine it decreased. Exogenous polyamines did not have a significant effect on the sugar content, but increased the content of anthocyanins and flavonoids in the shoots.

Spraying of plants with putrescine in concentrations in the range of 0.25 – 5 mM significantly reduced the inhibitory effect of soil drought, the effect of spermine was less effective, but also probable at $p \leq 0.05$. Putrescine significantly reduced the

water deficiency caused by drought. Under the action of spermine there was only a tendency to reduce the water deficit of the leaves.

Drought caused the effect of oxidative stress, which manifested itself in increase the content of MDA in the leaves. During pre-treatment of plants with spermine, the growth of MDA content was partially leveled, and under the action of putrescine almost completely. Treatment of plants with both polyamines helped to preserve the pool of chlorophylls and carotenoids in the leaves under stressful conditions and caused the accumulation of sugars in the leaves. Under the influence of drought, the content of anthocyanins and flavonoids absorbed in the UV-B region decreased significantly in the leaves. Spermine pre-treatment somewhat mitigated the negative effects of drought on anthocyanin content. Under the action of both putrescine and spermine there was a stabilization of the content in the leaves of flavonoids absorbed in UV-B. Thus, the protective effect of polyamines on wheat plants in drought conditions is primarily due to the regulation of water metabolism and prevention of oxidative damage, although the contribution of some components of the protective effect on etiolated wheat seedlings under osmotic stress and adult plants for drought in soil culture has some differences.

The obtained results also indicate the participation of polyamines in the regulation of the condition of the stomata in plants. It has been shown that incubation of pea leaf epidermis in medium with the addition of putrescine or spermine caused a decrease in the size of the respiratory aperture. The effect of polyamines on the functioning of the respiratory system is calcium-dependent. In the presence of a calcium channel blocker LaCl_3 , the effect of putrescine and spermine on the condition of the stomata was weak. Their effects were partially offset by the extracellular calcium chelator EGTA, but completely eliminated by the phospholipase C inhibitor neomycin.

Data were obtained that also indicate on the involvement of LPO in the regulatory effect of polyamines on the condition of the stomata. The effect of putrescine and spermine on the value of the aperture of the stomata was not detected in presence of n-butanol – an inhibitor of phospholipase D-dependent formation of

phosphatidic acid, but not its inactive isomer of butanol-2. Thus, the results indicate the possible role of calcium in the cytosol from intracellular compartments and the importance of signaling intermediates formed by phospholipases *C* and *D* in the implementation of the respiratory effects of polyamines.

Thus, the dissertation research deepens the understanding of the mechanisms of stress-protective action of polyamines on plants associated with their involvement in cellular signaling processes. This creates a basis for the inclusion of polyamines in the group of practically significant physiologically active substances with stress-protective effects. Established in soil culture under drought conditions close to natural, the stress-protective effect of foliar treatment with putrescine and spermine on intact green wheat plants allows us to consider this technique as promising for increasing drought resistance of plants in the field.

ПЕРЕЛІК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

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

1. **Kokorev, A. I.**, Kolupaev, Y. E., Yastreb, T. O., Horielova, E. I., Dmitriev, A. P. (2021). Realization of Polyamines' Effect on the State of Pea Stomata with the Involvement of Calcium and Components of Lipid Signaling. *Cytology and Genetics*, 55(2), 117–124. doi: 10.3103/S0095452721020079 (Особистий внесок дисертанта: участь у проведенні експериментів, обробка результатів)
2. Kolupaev, Y. E., **Kokorev, A. I.**, Yastreb, T. O., Horielova, E. I. (2019). Hydrogen peroxide as a signal mediator at inducing heat resistance in wheat seedlings by putrescine. *Ukrainian Biochemical Journal*, 91(6), 103–111. doi: 10.15407/ubj91.06.103 (Особистий внесок дисертанта: участь у проведенні експериментів, обробці результатів, підготовці тексту статті)

Статті у наукових фахових виданнях України:

3. **Кокорев О. І.** (2021). АФК-залежний стрес-протекторний вплив діамінів на проростки пшениці за умов гіпертермії. *Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія*, 2(53), 53–60. doi: 10.35550/vbio2021.02.053 (Особистий внесок дисертанта: участь у проведенні експериментів, обробка та інтерпретація результатів, участь у підготовці тексту статті)

4. **Кокорев, О. І.**, Колупаєв, Ю. Є., Карпець, Ю. В., Дяченко, А. І. (2020). Участь оксиду азоту в індукуванні теплостійкості проростків пшениці путресцином. *Доповіді Національної академії наук України*, 12, 85–92. doi: 10.15407/dopovidi2020.12.085 (Особистий внесок дисертанта: участь у проведенні експериментів, обробка та інтерпретація результатів, участь у підготовці тексту статті)

5. **Кокорев, О. І.**, Шклярєвський, М. А., Швиденко, М. В., Колупаєв, Ю. Є. (2020). Стрес-протекторний вплив путресцину і сперміну на рослини пшениці за ґрунтової посухи. *Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія*, 3(51), 58–70. doi: 10.35550/vbio2020.03.058 (Особистий внесок дисертанта: участь у проведенні експериментів, обробка та інтерпретація результатів, участь у підготовці тексту статті)

6. **Кокорев, А. І.**, Шклярєвський, М. А., Швиденко, Н. В., Колупаєв, Ю. Е. (2020). Возможная роль сероводорода в индуцировании путресцином активности антиоксидантных ферментов и теплоустойчивости проростков пшеницы. *Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія*, 1(49), 44–53. doi: 10.35550/vbio2020.01.044 (Особистий внесок дисертанта: участь у проведенні експериментів, обробка та інтерпретація результатів, участь у підготовці тексту статті)

7. **Кокорев, А. І.**, Колупаєв, Ю. Е., Ястреб, Т. О., Горелова, Е. І. (2019). Влияние экзогенных полиаминов на состояние антиоксидантной и осмопротекторной систем проростков пшеницы при обезвоживании. *Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія*, 3(48), 52–65. doi: 10.35550/vbio2019.03.052 (Особистий внесок дисертанта: участь у проведенні

експериментів, обробка та інтерпретація результатів, участь у підготовці тексту статті)

8. **Кокорев, А. И.**, Швиденко, Н. В., Ястреб, Т. О., Колупаев, Ю. Е. (2018). Индуцирование экзогенными полиаминами теплоустойчивости проростков пшеницы и активности антиоксидантных ферментов. *Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія*, 3(45), 85–93. doi: 10.35550/vbio2018.03.085 (Особистий внесок дисертанта: участь у проведенні експериментів, обробка та інтерпретація результатів, участь у підготовці тексту статті)

9. Колупаев, Ю. Е., **Кокорев, А. И.** (2019). Участие полиаминов в регуляции редокс-гомеостаза у растений. *Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія*, 1(46), 6–22. doi: 10.35550/vbio2019.01.006 (Особистий внесок дисертанта: участь у проведенні експериментів, обробка та інтерпретація результатів, участь у підготовці тексту статті)

10. Колупаев, Ю. Е., **Кокорев, О. І.** (2019). Антиоксидантная система и устойчивость растений к недостатку влаги. *Физиология растений и генетика*, 51(1), 28–54. doi: 10.15407/frg2019.01.028 (Особистий внесок дисертанта: участь у проведенні експериментів, обробка та інтерпретація результатів, участь у підготовці тексту статті)

Матеріали конференцій:

11. **Кокорев, А. И.**, Ястреб, Т. О., Швиденко, Н. В., Горелова, Е. И., Колупаев, Ю. Е. (2018). Влияние экзогенных полиаминов на активность антиоксидантных ферментов в проростках пшеницы и их теплоустойчивость. *Регуляция роста, развития и продуктивности растений. Материалы IX Международной научной конференции (Минск, Беларусь, 24–26 июня 2018 г.)* (С. 66). Минск: Колоград.

12. **Kokorev, O. I.**, Kolupaev, Yu. E., Karpets, Yu. V., Ivanchenko, O. E. (2020). Induction of wheat plants resistance to soil drought by exogenous polyamines. *Сучасні проблеми генетики, біотехнології і біохімії сільськогосподарських рослин. Тези доповідей Міжнародної наукової*

конференції (Одеса, Україна, 21 жовтня 2020 р.) (С. 94–95). Одеса: СГІ–НЦНС.

13. **Кокорев, О. І.**, Швиденко, М. В., Колупаєв, Ю. Є. (2021). АФК-залежне індукування теплостійкості проростків пшениці дією кадаверину. *Актуальні проблеми фізіології рослин і генетики. Тези доповідей Міжнародної наукової конференції (Київ, 17 липня 2021 р.)* (С. 170–172). Київ: ІФРГ.

14. **Kokorev, A. I.**, Kolupaev, Yu. E., Diachenko, A. I., Dmitriev, A. P. (2021). Signal mediators in implementation of putrescine influence on state of *pisum sativum* stomata. *Plants stress and adaptation. Proceedings of the International scientific conference (Kharkiv, Ukraine, February 25-26, 2021)* (pp. 10–11). Kharkiv: KhNAU.

15. **Kokorev, A. I.**, Kolupaev, Yu. E., Karpets, Yu. V., Lugovaya, A. A. (2021). Participation of reactive oxygen species and nitric oxide in heat resistance induction in wheat seedlings by exogenous putrescine. *Plants stress and adaptation. Proceedings of the International scientific conference (Kharkiv, Ukraine, February 25-26, 2021)* (pp. 12–13). Kharkiv: KhNAU.

16. **Кокорев, О. І.**, Швиденко, М. В., Лугова, Г. А., Колупаєв, Ю. Є. (2021). Індукування ферментативної антиоксидантної системи проростків пшениці та їх теплостійкості екзогенним кадаверином. *Стрес і адаптація рослин. Тези міжнародної наукової конференції (Харків, Україна, 25-26 лютого 2021 р.)* (с. 245). Харків: ХНАУ.

17. Колупаєв, Ю. Є., **Кокорев, О. І.**, Ястреб, Т. О., Горєлова, О. І. (2019). Участь активних форм кисню в індуванні стійкості проростків пшениці поліамінами. *Медична та клінічна хімія. Матеріали XII Українського Біохімічного конгресу (Тернопіль, 30 вересня – 04 жовтня 2019 р.)* (С. 309). Тернопіль: ТНМУ.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	24
ВСТУП	25
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	32
1.1. Гіпертермія і посуха як основні стресові чинники для культурних рослин	32
1.2. Поліаміни і адаптація рослин до стресорів	34
1.2.1. Загальні відомості про поліаміни та їх функції у рослин	34
1.2.2. Короткі відомості про локалізацію, синтез і катаболізм поліамінів	36
1.2.3. Залучення поліамінів у процеси клітинного сигналіngu	40
1.2.4. Участь поліамінів у клітинних механізмах стійкості рослин	45
Висновки до розділу 1	51
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛ, УМОВИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	54
2.1. Матеріал для досліджень, його характеристика та дизайн експериментів	54
2.1.1. Дизайн експериментів з дослідження впливу поліамінів на теплостійкість проростків пшениці	54
2.1.2. Дизайн експериментів з дослідження впливу поліамінів на стійкість етіюльованих проростків пшениці до осмотичного стресу	56
2.1.3. Дизайн експериментів з вивчення впливу поліамінів на стійкість рослин пшениці до ґрунтової посухи	57
2.1.4. Дизайн і методика проведення експериментів з дослідження впливу поліамінів на стан продихів рослин гороху	58
2.2. Визначення фізіологічних і біохімічних показників	59
2.2.1. Визначення водного дефіциту листків рослин пшениці	59
2.2.2. Оцінка пошкоджень мембран коренів проростків пшениці	59

	22
після теплового стресу	
2.2.3. Визначення вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ)	60
2.2.4. Визначення вмісту пероксиду водню	60
2.2.5. Визначення вмісту оксиду азоту	60
2.2.6. Визначення вмісту сірководню	61
2.2.7. Визначення активності діаміноксидази (ДАО)	61
2.2.8. Визначення активності нітратредуктази (НР)	62
2.2.9. Визначення активності антиоксидантних ферментів	62
2.2.10. Визначення вмісту проліну	63
2.2.11. Визначення вмісту цукрів	63
2.2.12. Визначення вмісту антоціанів і безбарвних флавоноїдів	64
2.2.13. Визначення вмісту фотосинтетичних пігментів	64
2.3. Повторення і статистична обробка результатів	64
РОЗДІЛ 3. ІНДУКУВАННЯ ПОЛІАМІНАМИ СТІЙКОСТІ РОСЛИН ДО ГІПЕРТЕРМІЇ	66
3.1. Вплив путресцину, кадеверину і сперміну на теплостійкість проростків пшениці і стан їх антиоксидантної системи	66
3.2. Роль сигнальних посередників у процесах індукування теплостійкості рослинних об'єктів путресцином і кадеверином	73
3.2.1. Активні форми кисню	73
3.2.2. Іони кальцію	89
3.2.3. Оксид азоту	96
3.2.4. Сірководень	103
Висновки до розділу 3	110
РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ ЕКЗОГЕННИХ ПОЛІАМІНІВ НА СТІЙКІСТЬ РОСЛИН ДО ЗНЕВОДНЕННЯ	115
4.1. Вплив путресцину і сперміну на стійкість етіольованих проростків пшениці до зневоднення, спричинюваного дією ПЕГ 6000	115

	23
4.1.1. Ростові показники	116
4.1.2. Стан ферментативної антиоксидантної системи	118
4.1.3. Осмоліти і низькомолекулярні антиоксиданти	120
4.2. Вплив поліамінів на стійкість рослин пшениці до ґрунтової посухи	124
4.2.1. Ріст рослин	124
4.2.2. Водний дефіцит	126
4.2.3. Прояв ефекту окиснювального стресу	127
4.2.4. Стан пігментного комплексу	127
4.2.5. Сумісні осмоліти і антиоксиданти	128
Висновки до розділу 4	132
РОЗДІЛ 5. РЕГУЛЯЦІЯ ЕКЗОГЕННИМИ ПОЛІАМІНАМИ	135
ПРОДИХОВОГО АПАРАТУ РОСЛИН	
5.1. Вплив путресцину і сперміну на стан продихів листків гороху	136
5.2. Сигнальні посередники у реалізації продихових ефектів поліамінів	138
Висновки до розділу 5	143
ВИСНОВКИ	145
СПИСОК ВИКОРСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	148
ДОДАТКИ	177

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

NOS – NO-синтаза

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

RuBisCO – Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase

АБК – абсцизова кислота

АОС – антиоксидантна система

АФК – активні форми кисню

ГПО – гваяколпероксидаза

ДАО – діаміноксидаза

ДМТС – диметилтіосечовина

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

ЕГТА – етиленглікольтетраоцтова кислота

ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота

НР – нітратредуктаза

МДА – малоновий діальдегід

ПА – поліаміни

ПВ – повна вологоємність

ПАО – поліаміноксидаза

ПЕГ – поліетиленгліколь

ПОЛ – пероксидне окиснення ліпідів

СОД – супероксиддисмутаза

ТБК – 2-тіобарбітурова кислота

ТХО – трихлороцтова кислота

ФС – фотосистема

ВСТУП

Реакції рослин у відповідь на дію несприятливих чинників включають в себе запуск універсальних захисних систем, до яких належать, зокрема, синтез стресових білків, активація антиоксидантної системи і накопичення поліфункціональних низькомолекулярних сполук (Ahuja et al., 2010, Follis-Pereira et al., 2016). Ймовірно, що з подібними реакціями у багатьох випадках пов'язані ефекти неспецифічної або перехресної стійкості рослин до стресових чинників різної природи. Прояв перехресної стійкості за дії на організм стресового чинника може бути зумовлений не тільки індукцією одним стресором широкого спектра адаптивних реакцій, а й здатністю протекторних сполук виконувати множинні функції (Соловьян, 1990). Серед таких мультифункціональних органічних молекул особливе значення для адаптації рослин має накопичення ряду азотовмісних сполук – вільних амінокислот (в першу чергу проліну), бетаїнів (метильованих похідних амінокислот) і поліамінів.

Поліаміни являють собою аліфатичні аміни, що мають регулярне просторове розташування позитивних зарядів в молекулі (Kuznetsov, Shevyakova, 2011). Найпоширеніші у рослин поліаміни путресцинового ряду – путресцин, спермідин і спермін (Gupta et al., 2013). Менш поширеним поліаміном цього ж ряду є кадаверин.

Останніми десятиліттями активно досліджуються механізми участі поліамінів в адаптації рослин до несприятливих умов (Alcazar et al., 2006; Groppa, Benavides, 2008). Частково протекторні ефекти поліамінів пояснюють їх стабілізуючою дією на білки, нуклеїнові кислоти і мембранні структури (Bouchereau et al., 1999; Kaur-Sawhney et al., 2003). Однак в цілому спектр біологічних ефектів поліамінів значно ширший. Зокрема, в останні роки з'явилися повідомлення про їх можливу участь в клітинному сигналінгу у рослин, що може бути зумовлено утворенням активних форм кисню (АФК) і

оксида азоту при їх метаболізмі (Pal et al., 2015), впливом на стан іонних каналів (Dobrovinskaya et al., 1999). Є також дані, що вказують на здатність поліамінів впливати на експресію генів антиоксидантних ферментів (Tanou et al., 2014; Pal et al., 2015) і таким чином брати участь в регуляції редокс-гомеостазу. Зрештою, у роботі Li і співавт. (2016) вперше отримані дані, що вказують на роль сірководню в реалізації протекторної дії путресцина на рослини ячменю, що зазнали опромінення УФ-В. Обробка рослин путресцином, що зменшувала пошкодження, спричинювані дією УФ-В, приводила до підвищення в листках вмісту сірководню. Однак роль H_2S в генерації поліамінами сигналів, які індукують стійкість рослин до інших стрес-факторів залишалася не дослідженою.

У цілому наявні на момент початку роботи дані літератури не дозволяли скласти загальну картину залучення поліамінів в процеси клітинного сигналінгу, зокрема, відкритим залишалось питання про послідовність розташування посередників у сигнальних ланцюгах, що активуються при підвищенні в клітинах вмісту поліамінів.

В літературі є досить чисельні повідомлення про підвищення ендogenous вмісту поліамінів у рослин у відповідь на дію стресорів (Gill, Tuteja, 2010; Saha et al., 2015) та протекторний вплив екзогенних поліамінів за несприятливих умов (Mostofa et al., 2014; Peynevandi et al., 2018). Однак конкретні захисні реакції, що активуються під впливом поліамінів досліджені далеко не повністю. Є відомості, що вказують на вплив поліамінів на активність антиоксидантних ферментів. Зокрема, показано що обробка рослин нуту путресцином, сперміном і спермідином сприяла підвищенню активності каталази і супероксиддисмутази (СОД) за умов холодowego стресу (Nayyar, Chander, 2004). Обприскування рослин рису спермідином сприяло підвищенню активності СОД, каталази, глутатіон-S-трансферази і аскорбатпероксидази після впливу гіпертермії (Mostofa et al., 2014). Є також дані про підвищення під впливом поліамінів вмісту низькомолекулярних антиоксидантів – глутатіону, аскорбінової кислоти та проліну у рослин в умовах дії різних стресорів (Roouchoury et al., 2011;

Ghosh et al., 2012; Mostofa et al., 2014). Водночас показано, що обприскування рослин пшениці 0,1 мМ путресцином, навпаки, знижувало вміст проліну у листках за умов посухи, хоча й підвищувало вміст цукрів (Gupta et al., 2012). В цілому комплексних досліджень впливу поліамінів на антиоксидантну і осмопротекторну системи рослин дотепер недостатньо.

Ще одним механізмом стрес-протекторної дії поліамінів на рослини за умов зневоднення може бути їх вплив на стан продихів. Встановлено, що спермін, спермідин, путресцин і кадаверин здатні спричинити закривання продихів, впливаючи на потенціал-залежні калієві канали і перешкоджаючи надходженню калію у замикаючі клітини (Liu et al., 2000). Також показано, що путресцин як субстрат діаміноксидази може бути задіяний в індукованому АБК закриванні продихів (An et al., 2008). Проте дотепер багато в чому відкритим залишається питання участі сигнальних посередників, зокрема, різних пулів кальцію у реалізації впливу поліамінів на стан продихів. Слабо вивчене і значення у такому процесі продуктів реакцій, які каталізуються фосфоліпазами *C і D*.

Таким чином, загальні уявлення про механізми стрес-протекторної дії на рослини поліамінів та про зв'язок між їх залученням у процеси клітинного сигналіngu і розвитком конкретних захисних реакцій дотепер повністю не сформувалися.

Мета і завдання досліджень. Основною метою роботи було встановити роль ключових сигнальних посередників, зокрема, АФК, оксиду азоту, сірководню та іонів кальцію у реалізації стрес-протекторної дії ді- і тетраамінів на рослини за гіпертермії та зневоднення. Для досягнення мети було поставлено такі завдання:

- Дослідити вплив екзогенних поліамінів на виживаність проростків пшениці після потенційно летального теплового стресу та ріст і окиснювальні пошкодження рослин за умов нестачі води;
- Оцінити функціонування антиоксидантної системи рослин за дії на них екзогенних поліамінів і гіпертермії та зневоднення;

- Встановити участь АФК, оксиду азоту, сірководню та іонів кальцію в реалізації захисної дії поліамінів на проростки пшениці за умов гіпертермії;
- Порівняти особливості впливу двох діамінів – путресцину і кадаверину – на редокс-гомеостаз рослинних клітин;
- Дослідити вплив путресцину на активність у коренях проростків пшениці діаміноксидази і нітратредуктази як можливих ферментів синтезу NO та встановити функціональні зв'язки між оксидом азоту і пероксидом водню при реалізації стрес-протекторних ефектів цього діаміну.
- Дослідити вплив поліамінів та зневоднення рослин на вміст низькомолекулярних поліфункціональних протекторних речовин (проліну, цукрів, флавоноїдів);
- Визначити дію екзогенних поліамінів на функціонування продигового апарату листків гороху та дослідити участь іонів кальцію і компонентів ліпідного сигналіngu в реалізації таких ефектів поліамінів.

Об'єкт досліджень: механізми індукування стрес-протекторних систем рослин дією поліамінів за участю сигнальних посередників (АФК, NO, H₂S, Ca²⁺, компонентів ліпідного сигналіngu).

Предмет досліджень: утворення АФК, NO, H₂S, зміни кальцієвого гомеостазу за дії на рослини екзогенних поліамінів; функціонування антиоксидантної, осмопротекторної систем та продигового апарату за дії на рослини поліамінів і стресових чинників.

Методи досліджень: фізіологічні (кількісна оцінка фізіологічного стану рослин, фармакологічний (інгібіторний) аналіз), біохімічні – визначення утворення сигнальних посередників (АФК, оксиду азоту, сірководню), аналіз активності ферментів сигнальних систем і антиоксидантного захисту, вмісту пігментів та осмолітів, продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), цитологічні (аналіз стану продигового апарату листків рослин); статистичні.

Наукова новизна. Вперше на одному модельному об'єкті (інтактних коренях етіюльованих проростків пшениці) проведено комплексне дослідження

участі основних компонентів сигнальної мережі рослинних клітин (АФК, оксиду азоту, сірководню, іонів кальцію) у реалізації стрес-протекторної дії поліамінів.

Вперше встановлено, що індукування теплостійкості рослин і ферментативної антиоксидантної системи дією екзогенного путресцину включає в себе підвищення вмісту цитозольного кальцію в клітинах, зростання активності діаміноксидази і пов'язане з ним зростання кількості оксиду азоту і пероксиду водню, які виконують роль сигнальних посередників.

Показано, що у розвитку теплостійкості проростків пшениці за дії путресцину бере участь сірководень, вміст якого в тканинах зростає у присутності цього діаміну. Ефект активації путресцином антиоксидантних ферментів усувається дією антагоністів сірководню. Водночас комбінований вплив на проростки путресцину і донора сірководню NaHS у певному діапазоні концентрацій спричиняє посилення впливу цих агентів на антиоксидантну систему і теплостійкість.

Встановлено як схожість, так і відмінність механізмів впливу двох діамінів – путресцину і маловивченого кадаверину – на ферментативну антиоксидантну систему проростків пшениці, зокрема, здатність кадаверину спричиняти підвищення активності СОД без участі АФК як сигнальних посередників.

Вперше показано значення надходження кальцію в цитозоль з внутрішньоклітинних компартментів та участь сигнальних інтермедіатів, що утворюються за участю фосфоліпаз *C* і *D*, в реалізації продигових ефектів поліамінів.

Практичне значення. Дисертаційне дослідження поглиблює уявлення про механізми стрес-протекторної дії поліамінів на рослини, пов'язані з їх залученням в процеси клітинного сигналіngu. Це створює підґрунтя для включення поліамінів в групу практично значимих фізіологічно активних речовин зі стрес-протекторними ефектами.

Встановлений у ґрунтовій культурі за умов посухи, наближених до природних, стрес-протекторний вплив фоліарної обробки путресцином і сперміном на інтактні зелені рослини пшениці дозволяє розглядати цей прийом як перспективний для підвищення посухостійкості рослин у польових умовах.

Результати роботи використовуються при викладанні курсів «Фізіологія рослин» та «Фізіологія рослин з основами біохімії» при підготовці бакалаврів та курсу «Фізіологія стресу і адаптації рослин» при підготовці магістрів в ХНАУ ім. В.В. Докучаєва, а також курсу «Внутрішньоклітинні сигнальні системи та механізми адаптивності рослин і мікроорганізмів», що читається в ХНУ ім. В.Н. Каразіна. Вони можуть бути використані при вивченні відповідних дисциплін студентами інших класичних, аграрних і педагогічних ЗВО, а також при проведенні досліджень у галузі клітинного сигналіngu і фізіології стійкості рослин.

Особистий внесок здобувача. Дисертант самостійно опрацював джерела літератури, опанував відповідні методи досліджень та провів необхідні експерименти. Інтерпретація та узагальнення результатів і підготовка публікацій здійснювалися за участю наукового керівника. Частина експериментів проведена спільно зі співробітниками ХНАУ ім. В.В. Докучаєва д.б.н. Ю.В. Карпцем, к.б.н. Т.О. Ястреб, к.б.н. Г.А. Луговою, к.с.-г.н. М.В. Швиденком, М.А. Шкляревським. Експерименти з вивчення механізмів впливу поліамінів на стан продихів проводилися спільно з чл.-кор. НАН України О.П. Дмитрієвим (Інститут клітинної біології і генетичної інженерії НАН України). Частка особистої участі здобувача становить понад 70%.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційні дослідження виконувалися в рамках НДР кафедри ботаніки і фізіології рослин Харківського національного аграрного університету ім. В.В. Докучаєва – «Роль сигнальних посередників і сполук з гормональною активністю у формуванні адаптивних реакцій рослин на абіотичні стресори» (№ держреєстрації 0117U002427; Згідно з наказом МОН України № 198 від 10.02.2017) та «Механізми індукування компонентів стрес-протекторної

системи рослин» (2016-2020 рр.) (№ держреєстрації 0117U002514), а також гранту за програмою «Grants for Multidisciplinary research teams 2020 of Ministry of Foreign Affairs of the Czech Republic. Direction curator – Czech University of Life Science, Prague» (проекту Czech Republic Development Cooperation «Платформа AgriSciences для розвитку науки у вищих навчальних закладах України»).

Апробація результатів досліджень. Основні результати дисертаційних досліджень були представлені на Міжнародній науковій конференції «Регуляція росту, розвитку и продуктивности растений» (Мінськ, 24 – 26 жовтня 2018 р.); XII Українському біохімічному конгресі (Тернопіль, 30 вересня – 04 жовтня 2019 р.); Міжнародній науковій конференції «Сучасні проблеми генетики, біотехнології і біохімії сільськогосподарських рослин» (Одеса, 21 жовтня 2020 р.); Міжнародній науковій конференції «Стрес і адаптація рослин» (Харків, 25-26 лютого 2021 р.); Міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми фізіології рослин і генетики» (Київ, 17 липня 2021 р.).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 17 наукових праць, у тому числі 10 статей у фахових виданнях, з них 2 у журналах, що входять до наукометричної бази SCOPUS.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, п'яти розділів (огляд літератури, опис методів досліджень та використаних об'єктів, три експериментальні розділи), висновків та списку використаних джерел. Робота викладена на 176 сторінках, містить 45 рисунків, 1 таблицю. Список цитованої літератури налічує 250 джерел.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Гіпертермія і посуха як основні стресові чинники для культурних рослин

Глобальне потепління та посухи є основними сучасними кліматичними загрозами для агропромислового виробництва і біорізноманіття рослин (Gerten et al., 2007). Зміни температури належать до чинників, що особливо різко і сильно впливають на рослини оскільки їх дія не обмежується внутрішньоклітинними бар'єрами (Альтергот, 1981). Встановлено, що за період 1979-2003 рр. середньорічні і мінімальні температури на планеті підвищилися на 0,35 і 1,13°C, відповідно (Peng et al., 2004). Згідно з прогнозними кліматичними моделями, до кінця 21 століття температура на планеті збільшиться на $(3,7 \pm 0,7)^\circ\text{C}$ (Stocker et al., 2013). Підвищення температури на кожен один градус призводить до зниження глобальної урожайності основних сільськогосподарських культур на 3-8% (Li et al., 2018). У зв'язку з цим проблема механізмів адаптації рослин до гіпертермії і індукування їх стійкості до дії високих температур нині надзвичайно актуальна для практики рослинництва.

Не менш серйозною сучасною кліматичною загрозою є зміна кількості та характеру розподілу опадів в часі і просторі (Gerten et al., 2007). Прогнозується, що до останньої третини нинішнього століття вологість ґрунту в багатьох частинах земної кулі зменшиться порівняно з початком ХХІ століття на тлі істотного збільшення відмінностей за кількістю опадів між окремими регіонами.

Посуха вважається одним з основних чинників середовища, що лімітують ріст і продуктивність рослин (Chaves et al., 2004). Її вплив на рослини зазвичай супроводжується дією високої температури, надмірної освітленості, засолення ґрунту та інших стресорів (Wilkinson, Davies, 2010).

Одним з ранніх негативних ефектів впливу на рослини високої температури є зміни внутрішньої структури хлоропластів, пов'язані з порушенням стану ліпідної фракції (Li et al., 2018). В умовах гіпертермії підвищується плинність тілакоїдних мембран, відбувається розпад окремих білків в коровому комплексі мембран, і порушується робота фотосинтезу (ФС), особливо ФС II (Komayama et al., 2007; Allakhverdiev et al., 2008; Yamamoto et al., 2008; Bernfur et al. 2017).

У багатьох випадках теплові пошкодження призводять і до втрати активності рибулозобісфосфаткарбоксилази (RuBisCO) (Allakhverdiev et al., 2008; Sharkey, Zhang, 2010; Fahad et al., 2017). Зниження фіксації CO₂ разом з мембранними порушеннями також підвищує ймовірність стохастичного утворення АФК.

Генерація АФК при тепловому стресі посилюється не тільки в хлоропластах. Також можливе посилення випадкового утворення АФК в мітохондріях і пероксисомах (Choudhury et al. 2017).

Порушення просторово-часового балансу між генерацією і видаленням АФК може призводити до окиснювальних пошкоджень біомакромолекул і деструктивних клітинних процесів, які прийнято називати окиснювальним стресом (Suzuki, Mittler, 2006). Такий стрес спричиняється впливом на рослини, як гіпертермії, так і посухи. Так, за впливу посухи, насамперед у зв'язку з обмеженням надходження вуглекислого газу в фотосинтезуючі тканини, створюються передумови для посилення утворення АФК та порушення процесів редокс-регуляції.

Особливе значення для стійкості рослин як до посухи, так і до гіпертермії мають такі захисні системи, як антиоксидантна, осмопротекторна і система регуляції продихового апарату рослин (Kudoyarova et al., 2013; Li, Liu, 2016; Zagorchev et al., 2016).

В останні десятиліття накопичено великий обсяг феноменологічних відомостей про значення компонентів антиоксидантної системи (АОС) для жаро- і посухостійкості окремих видів і таксономічних груп рослин.

Практичний інтерес становить використання показників функціонування АОС як маркерів стійкості рослин, в тому числі при оцінці селекційного матеріалу. У багатьох працях показаний досить тісний зв'язок між показниками АОС і жаро- та посухостійкістю рослин різних генотипів. В першу чергу це стосується активності СОД, аскорбатпероксидази і вмісту проліну, що виступає одночасно у ролі осмопротектора і антиоксиданту (Маменко, Ярошенко, 2012; Singh et al., 2012; Kaur, Asthir, 2015).

Одним з головних гормонів, задіяних в адаптації до посухи, вважається АБК, синтез і накопичення якої індукується осмотичним стресом (Neill, Burnett, 1999). При цьому фізіологічні ефекти АБК при реакції рослин на нестачу вологи реалізуються у функціональній взаємодії з іншими фітогормонами, насамперед цитокінінами (Веденичова, Косаківська, 2017). Поряд з АБК в реакції рослин на зневоднення задіяний широкий спектр регуляторних сполук. Зокрема, закривання продихів як реакція на посуху може бути спричинене етиленом, жасмоновою і саліциловою кислотами (Suhita et al., 2004; Liu et al., 2012; Miura et al., 2013), а також поліамінами (Agurla et al., 2018). Останні нині розглядають як стресові метаболіти з широким спектром регуляторних ефектів (Pal et al., 2015). Такі ефекти можуть бути зумовлені прямим і опосередкованим залученням поліамінів у сигнальні процеси.

1.2. Поліаміни і адаптація рослин до стресорів

1.2.1. Загальні відомості про поліаміни та їх функції у рослин.

Поліаміни (ПА) – аліфатичні аміни, що існують у формі полікатіонів, виявлені у найрізноманітніших клітинах еукаріот і прокаріот (Pal et al., 2015; Liu et al., 2016; 2017). Найбільш поширеними ПА у рослин є путресцин, спермідин і спермін (Chen et al., 2019). ПА знайдені практично в усіх компартментах рослинної клітини (Kuznetsov et al., 2006). Великий їх пул локалізований у клітинних стінках, вакуолях, хлоропластах, мітохондріях і ядрі

(Kuznetsov, Shevyakova, 2011; Minosha et al., 2014). ПА зустрічаються у вільних, кон'югованих (зв'язаних з малими молекулами, такими як фенольні кислоти) або зв'язаних з різними макромолекулами формами (Pal et al., 2015).

ПА причетні до регуляції широкого кола функцій рослин, зокрема, поділу і диференціації клітин, ризогенезу, цвітіння, росту, розвитку та дозрівання плодів (Khan et al., 2008; Kuznetsov, Shevyakova, 2011; Abbasi et al., 2017). Вважають, що їх функції багато в чому схожі з функціями класичних фітогормонів, проте ПА присутні в рослинних клітинах і виявляють фізіологічну активність в концентраціях, значно вищих від гормональних – 10^{-9} – 10^{-5} М (Kuznetsov et al., 2006).

Як окрему функцію ПА розглядають їх стабілізуючий вплив на білки, нуклеїнові кислоти і мембранні структури, зумовлений насамперед їх катіонним станом за фізіологічних умов (Kaur-Sawhney et al., 2003). Вони можуть зв'язуватися з фосфоліпідними «голівками» мембран, що впливає на їх проникність. ПА також можуть зв'язуватися з різними білками і впливати на їх функціональну активність. Зв'язування ПА з хроматином може спричинити зміни доступності геномних сайтів до ДНК- або РНК-полімераз, що приводить до зміни синтезу ДНК і РНК (Singh et al., 2018).

Особливо важлива роль ПА за дії на рослини стресових чинників. За таких умов вміст ПА у рослин може зростати в кілька разів і навіть на порядки (Chen et al., 2019). Підвищення вмісту ПА в тканинах вважається однією з ознак дії на рослини абіотичних стресорів, зокрема, екстремальних температур, посухи, засолення, дії пестицидів (Alcazar et al., 2020; Коць та ін., 2021). За дії стресорів також відбувається зміна співвідношення між вмістом окремих поліамінів, наприклад, за умов сольового стресу зареєстровано зменшення вмісту путресцину через його залучення для синтезу спермідину і сперміну (Stetsenko et al., 2015). Водночас накопичені численні відомості про стрес-протекторний вплив на рослини екзогенних ПА (Luo et al., 2020; Pinero et al., 2021). Встановлено, що трансформація рослин генами, причетними до синтезу ПА, підвищує їх стійкість до абіотичних стресорів (Seo et al., 2019), а

трансгенні рослини з пригніченням метаболічних шляхів синтезу ПА мають підвищену чутливість до несприятливих чинників (Mellidou et al., 2020).

Нині з'ясовані окремі механізми стрес-протекторної дії ПА в рослинних клітинах. Крім вищезгаданих ефектів стабілізації ПА біомакромолекул і мембранних структур, це їх пряма антиоксидантна дія (Kumar, Mallick, 2019), індукування експресії генів стресових білків (Toumi et al., 2019), участь у регуляції синтезу осмолітів (Singh et al., 2018) та стану прорихів (Alcazar et al., 2020).

Останніми роками з'являються відомості про залучення ПА в процеси клітинного сигналіngu (Pal et al., 2015). Це пов'язано насамперед з утворенням при окиснювальній деградації ПА важливої сигнальної молекули пероксиду водню та здатністю ПА безпосередньо впливати стан іонних (у тому числі кальцієвих) каналів (Abbasi et al., 2017). Проте дані щодо сигнальної ролі ПА поки що малочисельні і розрізнені. Особливо це стосується зв'язків ПА з процесами сигналіngu з участю газотрансмітерів, зокрема, оксиду азоту (NO) і сірководню (H₂S). Недостатньо вивчена роль сигнальної мережі в процесах індукування ПА конкретних захисних реакцій. Також поки що відсутні цілісні уявлення про специфіку механізмів стрес-протекторної дії конкретних ПА, особливо у зв'язку з їх участю в сигнальних процесах.

1.2.2. Короткі відомості про локалізацію, синтез і катаболізм поліамінів.

Поширеними ПА вищих рослин є діаміни путресцин і кадаверин, триамін спермідин, тетрааміни спермін і термоспермін (Nahar et al., 2016a; Sobieszczuk-Nowicka, 2017; Takahashi et al., 2017; Chen et al., 2019) (рис. 1.1). Інші ПА зустрічаються лише у певних видів рослин або за особливих умов (Chen et al., 2019). Для ПА характерний тканино- і органоспецифічний розподіл у рослин. Наприклад, найпоширенішим ПА у листках є путресцин, тоді як спермідин і спермін у більшій кількості локалізуються в коренях (Takahashi et al., 2017).

Для різних ПА також характерні істотні відмінності в локалізації всередині клітин. Наприклад, в клітинах моркви виявлено, що путресцин накопичується переважно в цитоплазмі, а спермін в клітинній стінці (Cai et al., 2006). Хоча в цілому, як зазначалося, ПА локалізуються у різних компартментах рослинних клітин, зокрема, у вакуолях, мітохондріях, хлоропластах і ядрі (Minosha et al., 2014).

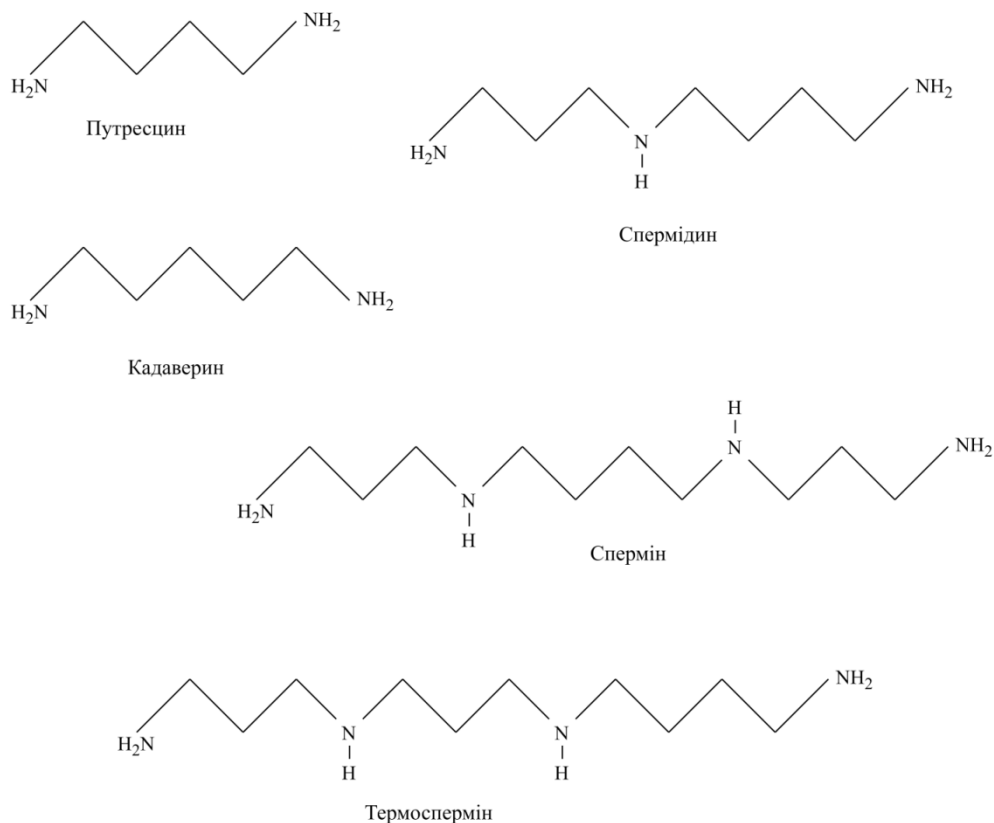


Рис. 1.1. Найважливіші ПА рослин.

Путресцин – центральний продукт класичного шляху біосинтезу ПА. Він є попередником для синтезу спермідину і сперміну (Xu et al., 2009). Нині виділяють три шляхи синтезу путресцину (рис. 1.2). Основний шлях пов'язаний з перетворенням аргініну на агматин під впливом аргініндекарбоксилази, подальшим утворенням з участю агматиніміногідролази N-карбамоїлпутресцину. Останній гідролізується за допомогою N-

карбамоілпутресцин-амідогідролази з вивільненням путресцину, NH_3 і CO_2 (Chen et al., 2019).

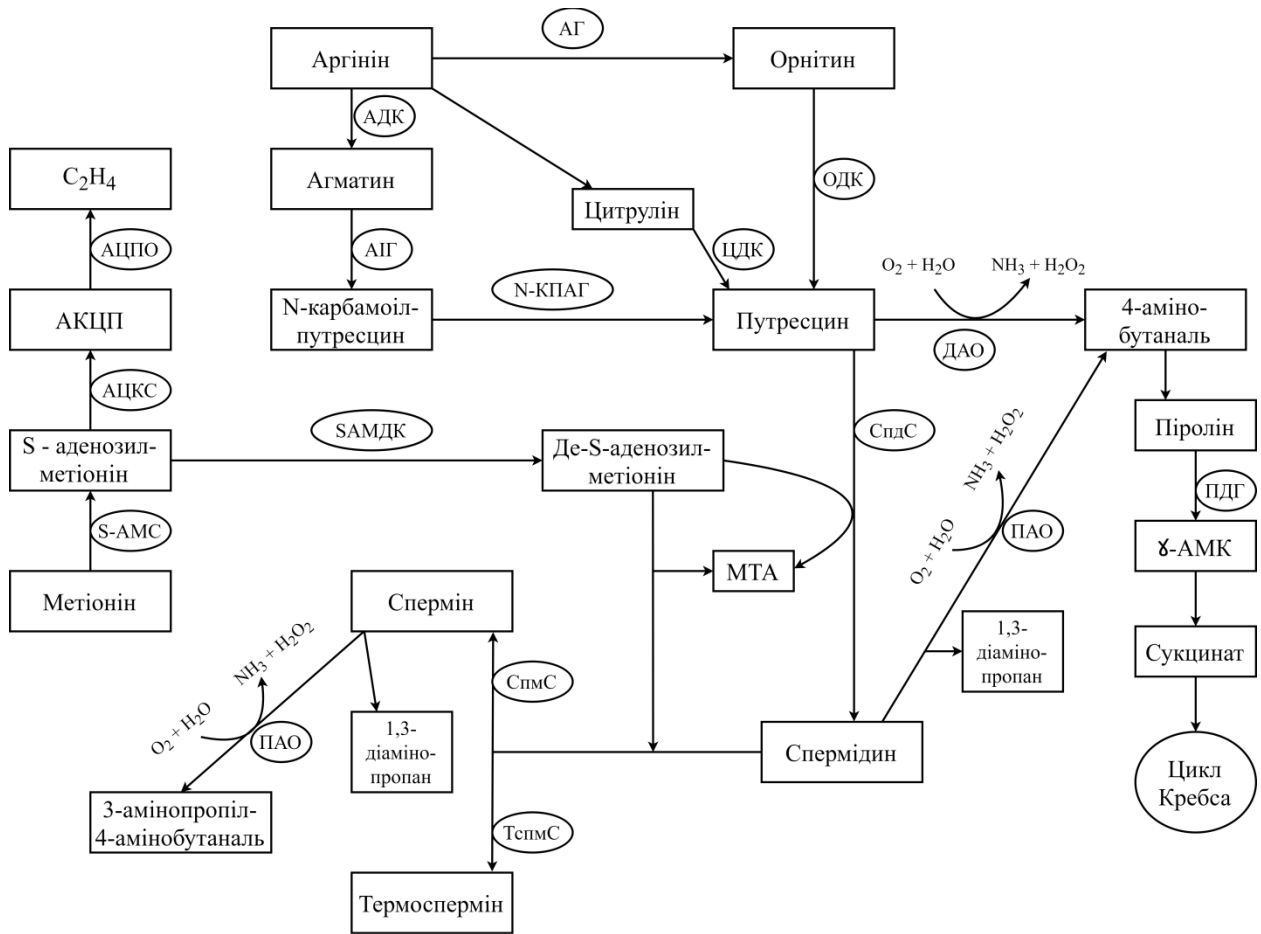


Рис. 1.2. Синтез і катаболізм ПА у рослин.

Скорочення. N-КПАГ – N-карбамоілпутресцин-амідогідролаза, S-АМС – S-аденозилметіонінсинтаза, SAMDK – S-аденозилметіоніндекарбоксілаза, АГ – аргіназа, АДК – аргініндекарбоксілаза, АІГ – агматиніміногідролаза; АЦКС – аміноциклопропанкарбоксілатсинтаза, АЦПО – аміноциклопропаноксидаза, Де-S-аденозилметіонін – декарбоксільований S-аденозилметіонін, МТА – 5'-метилтіоаденозил, ОДК – орнітиндекарбоксілаза, ПДГ – піроліндегідрогеназа, СпдС – спермідинсинтаза, СпмсС – спермінсинтаза, ТспмсС – термосперамінсинтаза, ЦДК – цитруліндекарбоксілаза, γ-АМК – γ-аміномасляна кислота.

У другому шляху з аргініну синтезується орнітин за допомогою аргінази, далі орнітиндекарбоксилаза видаляє карбоксильну групу у орнітину з утворенням путресцину і CO_2 (Pegg, 2016).

У третьому шляху аргінін спочатку перетворюється на цитрулін, який потім декарбоксилюється цитруліндекарбоксилазою, утворюючи путресцин (De Oliveira et al., 2018). Цей шлях вважається мінорним і характерним лише для певних видів рослин, наприклад, кунжуту (Chen et al., 2019).

Також існує каскад реакцій, що дозволяє рослинам синтезувати поліаміни в результаті перетворень метіоніну (рис. 1.2). Спершу під впливом S-аденозилметіонінсинтази з метіоніну утворюється S-аденозилметіонін. Ця сполука під впливом аміноциклопропанкарбоксилатсинтази може перетворюватися на амінокарбоксициклопропан, з якого за дії аміноциклопропаноксидази утворюється етилен. Продукти декарбоксилювання S-аденозилметіоніну, яке здійснюється S-аденозилметіоніндекарбоксилазою, використовуються для синтезу спермідину (Gupta et al., 2013). У свою чергу спермідин використовується для синтезу сперміну і термосперміну. Вказані реакції синтезу ПА каталізуються спермідинсинтазою, спермінсинтазою і тероспермінсинтазою, відповідно (Wen, Moriguchi, 2015) (рис. 1.2).

Кадаверин утворюється з лізину незалежним від інших ПА шляхом піридоксальфосфат-залежного декарбоксилювання, що каталізується лізиндекарбоксилазою (Tomar et al., 2013). Цей процес відбувається в стромі хлоропластів (Minosha et al., 2014).

Катаболізм ПА у рослин в основному залежить від дії аміноксидаз – мідєвмісної діаміноксидози (ДАО) та флавіновмісної поліаміноксидози (ПАО). При перетворенні путресцину ДАО утворюються 4-амінобутаналь і виділяються аміак та пероксид водню. Потім 4-амінобутаналь циклізується з утворенням піроліну, який перетворюється на γ -аміномасляну кислоту під дією піроліндегідрогенази. Варто відзначити, що γ -аміномасляна кислота вирізняється високою фізіологічною активністю і нині поряд з поліамінами вивчається як важливий метаболіт зі стрес-протекторною дією (Li et al., 2020).

Потім γ -аміномасляна кислота перетворюється на сукцинат, який входить у цикл Кребса.

Окиснення спермідину і сперміну відбувається за допомогою ПАО з утворенням 4-амінобутаналу, 3-амінопропіл-4-амінобутаналу, 1,3-діамінопропану, NH_3 і H_2O_2 (Chen et al., 2019). Таким чином, при деградації усіх ПА утворюється пероксид водню, який залучається в клітинні сигнальні процеси (див. нижче), а у разі надмірно інтенсивного катаболізму ПА може бути причиною окиснювальних пошкоджень клітин (Yu et al., 2019). Вважається, що за помірною стресовою навантаженню посилення катаболізму ПА і пов'язане з ним накопичення пероксиду водню індукує антиоксидантну систему, у той час як за надмірної дії стресорів утворення АФК при деградації ПА може призводити до окиснювального вибуху і клітинної загибелі (Yu et al., 2019).

1.2.3. Залучення поліамінів у процеси клітинного сигналіngu.

1.2.3.1. Поліаміни і утворення АФК. Терміном «АФК» визначають сукупність взаємно перетворюваних реакційноздатних форм кисню, більшість з яких існує короткий час. Серед них виділяють вільнорадикальні частки – супероксидний аніон-радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$), гідроксильний радикал ($\cdot\text{OH}$), пероксидні радикали (RO_2^{\cdot} та ін.) і нейтральні молекули – пероксид водню (H_2O_2), синглетний кисень ($^1\text{O}_2$) та ін. (Gill, Tuteja, 2010). Останнім часом сформувалися уявлення про те, що при підвищенні вмісту АФК відбувається зміна активності практично всіх відомих класів ефекторних білків сигнальних систем. Функції цих білків реалізуються як шляхом зміни їх редокс-стану при безпосередньому контакті з АФК, так і шляхом редокс-регуляції їх фосфорилування/дефосфорилування та за рахунок зміни вмісту інших сигнальних посередників (кальцію, монооксиду азоту, сірководню), що також може бути пов'язане зі зміною вмісту АФК в клітинних компартментах (Pradedova et al., 2017; Kolupaev et al., 2019b). Вважається, що серед усіх АФК

найбільший потенціал для участі в клітинному сигналінгу мають молекули пероксиду водню, що відрізняються стабільністю і відносно тривалим періодом життя (Gautam et al., 2017). Молекули H_2O_2 мають здатність поширюватися в клітинах на значні відстані. Це пов'язано з їх відносно невисокою реакційною здатністю і проникненням через мембрани завдяки відсутності заряду. Крім того, отримані докази можливості полегшеної дифузії H_2O_2 за допомогою аквапоринів (Bienert et al., 2007; Miller et al., 2010).

Утворення АФК в рослинних клітинах відбувається як стохастично, так і з участю відповідних ферментних систем. Ключовими ферментами, що генерують АФК, вважаються локалізовані в плазматичній мембрані НАДФН-оксидаза, окремі форми пероксидази, оксалатоксидаза, а також ферменти катаболізму поліамінів (Kohli et al., 2017; Yu et al., 2019).

ДАО і ПАО є одними з потужних джерел утворення АФК в апопласті (Sharova, Medvedev, 2017; Kolupaev et al., 2019b). Ці ферменти окиснюють ПА за вторинними аміногрупами з одночасним утворенням H_2O_2 . АФК, утворювані цими ферментами з ді- і поліамінів, можуть розглядатися як ключові сигнальні молекули, задіяні в реалізації фізіологічних ефектів ПА.

Більшість Cu-AO локалізовані в клітинних стінках або пероксисомах (Fraudentali et al., 2021). Cu-AO (КФ 1.4.3.6) окиснюють переважно діаміни путресцин і кадаверин, у той же час окиснення ними спермідину і особливо сперміну менш ефективно (Fraudentali et al., 2021). Три- і тетрааміни окиснюються переважно флавіновмісною ПАО (КФ 1.5.3.11).

Отже, більшість робіт, присвячених функціям амінооксидаз клітинних стінок, апелює до їх здатності продукувати пероксид водню (Sharova, Medvedev, 2017). Показана участь амінооксидаз в процесах, однозначно пов'язаних з утворенням АФК, – реакціях окиснювального вибуху, лігніфікації і суберинізації клітинних стінок, прояві фенотипової пластичності ксилеми (Angelini et al., 2010; Fraudentali et al., 2021).

Збільшення активності ДАО і ПАО під впливом ПА є, ймовірно, ключовим механізмом посилення генерації АФК рослинними клітинами в їх

присутності. Проте, напевно, підвищення вмісту АФК за дії ПА може відбуватися і за рахунок інших механізмів. Так, у рослин арабідопсису зафіксовано підвищення активності НАДФН-оксидази під впливом екзогенного спермідину (Andronis et al., 2014).

На участь як ДАО, так і НАДФН-оксидази в утворенні пероксиду водню за дії путресцину вказують результати, отримані на рослинах сої (Todorova et al., 2013). Автори вважають, що ДАО разом з НАДФН-оксидазою забезпечують спричинюваний екзогенними поліамінами ефект суберинізації клітинних стінок.

1.2.3.2. Залучення поліамінів у процесі утворення оксиду азоту. Поряд з АФК важливі сигнальні функції в клітинах виконують активні форми азоту, основною з яких є монооксид азоту (NO). Це газоподібна молекула-радикал, що належить до газотрансмітерів і бере участь у контролі багатьох функцій рослинного організму, у тому числі в трансдукції гормональних сигналів, регуляції клітинного циклу, процесах проростання насіння, деетіоляції, ризогенезу і адаптації до стресових чинників різної природи (Krasulyenko et al., 2010; Yemets et al., 2015; 2019; Kolupaev et al., 2019a).

Синтез оксиду азоту у рослин відбувається за відновним або за окиснювальним шляхами (Corpas, Barroso, 2017). У першому шляху як субстрати використовуються нітрату або нітрит. Відповідні реакції проходять за участю нітратредуктази, мембранозв'язаної нітрит-NO-редуктазою і, ймовірно, ксантиноксидоредуктази (Gupta, Kaiser, 2010; Farnese et al., 2016).

Питання про механізм синтезу NO окиснювальним шляхом з L-аргініну у рослинних організмів залишається дискусійним, адже гомологи NO-синтази (NOS) тварин знайдені лише у зелених водоростей і не виявлені у вищих рослин (Li, Lancaster, 2013; Kolbert et al., 2019). Проте припускають, що у вищих рослин в пероксисомах можуть бути білки, не ідентичні NOS, але спроможні каталізувати утворення NO з L-аргініну як субстрату (Corpas, Barroso, 2017; Gupta et al., 2020).

Нарешті, вважається можливим утворення оксиду азоту при окисненні поліамінів, ймовірно, із залученням у процес Cu-діаміноксидази (Cu-ДАО) (Wimalasekera et al., 2011a) або ФАД-зв'язуючих ПАО (Wimalasekera et al., 2011b). Так, в коренях рослин арабідопсису, нокаутних за Cu-аміноксидазою 1, у відповідь на обробку путресцином, утворювалася менша кількість NO, ніж у рослин дикого типу (Wimalasekera et al., 2011a). Водночас механізм утворення NO в клітинах рослин під впливом ДАО залишається невідомим (Pal et al., 2015). Припускають, що Cu-ДАО безпосередньо не генерує NO, але може впливати на вміст NO опосередковано, через утворення пероксиду водню (Fraudentali et al., 2021). Деякі автори вважають, що пероксид водню бере участь у вивільненні оксиду азоту, індукованому поліамінами, як джерело кисню (Yang et al., 2014), хоча прямих експериментальних підтверджень такої гіпотези поки що немає.

Стосовно зав'язків між АФК і оксидом азоту за дії на рослини тетраамінів є дані, що вказують на більш раннє накопичення пероксиду водню. Так, у роботі Diao і співавт. (2017) показано, що накопичення пероксиду водню у томатів, спричинюване дією сперміну і спермідину, не усувалося скавенджером оксиду азоту 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (РТІО) та інгібіторами синтезу NO. З іншого боку, підвищення вмісту NO у цьому об'єкті частково нівелювалося скавенджером пероксиду водню диметилтіосечовиною (ДМТС) та інгібітором НАДФН-оксидази дифеніленіодоніумом. У зв'язку з цим автори вважають, що пероксид водню як посередник в сигнальному шляху, індукованому ПА, розташований вище від NO.

При дослідженні утворення NO у рослин арабідопсису, нокаутних за певними формами ДАО (*сuao8-1* і *сuao8-2*), було встановлено пригнічення його синтезу, у той час як синтез пероксиду водню з участю ДАО у цих рослин не порушувався (Groß et al., 2017). На думку авторів, такий ефект даної мутації може бути зумовлений її впливом на активність аргінази. Її зростання призводить до зменшення вмісту аргініну і зниження утворення оксиду азоту

шляхом, залежним від L-аргініну. Таким чином, питання про причетність ДАО і ПАО до синтезу NO дотепер залишається відкритим.

Водночас, ймовірно, що поліаміни можуть модулювати синтез NO у рослин і з участю нітратредуктази. Так, у роботі Rosales et al. (2012) показано, що екзогенні путресцин, спермін і спермідин можуть модифікувати вміст оксиду азоту у листках пшениці за рахунок складної і змінної у часі модуляції активності нітратредуктази. Протягом перших 3–6 год впливу екзогенних ПА у листках відзначалося зниження активності нітратредуктази, водночас через 21 год інкубації активність ферменту зростала. Припускають, що інгібування нітратредуктази може бути зумовлене тим, що ПА сприяють взаємодії нітратредуктази з білком 14-3-3, що інгібує цей фермент (Shen, Huber, 2006). Водночас при тривалих експозиціях кількість NO, утворюваного з ПА, зменшується до величин, що спричиняють зворотний ефект – активують нітратредуктазу.

Ще однією особливістю сигнальних процесів з участю оксиду азоту є складність функціональної взаємодії NO з АФК. Ці сигнальні молекули можуть не лише підсилювати, а й послаблювати дію одне одного (Dubovskaya et al., 2007; Yun et al., 2011). Можливість одночасного утворення цих двох посередників при деградації ПА додатково ускладнює пояснення їх впливу на процеси АФК і NO-сигналінгу.

1.2.3.3. Роль кальцію у реалізації сигнальних ефектів поліамінів. Іони Ca^{2+} мають унікальні властивості та універсальну здатність у проведенні різних сигналів, які чинять на клітину первинний вплив – гормонів, інших сигнальних посередників, світла, гравітації, стресорів (Medvedev, 2018). У літературі є нечисленні і досить неоднозначні відомості про вплив поліамінів на кальцієвий гомеостаз рослинних клітин. Так, показано, що вони можуть активувати Ca^{2+} -насоси плазмалеми і тим самим посилювати вихід кальцію з цитозолу в позаклітинний простір (Pottosin et al., 2014a). З іншого боку, як зазначалося вище, у присутності поліамінів відбувається посилення генерації АФК рослинними клітинами, насамперед за рахунок активації ДАО і ПАО. При

цьому пероксид водню як продукт окиснення ПА і гідроксильний радикал, що утворюється в результаті неферментативних реакцій, можуть сприяти відкриванню неселективних кальцієвих каналів і надходженню кальцію в цитозоль (Pottosin et al., 2014b).

Відкриванню кальцієвих каналів плазматичної мембрани під впливом ПА може сприяти і дія стресових чинників. Наприклад, показано, що сольовий стрес призводить до виходу ПА в клітинні стінки, що за рахунок активації апопластних ДАО і ПАО призводить до швидкого підвищення вмісту АФК. Це активує надходження Ca^{2+} через плазматичну мембрану та збільшує його вміст в цитозолі (Singh et al., 2018). Показано, що посилення утворення АФК за дії ПА є достатнім стимулом для відкривання активованих гіперполяризацією кальцієвих каналів і, як наслідок, поліпшення в клітинах K^+/Na^+ -гомеостазу та запобігання втрати калію органами рослин за дії сольового стресу (Shi, Chan, 2014). Запропонована модель впливу ПА на кальцієвий гомеостаз, що включає в себе процеси катаболізму ПА, утворення і знешкодження АФК та вплив останніх на неселективні катіонні канали, а також кальцієві канали, що регулюються гідроксильним радикалом (Pottosin et al., 2012).

Відомо, що іони кальцію перебувають у тісній функціональній взаємодії не лише з АФК, а й NO. Оксид азоту може впливати на стан кальцієвих каналів, а іони кальцію можуть активувати ферменти, причетні до генерації NO, зокрема, NO-синтазу і ДАО (Courtois et al., 2008; Piterková et al., 2012). Проте зв'язки між вказаними посередниками в контексті фізіологічних ефектів ПА досліджені ще дуже слабо.

1.2.4. Участь поліамінів у клітинних механізмах стійкості рослин.

1.2.4.1. Поліаміни і антиоксидантний захист клітин. Одним із наслідків впливу на рослини стресових чинників найрізноманітнішої природи є так званий вторинний окиснювальний стрес. Його причинами можуть бути порушення транспорту електронів в електрон-транспортних ланцюгах

хлоропластів і мітохондрій (Asgher et al., 2017), інактивація антиоксидантних ферментів (Gill, Tuteja, 2010), посилення утворення АФК в неферментативних реакціях з прямою участю іонів Cu, Fe, а також інших металів зі змінною валентністю (Asgher et al., 2017; Kohli et al., 2017). Зважаючи на це, серед клітинних стрес-протекторних систем найбільш універсальною вважається антиоксидантна, її індукування екзогенними впливами, зокрема, дією фізіологічно активних сполук, зазвичай спричиняє розвиток стійкості рослин до стресорів (Kolupaev et al., 2019b).

ПА задіяні в антиоксидантному захисті клітин щонайменше кількома різними шляхами. Однією зі складових прямого захисного впливу поліамінів в стресових умовах є зв'язування ними радикальних АФК. Найбільш активними скавенджерами кисневих радикалів вважаються спермідин і спермін (Wimalasekera et al., 2011b). Антиоксидантні властивості поліамінів можуть бути зумовлені можливістю кисень-залежного авто- і ферментативного (за допомогою ди- і поліаміноксидаз) окиснення аміногруп (Kuznetsov, Shevyakova, 2011).

Іншим механізмом антиоксидантного захисту клітин, зумовленим дією ПА, може бути інгібування НАДФН-оксидази (Ghosh et al., 2012). Так, показано, що обробка рослин огірка екзогенним спермідином усувала зростання активності НАДФН-оксидази і вмісту пероксиду водню, спричинювані дією гіпотермії (Shen et al., 2000). При цьому за обробки рослин інгібітором синтезу ПА метилглюксаль-біс-гуанілгідрозоном посилювалися ефекти холодоіндукованого підвищення активності НАДФН-оксидази та окиснювальні пошкодження листків. Водночас за оптимальної температури росту рослин спермідин істотно не впливав на активність цього ферменту. Автори припускають, що зменшення активності НАДФН-оксидази під впливом спермідину за дії низьких температур може бути пов'язане зі стабілізацією ним мембранних структур. Проте, можливо, що ПА здатні впливати на експресію генів, які кодують молекулярні форми НАДФН-оксидази. У трансформантів тютюну з посиленою експресією гена S-аденозилметіоніндекарбоксилази і

підвищеним вмістом спермідину відзначалася нижча порівняно з рослинами дикого типу експресія генів *RbohD* і *RbohF*, що кодують дві основні ізоформи ферменту (Seo et al., 2019). За рахунок цього трансформанти генерували меншу кількість супероксидного радикала і пероксиду водню при сольовому стресі.

На окремих об'єктах показано здатність путресцину пригнічувати НАДФН-оксидазу в умовах *in vitro* (Pang et al., 2007; Ghosh et al., 2012). При цьому варто зауважити, що в системі *in vivo* вплив ПА на ті чи інші ферментні системи може бути досить складним і пов'язаним як з перетворенням одних ПА на інші, так і з утворенням з ПА інших сигнальних посередників (Pal et al., 2015).

Ще один шлях участі ПА в регуляції редокс-гомеостазу пов'язаний з їх впливом на активність антиоксидантних ферментів. Такі ефекти, насамперед за дії на рослини екзогенних ПА, на феноменологічному рівні досліджуються вже досить довго. Так, обробка рослин нуту путресцином, сперміном та спермідином спричиняла підвищення активності СОД і каталази при холодному стресі (Nayyar, Chander, 2004). У рослин кукурудзи після обробки путресцином підвищувалася активність СОД і пероксидази, у тому числі на фоні теплового стресу (Yadav et al., 2017).

Обприскування рослин рису спермідином зумовлювало підвищення активності СОД, каталази, глутатіон-S-трансферази та аскорбатпероксидази після впливу теплового стресу (Mostofa et al., 2014). Схожі ефекти зростання активності СОД і каталази під впливом спермідину відзначалися в колоссях рису (Zhou et al., 2020). Повідомляється також про підвищення активності СОД і пероксидази у японського рису при теплому стресі за обробки рослин спермідином після цвітіння (Tang et al., 2018). Обробка спермідином і сперміном зменшувала теплові пошкодження рослин пшениці у період наливу зерна, спричиняючи зростання у зернівках активності СОД, пероксидази і каталази (Jing et al., 2020). Екзогенний спермідин також підвищував активність СОД, каталази і аскорбатпероксидази та знижував прояви окиснювального стресу у рослин конюшини при гіпертермії (Luo et al., 2020).

На деяких об'єктах досліджено вплив ПА на експресію генів антиоксидантних ферментів. Так, під впливом кадаверину виявлено посилення експресії гена цитозольної Cu-SOD у кристалевої травички (Aronova et al., 2005). У рослин тютюну, трансформованих геном одного з ферментів синтезу ПА (S-аденозилметіоніндекарбоксілази), відзначалося посилення експресії генів Mn-SOD, аскорбатпероксидази, каталази і глутатіон-S-трансферази (Wi et al., 2006; Seo et al., 2019). Ці факти вказують на залучення ПА в регуляцію експресії генів ферментів антиоксидантної системи.

У ряді досліджень, виконаних на різних об'єктах, повідомляється про підвищення під впливом ПА вмісту у рослинах низькомолекулярних мультифункціональних сполук, у тому числі з антиоксидантними властивостями. У рослин нуту обробка сперміном, спермідином і путресцином спричинювала підвищення вмісту аскорбату і відновленого глутатіону (Naugar, Chander, 2004). Вміст цих антиоксидантів підвищувався і у рослин рису за дії спермідину (Mostofa et al., 2014). Водночас механізми впливу ПА на вміст низькомолекулярних антиоксидантів залишаються малодослідженими.

Поряд зі згаданими вище «класичними» антиоксидантами помітний внесок у захист від ушкоджуючої дії АФК можуть робити і сполуки, для яких антиоксидантна функція не є основною, зокрема, пролін. Його структурні особливості дають підстави розглядати можливість прямої інактивації радикальних форм кисню. Відомо, що пролін здатний утворювати стійкий радикал, оскільки містить третинний вуглецевий атом. Це призводить до «гасіння» або обриву каскаду вільнорадикальних реакцій, що запускаються супероксид-радикалом, пероксид-радикалом або гідроксил-радикалом (Liang et al., 2013).

Є відомості про активацію синтезу проліну у рослин екзогенними ПА. У рослин пшениці за обробки путресцином посилювалися експресія гена Δ^1 пірролін-5карбоксілатсинтази і зростав вміст проліну (Ebeed et al., 2017; Pal et al., 2018). Накопичення проліну у зернівках пшениці під час їх наливу в умовах дії надмірно високих температур посилювалося під впливом

екзогенного спермідину (Jing et al., 2020). У вигни (*Vigna unguiculata* L.) спермін підсилював ефект накопичення проліну, спричинюваний дією хлориду кадмію (Nahar et al., 2016b). Водночас у проростків ріпаку під впливом сперміну відзначалося пригнічення накопичення проліну, індукованого осмотичним стресом (Larher et al., 1998).

1.2.4.2. Синтез стресових білків вважається однією з важливих стратегій адаптації організмів до несприятливих умов існування. Одна з ключових функцій цих білків шаперонна, пов'язана із запобіганням агрегації частково денатурованих молекул інших білків, полегшенням протеолітичної деградації необоротно пошкоджених білкових молекул, транспортом білків до лізосом і протеосом. Такі функції, зокрема, виконують HSP70, представлені різними підродинами (Wang et al., 2004). При появі в клітинах великої кількості денатурованих білкових молекул за стресових умов чинників шаперони HSP70 зв'язують їх короткі гідрофобні ділянки, тим самим запобігаючи агрегації, та сприяють рефолдингу разом з іншими групами шаперонів (Mayer, Bukau, 2005; Kozeko, Kordyum, 2021).

Є відомості про посилення синтезу HSP70 та деяких інших стресових білків за дії екзогенних ПА. Так, у рослин білої конюшини обробка спермідином за умов теплового стресу посилювала експресію генів родини білків теплового шоку *HSP70*, *HSH 70-5* і *HSP70B* (Luo et al., 2020). У цілому ж, залучення ПА до регуляції синтезу стресових білків досліджено поки що фрагментарно.

1.2.4.3. Поліаміни у регуляції продихового апарату. Зміна стану продихів є важливою адаптивною реакцією рослин у відповідь на дію різних абіотичних і біотичних стресорів, зокрема, посухи (Acharya, Assmann, 2009; Sarwat, Tuteja, 2017), озону (Brosché et al., 2010), інфікування (Montillet et al., 2013). Закривання продихів відбувається за посередництва фітогормонів і сигнальних сполук.

Як уже зазначалося, зростання вмісту поліамінів у клітинах призводить до збільшення вмісту в них ключових сигнальних посередників (АФК, NO,

іонів кальцію), що причетні до регуляції стану продихів. Ймовірно, цим пояснюються зареєстровані феномени закривання продихів під впливом екзогенних ПА. Зокрема, на прикладі епідермісу *Vicia faba* показано, що спермін, спермідин, путресцин і кадаверин здатні спричинити закривання продихів, впливаючи на потенціал-залежні калієві канали і перешкоджаючи надходженню калію у замикаючі клітини (Liu et al., 2000). Також відомо, що путресцин може бути задіяний в індукованому АБК закриванні продихів (An et al., 2008). При цьому припускають, що цей діамін виступає ланкою, яка зумовлює залежне від активності діаміноксидази зростання вмісту пероксиду водню у замикаючих клітинах і наступне підвищення в них вмісту $[Ca^{2+}]$. На замикаючих клітинах епідермісу арабідопсису з використанням інгібіторного аналізу та молекулярно-генетичних методів показано значення утворення пероксиду водню та синтезу NO у реалізації продихових ефектів поліамінів (Agurla et al., 2018). У роботі Echevarria-Machado і співавт. (2002) встановлено, що спермін здатний підвищувати активність фосфоліпази C і вміст інозитол-1,4,5-фосфату у коренях рослин *Catharanthus roseus*. Як відомо, останній спричиняє відкривання внутрішньоклітинних кальцієвих каналів (Lescourieux et al., 2002).

До реалізації продихових ефектів ПА можуть бути причетні й інші компоненти клітинного сигналіngu, зокрема, продукти перетворень фосфоліпідів під впливом фосфоліпази D. На рослинах арабідопсису показано, що путресцин спричиняв закривання продихів у рослин дикого типу, але не у мутанта, дефектного за однією з форм фосфоліпази D – *plda1* (Qu et al., 2014). За даними авторів, фосфатидна кислота може бути компонентом сигнального шляху путресцину, який активує НАДФН-оксидазу – джерело АФК, необхідне для закривання продихів. На проростках кукурудзи встановлено підвищення активності фосфоліпази D за дії екзогенного путресцину (An et al., 2012). Також на цьому об'єкті виявлено, що обробка інгібітором утворення фосфатидної кислоти n-бутанолом спричиняла збільшення втрат води листками за умов зневоднення дією поліетиленгліколю. В цілому, є підстави вважати істотним

внесок поліамінів як джерел сигнальних сполук і речовин, здатних впливати на активність стартових ферментів сигнальних систем, в процеси регуляції стану проростків і водного обміну рослин. Однак можлива функціональна взаємодія спричинюваних ПА процесів з іншими сигнальними посередниками і фітогормонами, задіяними в контролі стану проростків, досліджена ще дуже фрагментарно.

Висновки до розділу 1

Протягом останніх двох десятиліть знання про роль ПА в адаптації рослин до дії стресорів істотно розширилися і змінилися. Якщо раніше ПА розглядали насамперед як стресові метаболіти, то нині їх вважають сполуками, що мають важливе значення для сигнальних і регуляторних процесів. При цьому частина регуляторних процесів пов'язана з безпосередньою дією самих ПА на макромолекули, а частина із залученням в сигнально-регуляторні процеси продуктів катаболізму ПА.

Однак уявлення про механізми прояву фізіологічної активності ПА сформувалися ще далеко не повністю. В першу чергу це стосується внеску ПА в функціонування сигнальної мережі. Якщо механізми утворення пероксиду водню з ПА з участю ДАО і ПАО досить добре відомі, то причини підвищення вмісту NO в клітинах в присутності ПА залишаються по суті не з'ясованими.

ПА здатні впливати і на гомеостаз універсального внутрішньоклітинного посередника – кальцію. Припускають, що ПА можуть взаємодіяти з білками іонних каналів. Водночас вплив ПА на надходження кальцію в цитозоль може бути і опосередкованим, наприклад, зумовленим утворенням АФК. З іншого боку, повідомляється про залежність активності ДАО і ПАО від кальцію. Таким чином, чітких уявлень послідовності розташування АФК, NO і кальцію у сигнальних ланцюгах, що активуються за участю ПА, поки що немає. Не виключно, що залежно від умов дії ПА та інших чинників вона може бути різною або одні й ті ж посередники можуть бути у різних місцях сигнальної

мережі. Спектр посередників, задіяних у реалізації ефектів ПА, постійно розширюється. Недавно було отримано дані, що вказують на роль газотрансмітера сірководню в індукуванні ПА стійкості рослин до УФ-В (Li et al., 2016). Однак навіть феноменологічних даних про участь сірководню в реалізації протекторних ефектів ПА з в літературі майже немає.

ПА чинять складний вплив на редокс-гомеостаз, пов'язаний одночасно з утворенням і знешкодженням АФК. Як зазначалося, процеси утворення АФК зумовлені насамперед активацією під впливом ПА ферментів ДАО і ПАО. Не виключений також і вплив ПА на активність інших ферментів, що генерують АФК. Антиоксидантні ефекти ПА можуть бути прямими, зумовленими зв'язуванням ними вільних радикалів, а також опосередкованими. Непрямі шляхи залучення ПА в антиоксидантні механізми різноманітні. Вони можуть бути пов'язані з індукуванням експресії генів ферментів антиоксидантної системи за рахунок появи під дією ПА відповідних сигнальних посередників, насамперед пероксиду водню, а також з прямим впливом ПА на експресію генів антиоксидантних ферментів (Aronova et al., 2005; Seo et al., 2019).

Стрес-протекторні ефекти ПА не обмежуються їх впливом на про-/антиоксидантну рівновагу. Останніми роками виявлені феномени впливу ПА на експресію генів і накопичення стресових білків, зокрема, шаперонів родини HSP70 та дегідринів. Водночас механізми цих ефектів досліджені недостатньо.

Окремий інтерес становить питання залучення ПА в регуляцію стану продигового апарату рослин. Отримано експериментальні дані, що свідчать про роль АФК та оксиду азоту в реалізації впливу ПА на стан продохів (Agurla et al., 2018). Крім того, ПА можуть залучатися в реалізацію впливу АБК на стан продохів (An et al., 2008). При цьому однак відкритим залишається питання про взаємодію ефектів ПА з ефектами інших сигнальних молекул та іонів, що залучаються в процеси регуляції продигового апарату.

У зв'язку з викладеним, дисертаційне дослідження було спрямоване на з'ясування функціональної взаємодії ключових сигнальних посередників (АФК, NO, іонів кальцію) за впливу на рослини екзогенних ПА і встановлення ролі

такої взаємодії для індукування поліамінами стрес-протекторних систем, насамперед антиоксидантної. Також передбачалося встановлення можливої участі сірководню в процесах індукування антиоксидантної системи і теплостійкості рослин дією путресцину.

Крім того, до завдань роботи входило комплексне дослідження впливу ПА на стійкість рослин до зневоднення – встановлення дії ПА на накопичення сумісних осмолітів та виявлення ймовірної участі компонентів ліпідного сигналінгу в регуляції поліамінами стану продигового апарату.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛ, УМОВИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріал для досліджень, його характеристика та дизайн експериментів

Для досліджень використовували рослини пшениці озимої м'якої (*Triticum aestivum* L.) сорту Досконала та рослини гороху (*Pisum sativum* L.) сорту Царевич. Насіння було люб'язно надано співробітниками Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України (оригіатор сортів).

Сорт сильної озимої пшениці Досконала, лісостепоного екотипу, має високу зимостійкість (<https://yuriev.com.ua/ua/katalog-produkcii/katalog/pshenicya-ozima/doskonala/>) але відносно не високу посухостійкість (Карпеци др., 2016). Сорт гороху Царевич напівкарликовий, призначений для вирощування у Лісостеповій зоні та Поліссі (<https://yuriev.com.ua/ua/katalog-produkcii/katalog/goroh/carevich/>).

В експериментах зі з'ясування ролі сигнальних посередників у реалізації стрес-протекторних ефектів поліамінів як модельний об'єкт використовували етіоловані проростки пшениці. Цей об'єкт зручний для оцінки екзогенного впливу досліджуваних сполук і стресових чинників (Kolupaev et al., 2013), насамперед, при вивченні ефектів, пов'язаних з редокс-регуляцією, оскільки відсутність фотосинтезу зменшує ймовірність стохастичного утворення АФК.

Водночас загальновідомо, що етіоловані проростки не можуть повною мірою відобразити реакцію цілих дорослих рослин на стресові чинники, зокрема, на ґрунтову посуху. Зважаючи на це, в серії експериментів з дослідження впливу екзогенних поліамінів на посухостійкість рослин пшениці використовували дорослі рослини пшениці, які вирощували в ґрунтовій культурі.

2.1.1. Дизайн експериментів з дослідження впливу поліамінів на теплостійкість проростків пшениці.

Зернівки пшениці знезаражували протягом 40 хв в 6% розчині пероксиду водню і пророщували в чашках Петрі за температури 22°C на очищеній водопровідній воді. Очищення води здійснювали з використанням системи водопідготовки, що складається фільтра механічного очищення, вугільного фільтра і напівпроникної зворотноосмотичної мембрани з розміром комірок 1 нм. На третю добу пророщування насіння в середовище додавали досліджувані ПА (путресцин, кадаверин або спермін) в концентраціях діапазону 0,05-2,5 мМ і витримували проростки на цих розчинах протягом однієї доби.

Для з'ясування участі АФК в реалізації фізіологічних ефектів ПА в середовище інкубації проростків відповідних варіантів вносили антиоксидант диметилтіосечовину (ДМТС – 0,15 мМ) (Sung et al., 2009) або інгібітори діаміноксидази аміногуанідин (1 мМ) (Shevyakova et al., 2006) та НАДФН-оксидази імідазол (10 мкМ) (Hung et al., 2006), час інкубації проростків в середовищі з вказаними речовинами становив 26 год. При обробці спільно з ПА ці сполуки вносили в середовище інкубації за 2 год до додавання в нього відповідних ПА, інкубація в присутності яких становила 24 год.

При вивченні ймовірної участі оксиду азоту в прояві стрес-протекторної дії ПА у окремих варіантах досліду проростки протягом 26 год обробляли скавенджером NO РТІО (2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide, 2 мМ), інгібітором нітратредуктази вольфраматом натрію (2 мМ) (Karpets et al., 2020). У варіантах з вивчення комбінованої дії ПА і вказаних скавенджерів сигнальних посередників або інгібіторів їх синтезу ці агенти вносили в середовище інкубації проростків за 2 год до додавання в нього ПА. Концентрації цих сполук вибирали в попередніх дослідах.

У варіантах дослідів з вивчення ролі кальцію в реалізації фізіологічних ефектів ПА проростки протягом 26 год обробляли антагоністами кальцію – 500 мкМ ЕГТА (хелатор позаклітинного Ca^{2+}) або 200 мкМ неоміцином –

інгібітором залежного від фосфоліпази С надходження кальцію в цитозоль з внутрішньоклітинних компартментів (Karpets et al., 2016). У варіантах з вивчення комбінованої дії ПА і антагоністів кальцію останні вносили в середовище інкубації проростків за 2 год до додавання в нього ПА. Концентрації антагоністів Ca^{2+} , що істотно модифікують ефекти екзогенного ПА, але не спричиняють помітних токсичних ефектів, вибирали в попередніх дослідках.

У серії експериментів зі з'ясування функціональної взаємодії між путресцином і сірководнем на третю добу пророщування насіння в середовище додавали путресцин в концентрації 1 мМ або донор сірководню $NaHS$ (0,1 мМ) і витримували проростки на цих розчинах протягом однієї доби. В окремих варіантах дослідку проростки обробляли інгібітором L-цістеїндесульфгідрази піруватом калію (Li et al., 2015) в концентрації 0,3 мМ. Як було встановлено в попередніх дослідках, піруват в цій концентрації помітно пригнічував прояв стрес-протекторної дії путресцину на проростки, але не чинив видимої токсичної дії. Інкубація на середовищі з піруватом становила 26 год, в варіантах з комбінованою дією путресцину і пірувату останній додавали за 2 год до внесення в розчин путресцину.

В усіх перелічених експериментах контрольні зразки весь час інкубували на очищеній водопровідній воді.

Для визначення теплостійкості проростків їх після обробок розчинами досліджуваних сполук або їх комбінацій піддавали ушкоджуючому прогріву в водяному ультратермостаті за температури $45,5 \pm 0,1^\circ C$ протягом 10 хв. Після цього проростки всіх варіантів переносили на очищену водопровідну воду. Через 3 доби після впливу ушкоджуючого прогріву оцінювали відносну кількість життєздатних проростків (Kolupaev et al., 2013).

При експозиції проростків на розчинах досліджуваних речовин у коренях аналізували вміст H_2O_2 , NO , H_2S , а також активність діаміноксидази (ДАО), нітратредуктази і антиоксидантних ферментів – супероксиддисмутази (СОД), неспецифічної пероксидази і каталази. Після теплового стресу крім вказаних

показників визначали вихід з коренів сполук, що поглинають світло в УФ-В частині спектра, та кількість 2-тіобарбітурової кислоти (2-ТБК)-активних сполук – продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), це переважно малоновий діальдегід (МДА).

2.1.2. Дизайн експериментів з дослідження впливу поліамінів на стійкість етіольованих проростків пшениці до осмотичного стресу.

Експерименти проводили на етіольованих проростках озимої пшениці, вирощуваних у чашках Петрі. Зернівки контрольного варіанта пророщували на дистильованій воді. Осмотичний стрес створювали внесенням в чашки з проростаючим насінням непроникного осмотика ПЕГ 6000 до кінцевої концентрації 12% (Колупаєв и др., 2017). У варіантах з вивчення дії поліамінів путресцину і сперміну у відповідних концентраціях вносили в середовище пророщування насіння.

Через 4 доби пророщування насіння при 22°C вимірювали масу пагонів і коренів. Для аналізу біохімічних показників використовували пагони.

У пагонах проростків визначали активність СОД, каталази, неспецифічної пероксидази, (гваяколпероксидази) вміст проліну, сумарний вміст цукрів, кількість антоціанів та флавоноїдів, що поглинають в області УФ-В, а також вміст пероксиду водню.

2.1.3. Дизайн експериментів з вивчення впливу поліамінів на стійкість рослин пшениці до ґрунтової посухи.

Для досліджень використовували рослини пшениці, які вирощували в пластикових контейнерах (ґрунт чорнозем типовий важкосуглинистий). Вологість субстрату – 70% від повної вологості (ПВ), освітлення – 7 клк, фотоперіод – 15 год, температура 25/20°C (день/ніч). Перед створенням умов посухи рослини у віці 7 діб обприскували розчинами путресцину або сперміну

в концентраціях 0,25, 1 і 5 мМ, контроль – обприскування дистильованою водою.

Посуху створювали протягом чотирьох діб, починаючи з 8-го дня вирощування рослин, зменшенням норми поливу з поступовим зниженням вологості ґрунту до 25% від ПВ. У контролі вологість ґрунту підтримували на рівні 70% від ПВ. ПВ ґрунту визначали прискореним методом Кабаєва, в основі якого насичення наважки ґрунту водою до появи на її поверхні краплі води, що не зникає (Терпелец, Слюсарев, 2010).

Через 4 доби посухи у перших листках визначали вміст малонового діальдегіду, фотосинтетичних пігментів, антоціанів, флавоноїдів, що поглинають в області УФ-В, проліну і цукрів. Також оцінювали величину водного дефіциту і ростові показники перед початком посухи і наприкінці експерименту.

Інгібування росту, спричинюване посухою, розраховували за формулою:

$$I = \frac{(C_2 - C_1) - (E_2 - E_1)}{C_2 - C_1} \cdot 100\%$$

де I – інгібування росту (%); C_1 і C_2 , E_1 і E_2 – відповідно, початкові і кінцеві величини довжини надземної частини рослин у контрольних (з нормальним поливом) і дослідних (посуха) варіантах.

2.1.4. Дизайн і методика проведення експериментів з дослідження впливу поліамінів на стан продихів рослин гороху.

Для досліджень використовували 12–15-денні рослини гороху, які вирощували в кюветах з ґрунтом за оптимального поливу, температури 24/18°C (день/ніч), освітлення 6000 лк і фотоперіоду 15 год.

Апертуру продихів визначали за методикою, описаною Ramirez et al. (2009) з модифікаціями (Yastreba et al., 2017). Для досягнення ефекту відкривання продихів епідерміс з абаксіальної поверхні зрілих листків витримували протягом 2,5 год на холодному білому світлі (8000 лк) в чашках

Петрі з 10 мМ розчином КСl, приготованим на 10 мМ Тріс-НСl буфері без СО₂ (рН 6,15) (Iakovenko et al., 2008a). Після цього зразки епідермісу дослідних варіантів переносили на буферне середовище з додаванням путресцину або сперміну в кінцевих концентраціях від 0,25 до 5 мМ. Попередньо за допомогою розбавленого розчину НСl рН середовища інкубації епідермісу в усіх варіантах доводили до 6,15. Через 60, 120, 150 і 180 хв інкубації епідермісу вимірювали розмір апертури продохів, як описано раніше (Yastreb et al., 2017; 2018).

В експериментах з дослідження впливу антагоністів кальцію та інгібіторів фосфоліпаз на прояв ефектів поліамінів в середовище інкубації епідермісу листків за 1 год до обробки путресцином або сперміном додавали блокатор кальцієвих каналів хлорид лантану (LaCl₃) в концентрації 1 мМ, хелатор позаклітинного кальцію ЕГТА (1 мМ), інгібітор фосфатидилінозитол-специфічної фосфоліпази С (ФІ-ФЛ С) неоміцин (1 мМ), інгібітор залежного від фосфоліпази D утворення фосфатидної кислоти 0,1% н-бутанол або його неактивний ізомер бутанол-2 у такій же концентрації. Через 1 год після інкубації епідермісу в середовищі із зазначеними сполуками зразки відповідних варіантів переносили на середовище, що містило путресцин або спермін в кінцевій концентрації 1 мМ у поєднанні з досліджуваними інгібіторами. У присутності поліамінів епідерміс інкубували ще 150 хв. Концентрації антагоністів кальцію та інгібіторів фосфоліпаз, що максимально модифікували ефекти поліамінів, визначали на підставі даних, отриманих раніше (Iakovenko et al., 2008a; Yastreb et al., 2019) і спеціальних попередніх дослідів.

2.2. Визначення фізіологічних і біохімічних показників

2.2.1. Визначення водного дефіциту листків рослин пшениці.

Водний дефіцит оцінювали за насиченням відокремлених від рослин листків водою і виражали у відсотках від загального вмісту води у стані повного насичення (Гончарова, 2005).

2.2.2. Оцінка пошкоджень мембран коренів проростків пшениці після теплового стресу.

Ушкодження мембран клітин коренів визначали через 5 годин після прогріву проростків за виходом речовин, що поглинають в УФ-В частині спектра (в основному, вільні нуклеотиди) (Мелехов, Ефремова, 1990). Корені інтактних проростків опускали в стаканчики з дистильованою водою на 1 год, далі відокремлювали від проростків, обережно обсушували фільтрувальним папером і зважували. Світлопоглинання інкубаційного розчину вимірювали на спектрофотометрі при A_{252} і A_{264} . Вихід сполук виражали як відношення усередненої величини, яку вимірювали при A_{252} і A_{264} , до маси коренів.

2.2.3. Визначення вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ).

Для аналізу 2-ТБК-активних продуктів (переважно МДА) у рослинному матеріалі наважки гомогенізували в реакційному середовищі, що містило 0,25% 2-ТБК та 10% ТХО, гомогенат в пробірках, закритих ковпачками з фольги, нагівали на водяній бані за температури 95-100°C протягом 30 хв. Надалі проби різко охолоджували і центрифугували впродовж 15 хв при 10000 g. Світлопоглинання супернатанту визначали при A_{532} (максимум поглинання МДА) і A_{600} (поправка на неспецифічне поглинання) (Fazlieva et al., 2012). Вміст МДА, розрахований в нмоль/г сирової речовини, переводили у відсотки до величини, яка відзначалася для контрольних зразків без дії стресорів та інших досліджуваних чинників.

2.2.4. Визначення вмісту пероксиду водню.

Для аналізу кількості пероксиду водню досліджуваний рослинний матеріал розтирали на льоду в 5%-й ТХО. Гомогенат центрифугували 10 хв при 8000 g за температури не вище 4°C і в супернатанті визначали вміст H_2O_2

феротіоціанатним методом, використовуючи сіль Мора і тіоціанат амонію. Світлопоглинання продукту реакції визначали за довжини хвилі 480 нм (Sagisaka, 1976). Вміст пероксиду водню наводили в нмоль/г сирої речовини.

2.2.5. Визначення вмісту оксиду азоту.

Кількість оксиду азоту у коренях проростків пшениці аналізували за допомогою методу, описаного у роботі Zhou і співавт. (2005) з модифікаціями. В його основі перетворення ендогенного NO на нітрит, вміст якого визначається з використанням реактиву Грісса. Наважки рослинного матеріалу розтирали на льоду в 50 мМ ацетатному буфері (рН 3,6) з додаванням 2% ацетату цинку. Гомогенат центрифугували впродовж 15 хв при 8000 g та температурі не вище 4°C, далі до 10 мл супернатанту вносили 250 мг деревного вугілля. Після фільтрування до 2 мл фільтрату додавали з 1 мл 1%-го реактиву Грісса в 12%-й оцтовій кислоті. Через півгодини визначали світлопоглинання (A_{530}). Для приготування стандартних розчинів використовували NaNO_2 . Вміст оксиду азоту виражали у нмоль/г сирої речовини.

2.2.6. Визначення вмісту сірководню.

Вміст сірководню у коренях визначали за реакцією з 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою (ДТНБК) (Li et al., 2014b). Корені розтирали на льоду при повному зануренні у реакційну суміш, що містила 0,4 мМ ДТНБК, 0,15 М К,Na-фосфатний буфер (рН 7,0) і 10 мМ ЕДТА. Гомогенат центрифугували упродовж 15 хв за 2-4°C при 10000 g. Оптичну густину супернатанту визначали при 412 нм. Як стандарт використовували розчини гідросульфід натрію. Вміст H_2S наведено у мкмоль/г сирої речовини.

2.2.7. Визначення активності діаміноксидази (ДАО).

Активність ДАО (КФ 1.4.3.6) в коренях визначали за кількістю Δ^1 піроліну, що утворюється при окисненні путресцина, з використанням

нінгідринного методу (Naik et al., 1981) з деякими модифікаціями. Рослинний матеріал гомогенізували на льоду в 0,05 М К,Na-фосфатному буфері, рН 7,8. Гомогенат центрифугували протягом 15 хв при 10000 g за температури 2-4°C. В пробірку вносили 3,0 мл реакційної суміші, що містила 10 мкМ путресцин і 0,1 мкМ піридоксальфосфат, приготовані на 0,05 мМ фосфатному буфері (рН 7,8). Реакцію починали додаванням 0,5 мл супернатанту рослинного матеріалу, суміш інкубували у водяному термостаті при 37°C протягом 1 год. Реакцію зупиняли додаванням 0,5 мл 10% ТХО, після чого суміш знову центрифугували протягом 7 хв при 10000 g. У реакційні пробірки вносили по 1 мл супернатанту, додавали по 1 мл нінгідринного реактиву, що містив 250 мг нінгідрину і 37,6 мг гідриндантину, розчинених в 10 мл суміші з льодяної оцтової кислоти і 6 М о-фосфорної кислоти у співвідношенні 3:2. Після цього до суміші додавали по 1,5 мл льодяної оцтової кислоти, перемішували і кип'ятили на водяній бані протягом 30 хв для прояву забарвлення. Суміш потім охолоджували і вимірювали оптичну густину при 510 нм. Вимірювання проводили відносно контрольної проби з ідентичним набором реактивів і супернатантом, попередньо інактивованим 10-хвилинним нагріванням на киплячій водяній бані. Активність ферменту виражали в мкмоль Δ^1 піроліну/(г сирої речовини \times год).

2.2.8. Визначення активності нітратредуктази (НР).

Активність НР (КФ 1.7.1.1) аналізували методом *in vitro* за кількістю утворюваного нітриту (Галеева и др., 2012). Наважки розтирали на льоду в 0,05 М К,Na-фосфатному буфері (рН 7,8) гомогенат центрифугували при 4000 g за температури 2-4°C упродовж 15 хв. До 3 мл надосадової рідини додавали по 0,5 мл 0,1 М KNO_3 і 5 мМ НАДН. До контрольної проби замість НАДН вносили 0,5 мл дистильованої води. Реакцію проводили протягом 30 хв при 25°C, після чого зупиняли її, додаючи 0,5 мл льодяної CH_3COOH . Пробі центрифугували 10 хв при 8000 g для осадження білків. Далі до 3 мл надосадової рідини додавали

стільки ж мл 1%-го реактиву Грісса в 12% оцтовій кислоті. Через півгодини вимірювали світлопоглинання розчину на спектрофотометрі при довжині хвилі 527 нм. Активність ензиму наводиться в мкмоль нітриту/(г сирової речовини × год).

2.2.9. Визначення активності антиоксидантних ферментів.

Для аналізу активності антиоксидантних ферментів наважки рослинного матеріалу гомогенізували на льоду в 0,15 М К,Na-фосфатному буфері (рН 7,6), що містив ЕДТА (0,1 мМ) і дитіотрейтол (1 мМ) (Karpets et al., 2015). Для аналізу використовували супернатант після центрифугування гомогенату протягом 10 хв при 8000 g за температури до 4°C.

Активність цитозольних форм супероксиддисмутази (СОД, КФ 1.15.1.1) визначали при рН 7,6, використовуючи метод, в основі якого здатність ферменту конкурувати з нітросинім тетразолом за супероксидні аніони, які утворюються внаслідок аеробної взаємодії НАДН і феназінметосульфату; оптичну густина визначали при 540 нм.

Активність каталази (КФ 1.11.1.6) аналізували при рН 7,0 за кількістю пероксиду водню, що розклався за одиницю часу.

Активність неспецифічної пероксидази (КФ 1.11.1.7) визначали, використовуючи як донор водню гваякол, як субстрат – пероксид водню. Оптичну густина продукту окиснення гваяколу визначали при 470 нм.

Активність СОД виражали в умов. од./ (г сирової речовини · хв), каталази – в ммоль H_2O_2 / (г сирової речовини · хв), гваяколпероксидази – в ммоль гваяколу/(г сирової речовини · хв). В окремих експериментах (у разі зміни вмісту води в рослинному матеріалі в ході експерименту) активність розраховували на суху речовину, що вказано на рисунках або у підписках під рисунками.

2.2.10. Визначення вмісту проліну.

Вміст проліну визначали методом Bates і співавт. (1973) з модифікаціями. Наважки листків або коренів гомогенізували у дистильованій воді, після чого гомогенат одразу протягом 10 хв кип'ятили у водяній бані. Проби охолоджували, екстракт фільтрували і в однакових пропорціях додавали льодяну оцтову кислоту та нінгідриновий реактив. Проби, закриті ковпачками з фольги, нагрівали у киплячій водяній бані протягом 1 год. Оптичну густина визначали за довжини хвилі 520 нм. Як стандарт використовували *L*-пролін. Вміст проліну виражали в мкмоль/г сухої маси.

2.2.11. Визначення вмісту цукрів.

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

2.2.12. Визначення вмісту антоціанів і безбарвних флавоноїдів.

Для аналізу кількості флавоноїдів з максимумом поглинання в УФ-В і антоціанів наважки розтирали в 1% розчині HCl в метанолі (Nogues, Baker, 2000). Після центрифугування гомогенату при 8000g (15 хв) визначали світлопоглинання супернатанту при 300, 530 і 657 нм (Pietrini, Massacci, 1998; Nogues, Baker, 2000). Вміст флавоноїдів і антоціанів наведено в умовних

одиницях як величини $A_{300}/\text{г}$ сухої маси і $(A_{530} - 0,25 A_{657})/\text{г}$ сухої речовини, відповідно.

2.2.13. Визначення вмісту фотосинтетичних пігментів.

Хлорофіли і каротиноїди екстрагували з листків пшениці 96% етанолом, з додаванням невеликої кількості CaCO_3 . Проби центрифугували 15 хв при 7000 g. Вміст пігментів в супернатанті визначали спектрофотометричним методом за довжин хвиль 665, 649 і 440,5 нм (Шлык, 1971). Кількість виражали в мг/г сухої маси.

2.3. Повторення і статистична обробка результатів

У дослідах з оцінки виживаності та визначення ростових показників рослинних об'єктів у кожному повторенні було не менше 30 зразків. Кожен такий експеримент проводили у 4-разовому повторенні і відтворювали незалежно не менше трьох разів. При дослідженні продихового апарату у кожному варіанті оцінювали стан не менше 60 продихів на листках, взятих з шести різних рослин.

Біохімічні аналізи здійснювали у 4-5-разовому біологічному повторенні у 2-3 незалежних дослідах.

Статистичну обробку результатів здійснювали загальновідомими методами (Лакин, 1980). Для оцінки вірогідності відмінності між варіантами експериментів використовували t-критерій Ст'юдента для супряжених вибірок. Попередньо здійснювали перевірку нормальності розподілу даних вибірки. В окремих випадках вірогідність різниці між варіантами оцінювали, використовуючи додатково непараметричний критерій Уїлкоксона. У таблицях і на рисунках наведені середні величини для серій дослідів, проведених в ідентичних умовах, та їх квадратичні похибки. Крім випадків, відзначених окремо, обговорюються відмінності між варіантами, значимі при $P \leq 0,05$.

РОЗДІЛ 3. ІНДУКУВАННЯ ПОЛІАМІНАМИ СТІЙКОСТІ РОСЛИН ДО ГІПЕРТЕРМІЇ

3.1. Вплив путресцину, кадаверину і сперміну на теплостійкість проростків пшениці і стан їх антиоксидантної системи

Як уже зазначалося, у ряді досліджень зареєстровано підвищення ендogenous вмісту поліамінів у рослин у відповідь на дію стресорів різної природи: посухи, сольового стресу, гіпо- і гіпертермії, гіпоксії, опромінення УФ (Gill, Tuteja, 2010; Saha et al., 2015).

Екзогенне застосування поліамінів має виражений позитивний вплив на рослини при стресах, пов'язаних із зневодненням (Prabhavathi, Rajam, 2007; Gill, Tuteja, 2010). Наприклад, застосування сперміну і спермідину підвищувало солестійкість рослин рису, що значною мірою може бути пов'язане зі збільшенням активності антиоксидантних ферментів і посиленням синтезу низькомолекулярних протекторів (проліну, цукрів, антоціанів) (Roychoudhury et al., 2011).

Вплив поліамінів на стійкість рослин до інших стрес-факторів, зокрема до екстремальних температур, залишається менш дослідженим. Однак останніми роками проведені досить успішні дослідження впливу трансформації рослин генами, що кодують ферменти синтезу поліамінів, на їх стійкість до температурних стресів. Так, показана висока стійкість до спричинюваного гіпертермією окиснювального стресу рослин томату, трансформованих геном дріжджової S-аденозил-1-метіоніндекарбоксилази (Cheng et al., 2009). У цих трансформантів відзначалася підвищена активність СОД, аскорбатпероксидази, гваяколпероксидази і каталази. Підвищення теплостійкості рослин солодкої картоплі відбувалося при їх трансформації геном спермідинсинтази з *Cucurbita ficifolia* (Kasukabe et al., 2006). Насіння рослин баклажану, трансформованих

біосинтетичним геном аргініндекарбоксилази, краще проростало в умовах дії високих температур (Prabhavathi, Rajam, 2007).

За останні роки також отримані дані про підвищення теплостійкості рослин під впливом екзогенних поліамінів. Наприклад, обприскування рослин рису спермідином знижувало прояв їх окислювальних пошкоджень після прогріву за температури 42°C (Mostofa et al., 2014). При цьому у дослідних рослин в постстресовий період підвищувалася активність СОД, аскорбатпероксидази, каталази, глутатіон-S-трансферази. Виявлено посилення проростання насіння редису при 38°C в присутності 10 мкМ кадаверину (Cavusoglu, Kabar, 2007).

Проте відомості про вплив екзогенних поліамінів на теплостійкість рослин і їх здатність до підтримання стабільної про-/антиоксидантної рівноваги досить суперечливі. Так, показано, що екзогенний спермін викликав помітне підвищення виживаності рослин арабідопсису після теплового стресу, водночас ефект спермідину був менш помітним, а обробка путресцином взагалі не впливала на їх теплостійкість (Sagor et al., 2013). За відсутності дії стрес-факторів екзогенні поліаміни в помірних (мілімолярних) концентраціях пригнічували ріст рослин пшениці і викликали в них підвищення вмісту продуктів ПОЛ (Szalai et al., 2017). З іншого боку, є припущення, що позитивний вплив поліамінів на антиоксидантну систему пов'язаний з посиленням рослинами генерації АФК (Minocha et al., 2014).

Таким чином, дані про вплив різних поліамінів на стійкість рослин до екстремальних температур і зв'язку цього ефекту з індукуванням антиоксидантної системи залишаються неоднозначними. У зв'язку з цим одним із завдань роботи стало порівняння впливу екзогенних діамінів (путресцину і кадаверину) та тетрааміну сперміну на теплостійкість проростків пшениці і стан їх ферментативної антиоксидантної системи.

Всі досліджувані поліаміни спричиняли підвищення теплостійкості проростків пшениці (рис. 3А). Мінімальна концентрація путресцину, яка спричиняла вірогідне підвищення виживаності проростків, становила 0,25 мМ.

Найвищий захисний ефект всі ПА виявляли за концентрації 1 мМ. При цьому в цілому захисна дія сперміну була виражена більше, ніж ефекти путресцину і кадаверину. Водночас стрес-протекторна дія двох діамінів в діапазоні концентрацій 0,5-2,5 мМ майже не відрізнялася (рис. 3.1). Так чи інакше, всі досліджувані ПА спричиняли підвищення виживаності проростків пшениці після потенційно летального теплового стресу.

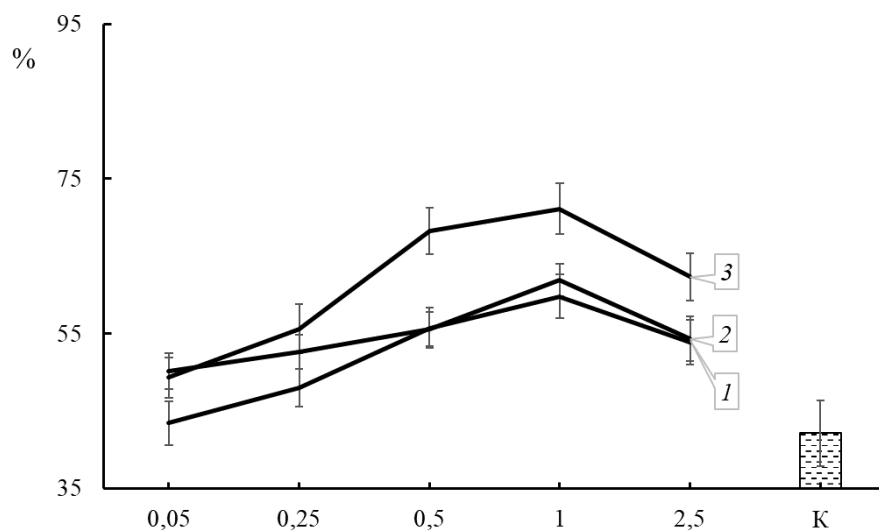


Рис 3.1. Вплив путресцину, кадаверину і сперміну на виживаність (%) проростків пшениці після ушкоджуючого прогріву (45°C, 10 хв). 1 – путресцин; 2 – кадаверин; 3 – спермін.

Однією з ключових стрес-протекторних систем, що забезпечують стійкість рослин до дії різних несприятливих чинників, у тому числі гіпертермії, є антиоксидантна система (Kolupaev et al., 2019). Як уже зазначалося, на різних об'єктах зареєстровано підвищення активності антиоксидантних ферментів під впливом ПА. Зважаючи на це, порівнювали вплив діаміну путресцину і тетрааміну сперміну на активність ключових антиоксидантних ферментів в пагонах проростків за оптимальних температурних умов і після теплового стресу.

Під впливом путресцину і сперміну відзначалося підвищення активності СОД в пагонах проростків (рис. 3.2, А). Після дії теплового стресу в варіантах з

обробкою поліамінами також спостерігалися вищі значення активності ферменту порівняно з контролем. Особливо помітними ці відмінності були через 24 год після прогріву, коли в проростках контрольного варіанта активність СОД знижувалася. При цьому активність СОД у варіанті з обробкою проростків сперміном істотно перевищувала таку у варіанті з путресцином (рис. 3.2, А).

При обробці проростків поліамінами підвищувалася і активність каталази (рис. 3.2, Б). Відмінності між контролем і варіантами з обробкою проростків путресцином і сперміном спостерігалися і після дії теплового стресу. При цьому вищі величини активності ферменту відзначалися у варіанті з сперміном.

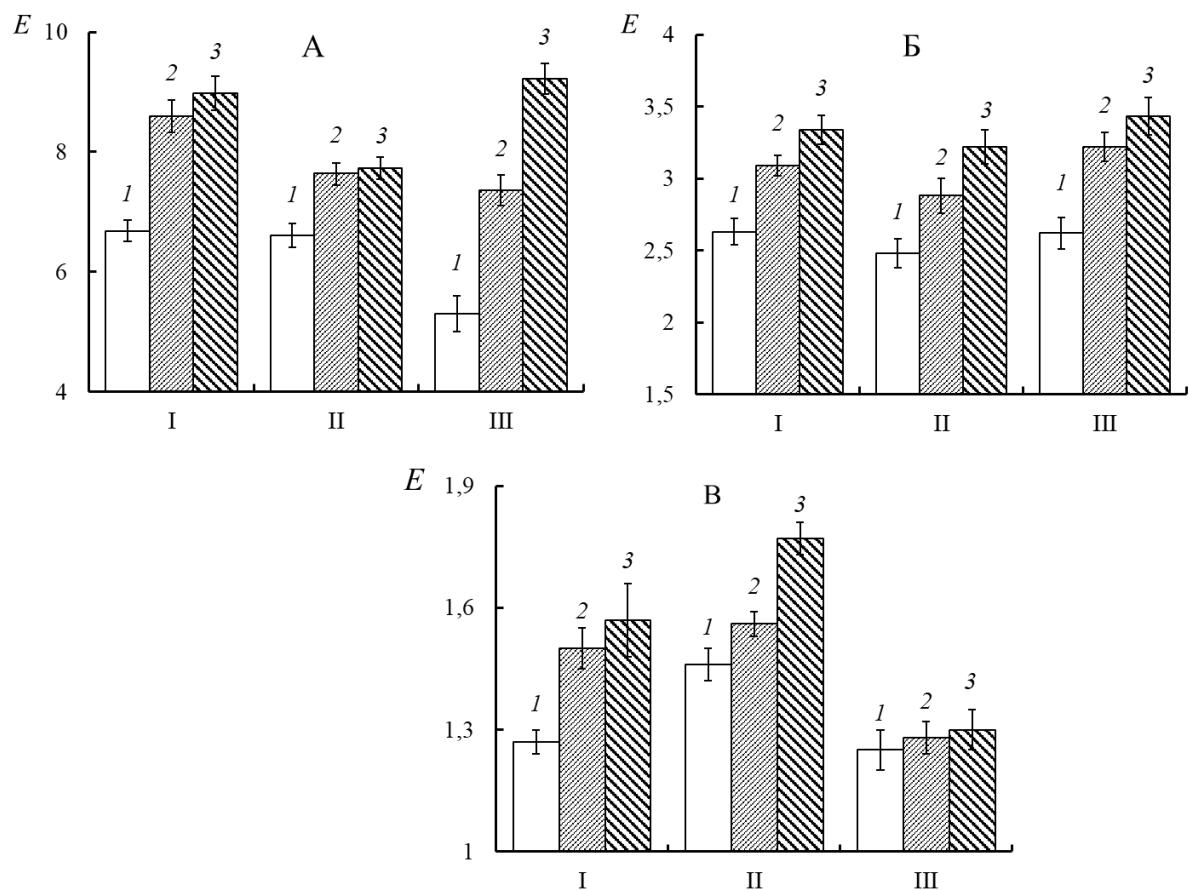


Рис. 3.2. Активність СОД (E , умов. од./г сиріої речовини · хв) (А), каталази (E , ммоль Н₂О₂/г сиріої речовини · хв) (Б) і гваяколпероксидази (E , умов. од./г сиріої речовини · хв) (В) в пагонах проростків пшениці за дії поліамінів і теплового стресу. I – без стресу; II и III – через 1 и 24 год після ушкоджуючого прогріву (45°C, 10 хв). 1 – контроль; 2 – путресцин (1 мМ); 3 – спермін (1 мМ).

Обробка проростків поліамінами спричиняла невелике підвищення активності гваяколпероксидази (рис. 3.2, В). Через 1 год після прогріву відбувалося підвищення активності ферменту в контролі, а у варіантах з обробкою поліамінами відзначалася лише тенденція до її збільшення. При цьому у проростках, оброблених сперміном, активність гваяколпероксидази була вищою, ніж у контролі і варіанті з путресцином. Через 24 год після прогріву активність ферменту в усіх варіантах досліду дещо знижувалася, а відмінності між контролем і варіантами з поліамінами нівелювалися (рис. 3.2, В).

Показником, який характеризує сталість окиснювально-відновної рівноваги, є зміни вмісту продуктів ПОЛ, насамперед, МДА. За відсутності дії стресора обробка проростків путресцином не впливала на вміст у них МДА, в той час як під дією сперміну відзначалося невелике, але вірогідне при $p \leq 0,05$ підвищення його кількості (рис. 3.3). Через 24 год після теплового стресу вміст МДА у варіантах з поліамінами було нижчим, ніж в контролі.

Отже, обробка проростків пшениці поліамінами викликала підвищення їх стійкості до потенційно летального теплового стресу (рис. 3.1). У літературі є дані про позитивний вплив поліамінів на теплостійкість рослин інших видів: рису (Mostofa et al., 2014) і арабідопсису (Sagor et al., 2013). Як уже зазначалося, про захисні ефекти поліамінів при дії на рослини гіпертермії свідчить вища теплостійкість рослин різних видів з посиленою експресією генів ферментів біосинтезу поліамінів (Prabhavathi, Rajam, 2007; Cheng et al., 2009). З іншого боку, підвищену теплостійкість проявляли рослини зі зниженою експресією гена поліаміноксидази і підвищеним вмістом ендогенних поліамінів (Mellidou et al., 2017).

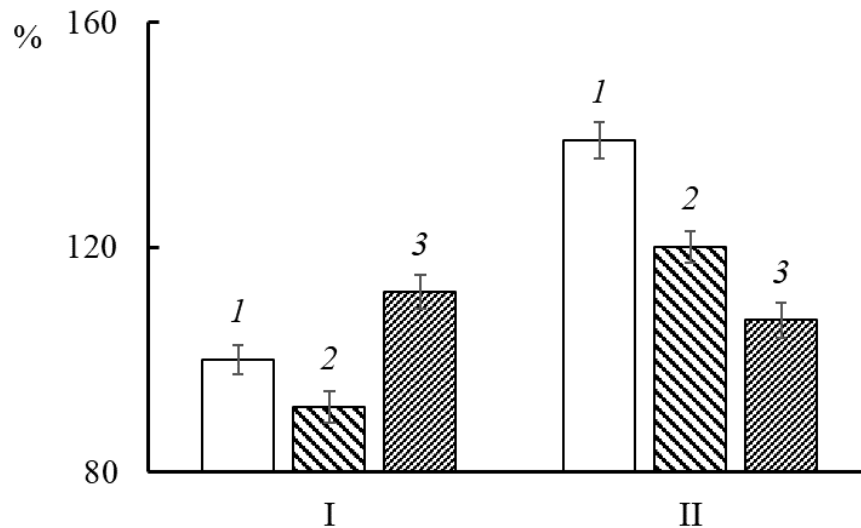


Рис. 3.3. Вміст МДА (% до контролю без стресу) у пагонах проростків пшениці. I – без стресу; II – через 24 год після ушкоджуючого прогріву (45°C, 10 хв). 1 – контроль; 2 - путресцин (1 мМ); 3 – спермін (1 мМ).

Захисну дію поліамінів при тепловому стресі в умовах наших експериментів можна пов'язувати зі зменшенням під їх впливом окиснювальних пошкоджень. Про це свідчить нижчий вміст продукту ПОЛ МДА після дії стресу в проростках дослідних варіантів порівняно з контрольними (рис. 3.3). Зниження інтенсивності ПОЛ під впливом екзогенних поліамінів виявлено в ряді досліджень. Так, обробка рослин нуту путресцином, сперміном і спермідином знижувала спричинюване холодним стресом накопичення пероксиду водню та МДА (Nayyar, Chander, 2004). Зниження вмісту продуктів ПОЛ в умовах гіпертермії спостерігалось у рослин рису при їх обприскуванні спермідином (Mostofa et al., 2014). Обробка рослин сафлору путресцином знижувала накопичення МДА в умовах посухи (Khosrowshahi et al., 2018).

Пом'якшення поліамінами прояву окиснювального стресу може бути зумовлене як їх прямою антиоксидантною дією, так і активацією під їх впливом антиоксидантних ферментів. У зв'язку зі здатністю зв'язувати вільні радикали (Ha et al., 1998; Hussain et al., 2011) поліаміни розглядають як групу низькомолекулярних антиоксидантів (Stolfa et al., 2015). З іншого боку, як уже зазначалося, при окисненні поліамінів утворюється пероксид водню (Minocha et

al., 2014). За певних умов вони також можуть викликати активацію НАДФН-оксидази і тим самим сприяти генерації АФК (Andronis et al., 2014). Ймовірно, ці ефекти можуть бути як сигналом (Yang et al., 2014), що стимулює антиоксидантну систему, так і чинником, що викликає окиснювально-відновний дисбаланс (Szalai et al. 2017).

В умовах наших експериментів екзогенні поліаміни активували ферментативну антиоксидантну систему (рис. 3.2), причому їх ефект проявлявся не тільки після стресового впливу, а й за звичайних умов. Цей факт може вказувати саме на активацію антиоксидантної системи поліамінами, а не захист ними наявних молекул антиоксидантних ферментів. Водночас вища активність СОД і каталази у проростків пшениці дослідних варіантів в наших експериментах спостерігалася в постстресовий період (рис. 3.2), що може бути частково зумовлене здатністю поліамінів захищати білки від денатурації (Ghosh et al., 2012).

У наших експериментах як спермін, так і путресцин чинили достовірний позитивний вплив на теплостійкість проростків пшениці. При цьому, однак, ефекти сперміну були більш вираженими (табл. 3.2). Як уже зазначалося, в роботі Sagor та ін. (2013) показано, що позитивний вплив на виживаність рослин арабідопсису після теплового стресу чинив спермін, а не путресцин. У наших дослідях спермін більш істотно, ніж путресцин, впливав на активність СОД, каталази і гваяколпероксидази в проростках пшениці, причому кількісні відмінності в ефектах поліамінів більшою мірою проявлялися після стресового впливу (рис. 3.2).

Заслуговує на увагу і ще один феномен дії сперміну: підвищення вмісту МДА в проростках за відсутності стресу (рис. 3.3). Не виключено, що цей ефект пов'язаний з тимчасовим посиленням генерації АФК, яке може бути зумовлене як утворенням пероксиду водню при окисненні поліаміну, так і спричинюваним ним впливом на активність НАДФН-оксидази (Pal et al., 2015). У літературі є відомості про здатність сперміну активувати сигнальні мережі та, як наслідок,

підвищувати активність деяких протеїназ за участю пероксиду водню як сигнального посередника (Pal et al., 2015).

Отже, в умовах наших експериментів захисна дія путресцину і (більшою мірою) сперміну на проростки пшениці при тепловому стресі супроводжувалася підвищенням активності ключових антиоксидантних ферментів і зменшенням окиснювальних пошкоджень.

3.2. Роль сигнальних посередників у процесах індукування теплостійкості рослинних об'єктів путресцином і кадаверином

3.2.1. Активні форми кисню.

Підвищення активності антиоксидантних ферментів на тлі збільшення вмісту поліамінів у рослин може бути пов'язано з формуванням сигналу, що індукує антиоксидантну систему. Одним з найбільш ймовірних механізмів такої активації може бути підвищення вмісту пер оксиду водню в результаті реакції окиснення поліамінів поліаміноксидазою або діаміноксидазою (Pal et al., 2015). Однак, це не єдиний механізм посилення генерації АФК рослинами під впливом поліамінів. Як зазначалося вище, є дані про здатність екзогенних поліамінів підвищувати активність НАДФН-оксидази (Andronis et al., 2014).

В цілому можлива роль АФК як сигнальних посередників в реалізації стрес-протекторної дії поліамінів, а також внесок окремих ферментів в зміну редокс-гомеостазу, що відбувається під їх впливом, дотепер залишалися малодослідженими. Зважаючи на це, одним із завдань роботи було встановлення можливого причинно-наслідкового зв'язку між спричинюваними ПА змінами редокс-гомеостазу у проростків пшениці і підвищенням їх теплостійкості. До завдань роботи також входила оцінка внеску діаміноксидази і НАДФН-оксидази в реалізацію фізіологічних ефектів путресцину і кадаверину. Як модельний об'єкт використовували корені інтактних проростків, оскільки вони швидше, ніж надземна частина, реагують на

екзогенні сполуки і вважаються зручним об'єктом для вивчення механізмів зміни редокс-гомеостазу (Колупаев, Обозный, 2012; Chasov, Minibayeva, 2014).

3.2.1.1. Роль АФК у прояві стрес-протекторного впливу путресцину на проростки пшениці. Для досліджень використовували путресцин в концентрації 1 мМ, яка спричиняла найбільш істотне зростання теплостійкості проростків (див. рис. 3.1).

Обробка коренів інтактних проростків 1 мМ путресцином викликала транзиторне підвищення в них вмісту пероксиду водню (рис. 3.4). Максимум відзначався через 2 години після початку впливу путресцину. До моменту закінчення інкубації (24 год) вміст H_2O_2 лише незначно перевищував відповідне значення в контролі.

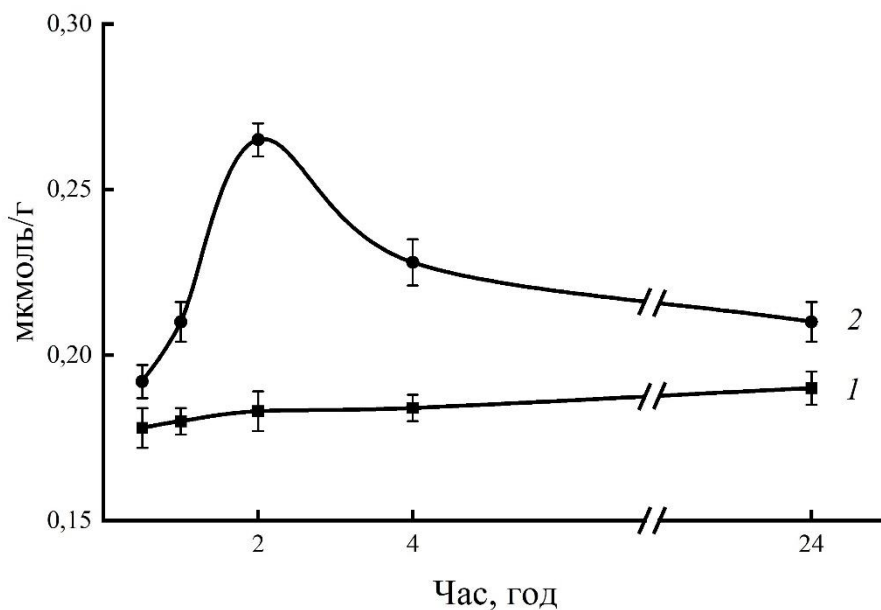


Рис. 3.4. Динаміка вмісту пероксиду водню (мкмоль/г) в коренях проростків пшениці за дії путресцину. 1 – контроль; 2 – путресцин (1 мМ).

Як зазначалося, ефект підвищення вмісту пероксиду водню під дією ПА може бути зумовлений збільшенням активності поліаміноксидаз та/або НАДФН-оксидази. Для з'ясування внеску цих ферментів у спричинюване путресцином накопичення пероксиду водню проростки перед впливом

путресцину інкубували в середовищі з додаванням інгібітору діаміноксидази аміногуанідину або інгібітору НАДФН-оксидази імідазолу. Виявилося, що сам по собі аміногуанідин не впливав на вміст H_2O_2 в коренях проростків (рис. 3.5). При цьому він повністю усував ефект накопичення пероксиду водню, спричинюваний путресцином. Обробка проростків імідазолом викликала тенденцію до зниження вмісту пероксиду водню в коренях. При комбінованій дії імідазолу і путресцину ефект останнього значною мірою нівелювався (рис. 3.3). Кількість пероксиду водню в коренях знижувалася і під впливом антиоксиданту ДМТС. При цьому скавенджер H_2O_2 повністю знімав ефект підвищення вмісту пероксиду водню під дією путресцину (рис. 3.5).

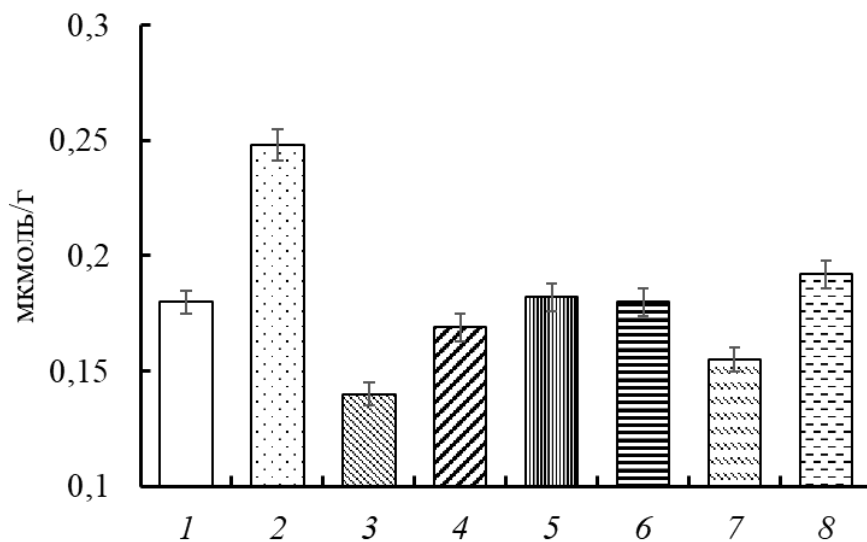


Рис. 3.5. Вміст пероксиду водню (мкмоль/г) в коренях проростків пшениці за дії путресцину, ДМТС, аміногуанідину та імідазолу. 1 – контроль; 2 – путресцин (1 мМ); 3 – ДМТС (150 мкМ); 4 – путресцин (1 мМ) + ДМТС (150 мкМ); 5 – аміногуанідин (1 мМ); 6 – путресцин (1 мМ) + аміногуанідин (1 мМ); 7 – імідазол (10 мкМ); 8 – путресцин (1 мМ) + імідазол (10 мкМ).

Обробка путресцином зменшувала прояви окиснювального стресу у проростків після їх ушкоджуючого прогріву, що виявлялося у меншому накопиченні продукту ПОЛ МДА у коренях проростків (рис. 3.6, А). За дії

ДМТС, який має антиоксидантні властивості, також відзначалося деяке зменшення вмісту МДА, але цей ефект був вірогідним лише при $p \leq 0,1$. Водночас ДМТС частково нівелював прояв ефекту зменшення окиснювального стресу, спричинюваний дією путресцину. Іншими словами, протекторний вплив путресцину зменшувався дією ДМТС, що свідчить про участь АФК в реалізації такого впливу.

Обробка проростків ДМТС, аміногуанідном та імідазолом не чинила вірогідного впливу на їх теплостійкість (рис. 3.6, Б). При комбінованій обробці проростків скавенджер пероксиду водню та інгібітори діаміноксидази і НАДФН-оксидази повністю усували позитивний вплив путресцину на стійкість проростків до нагрівання.

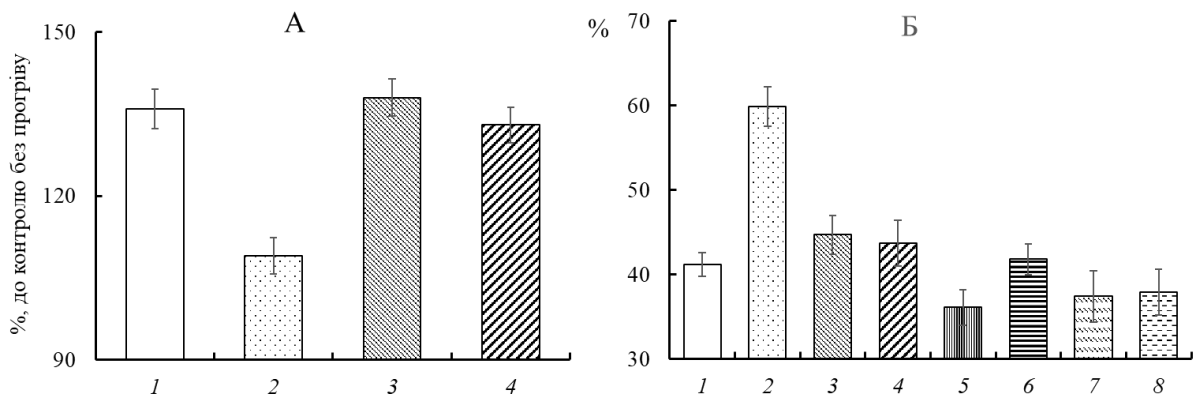


Рис. 3.6. Вміст МДА в коренях (% до контролю без прогріву – А) і виживаність проростків (% - Б) після ушкоджуючого прогріву (10 хв при 46°C). (А): 1 – контроль; 2 – путресцин (1 мМ); 3 – ДМТС (150 мкМ); 4 – путресцин (1 мМ) + ДМТС (150 мкМ). (Б): 1 – контроль; 2 – путресцин (1 мМ); 3 – ДМТС (150 мкМ); 4 – путресцин (1 мМ) + ДМТС (150 мкМ); 5 – аміногуанідин (1 мМ); 6 – путресцин (1 мМ) + аміногуанідин (1 мМ); 7 – імідазол (10 мкМ); 8 – путресцин (1 мМ) + імідазол (10 мкМ).

Є підстави вважати, що пероксид водню, що утворюється при обробці проростків путресцином, виступає як сигнал для індукування захисних систем, задіяних в розвитку стійкості до гіпертермії. Однією з таких систем є

антиоксидантна. Обробка проростків путресцином спричиняла підвищення загальної активності СОД в коренях, максимальний ефект спостерігався через 24 год після початку обробки (рис 3.7, А). Через 4 год після ушкоджуючого прогріву активність ферменту коренях проростків контрольного і дослідного варіантів знижувалася, при цьому, однак, абсолютні значення активності СОД у варіанті з путресцином залишалися вищими.

При обробці путресцином активність каталази в коренях також підвищувалася (рис. 3.7, Б). Найбільш помітні ефекти відзначалися через 4 і 24 год його впливу. Після прогріву активність каталази в коренях проростків обох варіантів, як і активність СОД, знижувалася. Однак абсолютні величини активності каталази у варіанті з путресцином були вірогідно вищими, ніж в контролі.

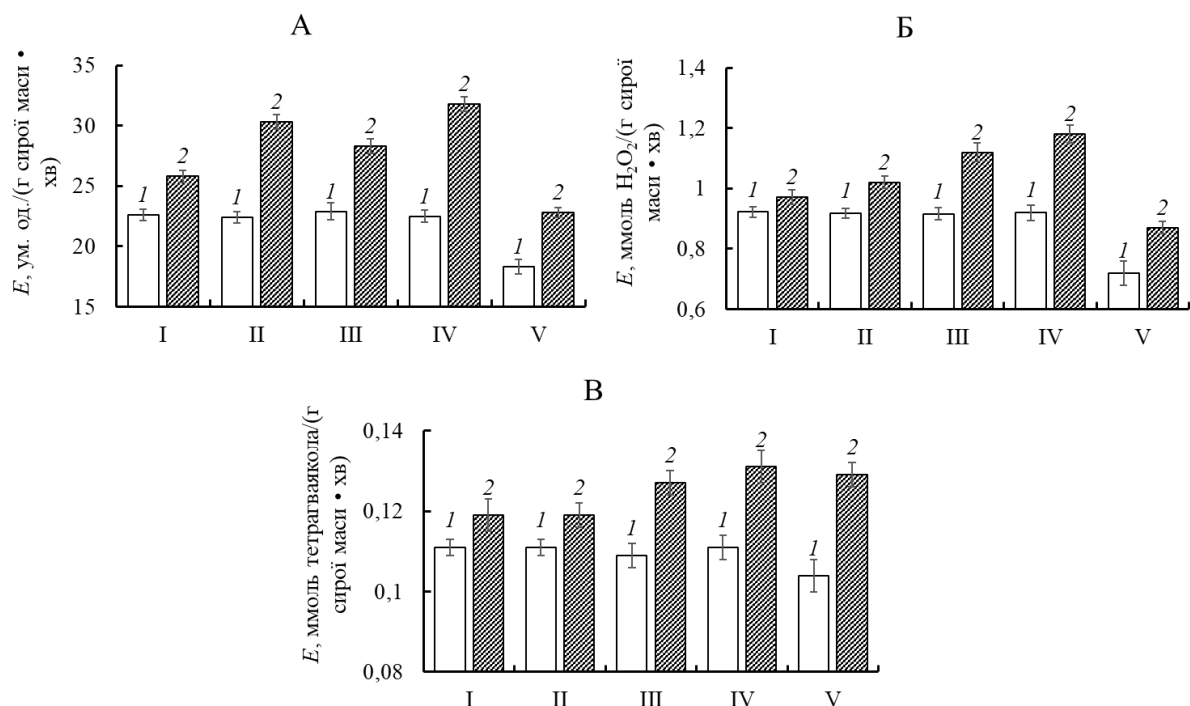


Рис. 3.7. Динаміка активності СОД (А), каталази (Б) і гваяколпероксидази (В) в коренях проростків пшениці за дії путресцину та ушкоджуючого прогріву. I–IV – відповідно: через 1, 2, 4 і 24 год після початку обробки путресцином, V – через 4 год після прогріву при 46°C. 1 – контроль; 2 – путресцин (1 мМ).

Активність гваяколпероксидази в коренях через 4 і 24 год після початку впливу путресцину ненабагато, але вірогідно при $p \leq 0,05$, підвищувалася (рис. 3.7, В). Після ушкоджуючого прогріву активність ферменту в коренях істотно не змінювалася, при цьому у варіанті з путресцином зберігалися вищі від контролю величини.

Якщо припустити, що АФК є посередниками в процесі індукції путресцином ферментативної антиоксидантної системи, то його вплив на активність ферментів має залежати від змісту АФК. Для перевірки цього припущення вивчали вплив ДМТС, аміногуанідину та імідазолу на активність антиоксидантних ферментів в коренях проростків при їх обробці путресцином. Скавенджер пероксиду водню ДМТС сам по собі істотно не впливав на активність СОД і каталази, але викликав невелике зниження активності гваяколпероксидази в коренях (рис. 3.8). При цьому він повністю нівелював ефекти підвищення активності усіх трьох антиоксидантних ферментів, спричинювані дією путресцину.

При обробці проростків інгібітором діаміноксидази аміногуанідином активність СОД істотно не змінювалася, активність каталази знижувалася, а активність гваяколпероксидази, навпаки, підвищувалася (рис. 3.8). При цьому аміногуанідин нівелював спричинюваний путресцином ефект підвищення активності СОД і каталази. У той же час активність гваяколпероксидази у варіанті з поєднанням дії аміногуанідину і путресцину була вищою, ніж у контролі, її абсолютні значення були приблизно такими ж, як у варіантах з обробкою тільки аміногуанідином або путресцином.

Обробка проростків імідазолом не викликала істотних змін активності трьох досліджуваних антиоксидантних ферментів (рис. 3.8). При цьому інгібітор НАДФН-оксидази усував спричинюване путресцином підвищення активності СОД, каталази і гваяколпероксидази.

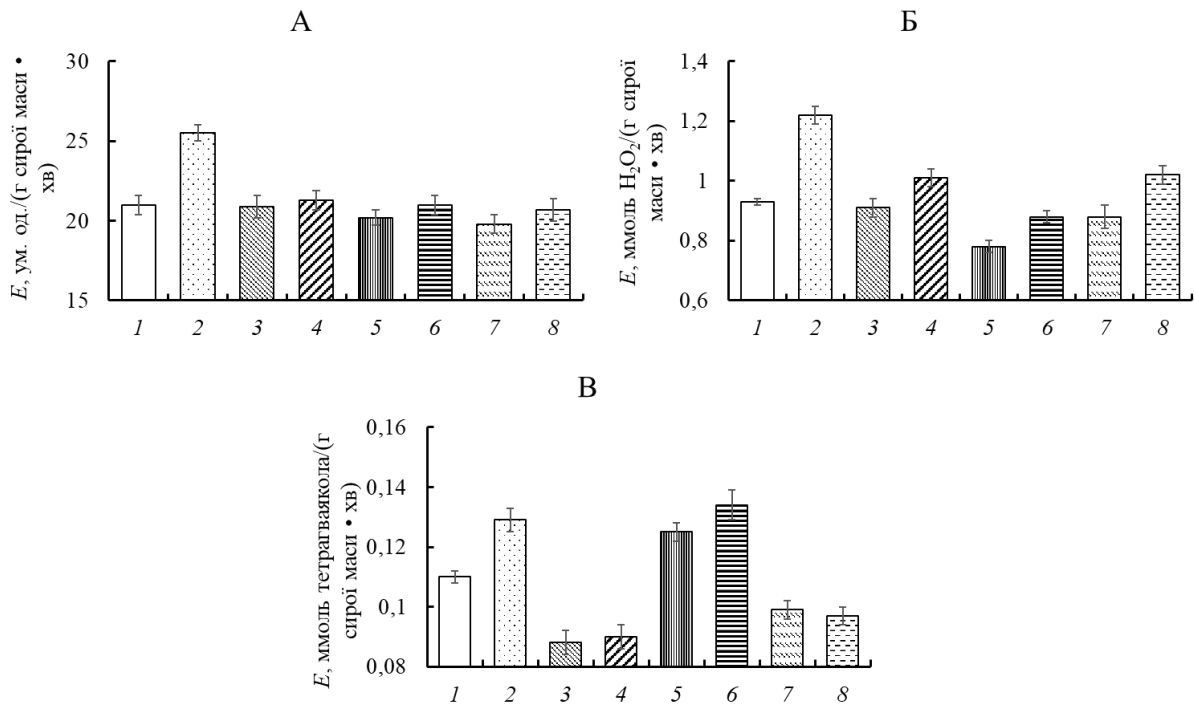


Рис. 3.8. Активність СОД (А), каталази (Б) і гваяколпероксидази (В) в коренях проростків пшениці за дії путресцину, ДМТС, аміногуанідину та імідазолу. 1 – контроль; 2 – путресцин (1 мМ); 3 – ДМТС (150 мкМ); 4 – путресцин (1 мМ) + ДМТС (150 мкМ); 5 – аміногуанідин (1 мМ); 6 – путресцин (1 мМ) + аміногуанідин (1 мМ); 7 – імідазол (10 мкМ); 8 – путресцин (1 мМ) + імідазол (10 мкМ).

Таким чином, в цілому отримані результати вказують на участь пероксиду водню як сигнального посередника в процесі активації антиоксидантної системи та індукування теплостійкості проростків пшениці під впливом путресцину. Активація ферментативної складової антиоксидантної системи є одним з ключових механізмів в адаптації рослин до гіпертермії і посухи (Кірізій та ін., 2011; Hasanuzzaman et al., 2013; Li et al., 2018). Примітно, що активація всіх трьох досліджуваних ферментів відбувалася через 4-24 год після початку обробки проростків путресцином (рис. 3.7), тобто пізніше моменту максимального підвищення вмісту пероксиду водню, яке спостерігалось через 2 год після початку обробки (рис. 3.4). На причинно-наслідковий зв'язок між спричинюваним дією путресцину утворенням

пероксиду водню і підвищенням активності антиоксидантних ферментів вказує не тільки динаміка цих процесів, а й результати інгібіторного аналізу. Позитивний вплив путресцину на теплостійкість проростків повністю усувався скавенджером H_2O_2 ДМТС, яка знімала транзиторний ефект підвищення вмісту пероксиду водню в коренях (рис. 3.5) та збільшення в них активності СОД, каталази і гваяколпероксидази (рис. 3.8).

Можна вважати, що, принаймні, однією з причин підвищення вмісту пероксиду водню в коренях під впливом путресцину є зростання активності діаміноксидази – ферменту його катаболізму, що приводить до утворення H_2O_2 . На це вказує усунення накопичення пероксиду водню у варіанті з обробкою путресцином в присутності аміногуанідину (рис. 3.5). З іншого боку, збільшення вмісту пероксиду водню, спричинюване путресцином, значною мірою пригнічувалося і інгібітором НАДФН-оксидази імідазолом. На участь щонайменше двох цих ферментів в утворенні пероксиду водню за дії путресцину вказують результати, отримані на рослинах сої (Todorova et al., 2013). Автори вважають, що ДАО і ПАО разом з НАДФН-оксидазою забезпечують спричинюваний поліамінами ефект суберинізації клітинних стінок. У рослин арабідопсису зафіксовано підвищення активності НАДФН-оксидази під впливом екзогенного спермідину (Andronis et al., 2014).

Примітно, що локалізована в плазмалемі НАДФН-оксидаза може активуватися самими ж АФК, які спочатку утворюються в інших клітинних компартментах або на поверхні сусідніх клітин (Mittler et al., 2011). Припускають, що збільшення вмісту АФК, що відбувається стохастично за дії стресорів, або за участю інших ферментів може перетворюватися на більш потужний сигнал, пов'язаний з активацією НАДФН-оксидази (Mittler et al., 2011; Kolupaev, Karpets, 2014). Не виключено, що стимулом для активації НАДФН-оксидази при дії екзогенного путресцину може бути утворення пероксиду водню, пов'язане з його катаболізмом за участю ДАО.

Інгібітор діаміноксидази аміногуанідин в наших експериментах усував спричинювані путресцином ефекти підвищення вмісту пероксиду водню в

коренях, збільшення активності СОД і каталази і розвитку теплостійкості проростків.

У наших експериментах виявлено важко пояснюваний ефект підвищення активності гваяколпероксидази коренів проростків пшениці під впливом аміногуанідину (рис. 3.7, В). При цьому аміногуанідин не впливав на величину ефекту підвищення активності ферменту, спричинюваного путресцином. Варто зауважити, що в культурі тканин пагонів тополі показано деяке збільшення активності цього ферменту при внесенні в середовище аміногуанідину (Hausman et al., 1995).

Отже, в цілому ПА спричиняли підвищення активності антиоксидантних ферментів у проростках пшениці. Примітно, що характер змін активності досліджуваних ензимів під впливом путресцину у коренях і пагонах (див. рис. 3.2) був схожим, що свідчить про протекторний вплив екзогенного путресцину на рівні цілої рослини.

3.2.1.2. Роль АФК у прояві стрес-протекторного впливу кадаверину на проростки пшениці. Як уже зазначалося, кадаверин належить до найменш досліджених поліамінів рослин (Rajpal, Tomar, 2020). Зв'язок фізіологічних ефектів кадаверину з утворенням сигнальних посередників, зокрема, АФК, залишається малодослідженим. Виявлено, що експозиція кореневої системи кришталевої травички в середовищі з додаванням кадаверину індукувала інтенсивну експресію гена, що кодує цитоплазматичну ізоформу супероксиддисмутази (Cu/Zn-СОД). Цей ефект не усувався дією інгібітору діаміноксидази аміногуанідину, що дало підставу авторам припускати можливість прямого (без участі сигнальних посередників) впливу кадаверину на експресію окремих генів СОД (Aronova et al, 2005). Однак спеціальних досліджень ролі АФК в прояві впливу кадаверину на стресостійкість рослин дотепер не проводилося. Зважаючи на це, вивчали зв'язок протекторного впливу кадаверину на проростки пшениці при тепловому стресі з утворенням і знешкодженням АФК.

Обробка кадаверином, як і описана вище дія путресцину, спричиняла підвищення вмісту пероксиду водню в коренях (рис. 3.9). Помітний ефект спостерігався через 1-4 год після її початку з максимумом через 2 год. Збільшення вмісту пероксиду водню носило транзиторний характер і через 24 год інкубації відзначалося навіть деяке зниження кількості H_2O_2 в коренях дослідного варіанта.

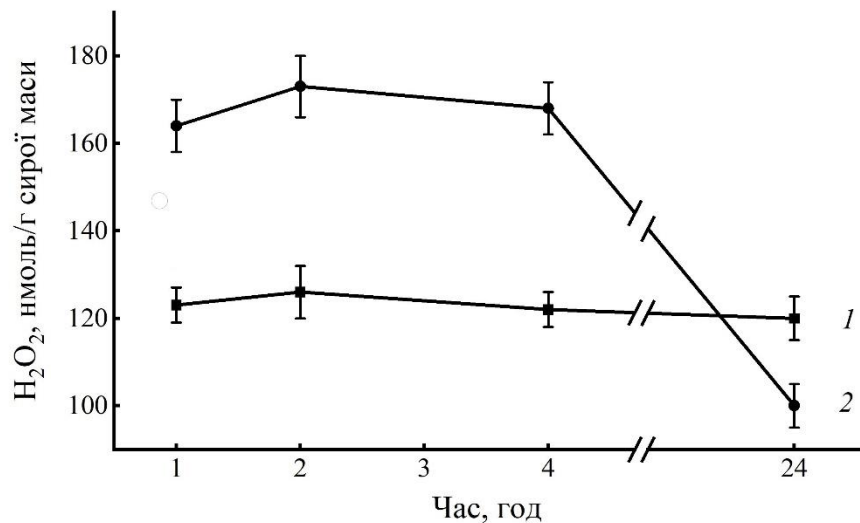


Рис. 3.9. Динаміка вмісту пероксиду водню в коренях проростків пшениці за дії кадаверину: 1 – контроль; 2 – кадаверин.

Попередня обробка проростків скавенджером пероксиду водню ДМТС знімала прояв ефекту підвищення вмісту H_2O_2 в коренях, спричинюваний 2-годинним впливом кадаверину (рис. 3.10). Цей ефект також повністю усувався дією інгібітору діаміноксидази аміногуанідином і майже не змінювався в присутності інгібітору НАДФН-оксидази імідазолу. Таким чином, дані інгібіторного аналізу вказують на залежність спричинюваного кадаверином ефекту підвищення вмісту пероксиду водню в клітинах коренів в першу чергу від активності діаміноксидази.

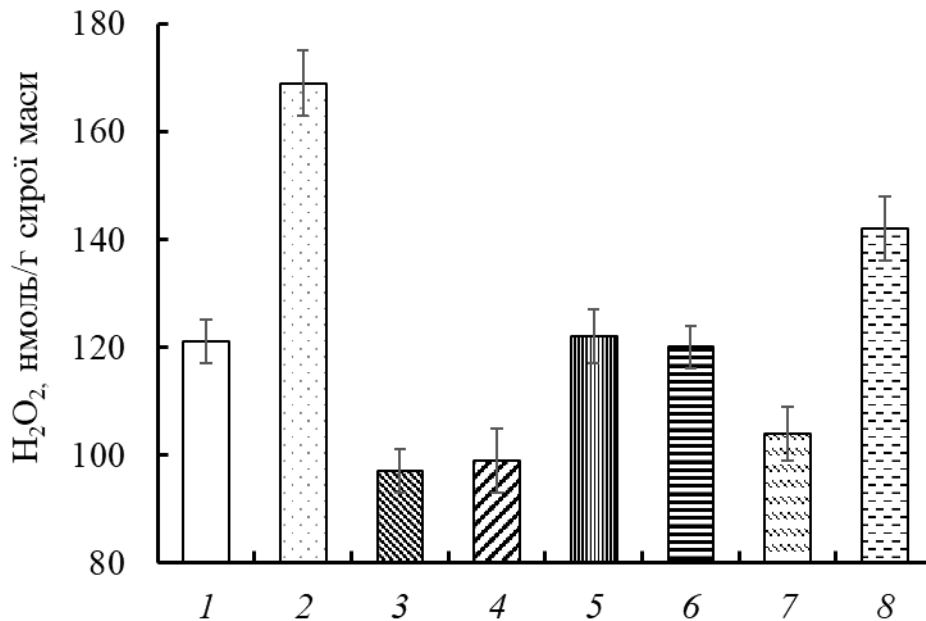


Рис. 3.10. Вміст пероксиду водню в коренях проростків пшениці за дії кадаверину, ДМТС, аміногуанідину та імідазолу. 1 – контроль; 2 – кадаверин (1 мМ); 3 – ДМТС (150 мкМ); 4 – кадаверин (1 мМ) + ДМТС (150 мкМ); 5 – аміногуанідин (1 мМ); 6 – кадаверин (1 мМ) + аміногуанідин (1 мМ); 7 – імідазол (10 мкМ); 8 – кадаверин (1 мМ) + імідазол (10 мкМ).

Примітка. Обробку коренів кадаверином проводили протягом 2 год, ДМТС та інгібітори ферментів додавали в середовище інкубації коренів за 2 год до внесення кадаверину.

Для з'ясування значення АФК в індукованні кадаверином теплостійкості проростків оцінювали вплив ДМТС, аміногуанідину та імідазолу на прояв його протекторних ефектів. Через добу після ушкоджуючого прогріву в коренях проростків відзначалося підвищення вмісту продуктів ПОЛ (рис. 3.11, А). Обробка кадаверином помітно знижувала прояв окиснювального стресу. ДМТС слабо впливала на вміст продуктів ПОЛ в коренях, але при цьому значною мірою нівелювала захисний ефект кадаверину. При обробці аміногуанідином вміст продуктів ПОЛ в коренях проростків майже не змінювався, але цей інгібітор діаміноксидази знімав спричинюваний дією кадаверину ефект зменшення їх накопичення після теплового стресу. У коренях проростків,

оброблених інгібітором НАДФН-оксидази імідазолом, вміст продуктів ПОЛ не змінювався, не впливав імідазол і на прояв ефекту кадаверину на їх вміст у коренях.

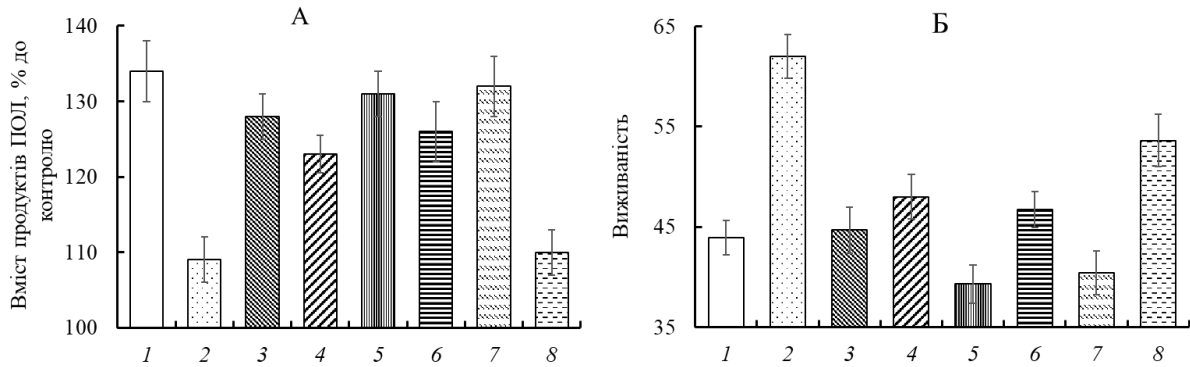


Рис. 3.11. Вміст в коренях продуктів ПОЛ (А) і виживаність проростків пшениці (Б) після ушкоджуючого прогріву. 1 – контроль; 2 – кадаверин (1 мМ); 3 – ДМТС (150 мкМ); 4 – кадаверин (1 мМ) + ДМТС (150 мкМ); 5 – аміногуанідин (1 мМ); 6 – кадаверин (1 мМ) + аміногуанідин (1 мМ); 7 – імідазол (10 мкМ); 8 – кадаверин (1 мМ) + імідазол (10 мкМ).

Примітка. Вміст продуктів ПОЛ визначали через 24 год, виживання проростків – через 3 доби після ушкоджуючого прогріву.

Дані щодо впливу досліджуваних сполук на виживаність проростків після ушкоджуючого прогріву узгоджуються з їх ефектами на показник окиснювального стресу. Самі по собі ДМТС, аміногуанідин та імідазол істотно не впливали на виживаність проростків після теплового стресу (рис. 3.11, Б). При цьому ДМТС і аміногуанідин повністю усували захисний ефект кадаверину. У присутності імідазолу стрес-протекторна дія кадаверину дещо зменшувалася, але ефект не був значимим при $p \leq 0,05$.

Зменшення прояву окиснювального стресу (накопичення МДА) після прогріву в коренях проростків під впливом кадаверину вказує на можливість активації антиоксидантної системи. І дійсно, обробка кадаверином викликала поступове підвищення активності СОД, каталази і гваяколпероксидази (рис. 3.12). При цьому максимальний ефект проявлявся через 24 год після початку

впливу кадаверину. Після ушкоджуючого прогріву активність СОД і гваяколпероксидази змінювалася несуттєво, а активність каталази знижувалася. Обробка кадаверином сприяла збереженню активності СОД і каталази в постстресовий період, проте не впливала на активність гваяколпероксидази (рис. 3.12).

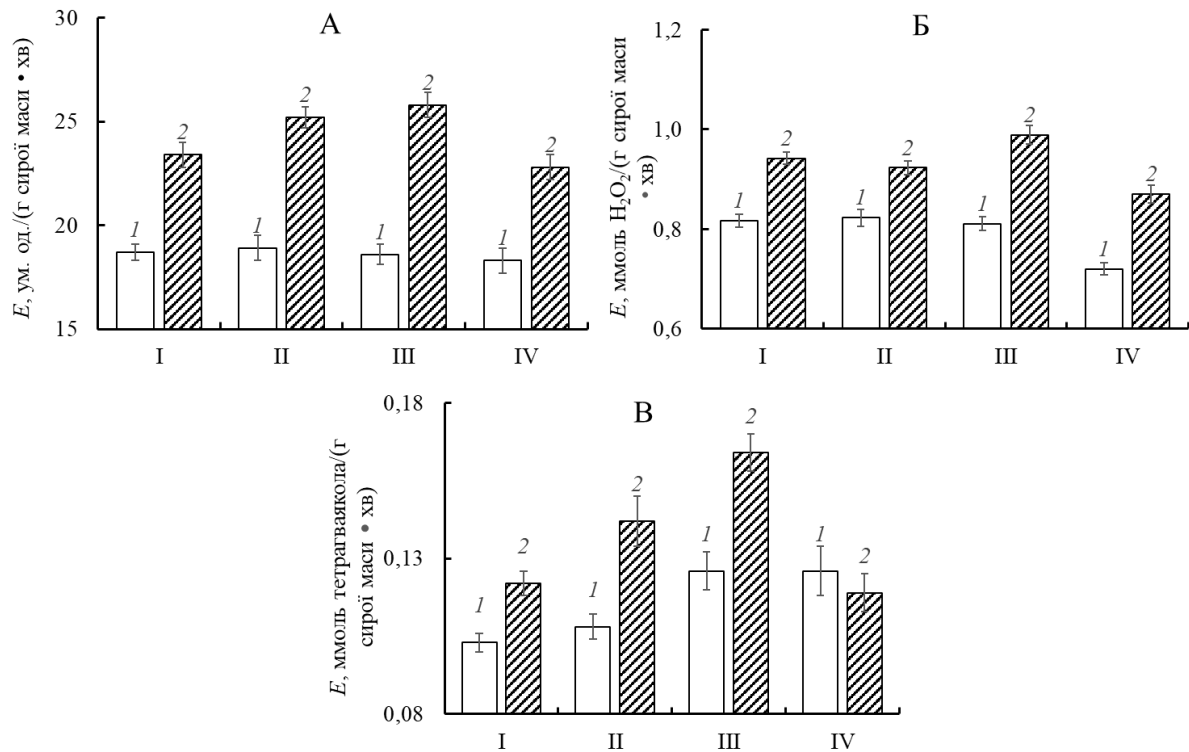


Рис. 3.12. Динаміка активності СОД (А), каталази (Б) і гваяколпероксидази (В) в коренях проростків пшениці за дії кадаверину і ушкоджуючого прогріву. I-III – відповідно: через 2, 4 і 24 год після початку обробки кадаверином, IV – через 24 годин після прогріву при 45°C. 1 – контроль; 2 – кадаверин (1 мМ).

Для з'ясування ролі пероксиду водню і ферментативних систем, причетних до його утворення, у спричинюваному кадаверином підвищенні активності СОД, каталази і гваяколпероксидази досліджували вплив ДМТС, аміногуанідину та імідазолу на активність цих ферментів після 24-годинної експозиції в присутності кадаверину. Попередня обробка ДМТС не впливала на активність СОД і не усувала її підвищення, спричинюване кадаверином (рис.

3.13, А). Інгібітор ДАО аміногуанідин також не перешкодив підвищенню активності СОД в присутності кадаверину. Інгібітор НАДФН-оксидази так само істотно не впливав зміни активності СОД за дії кадаверину.

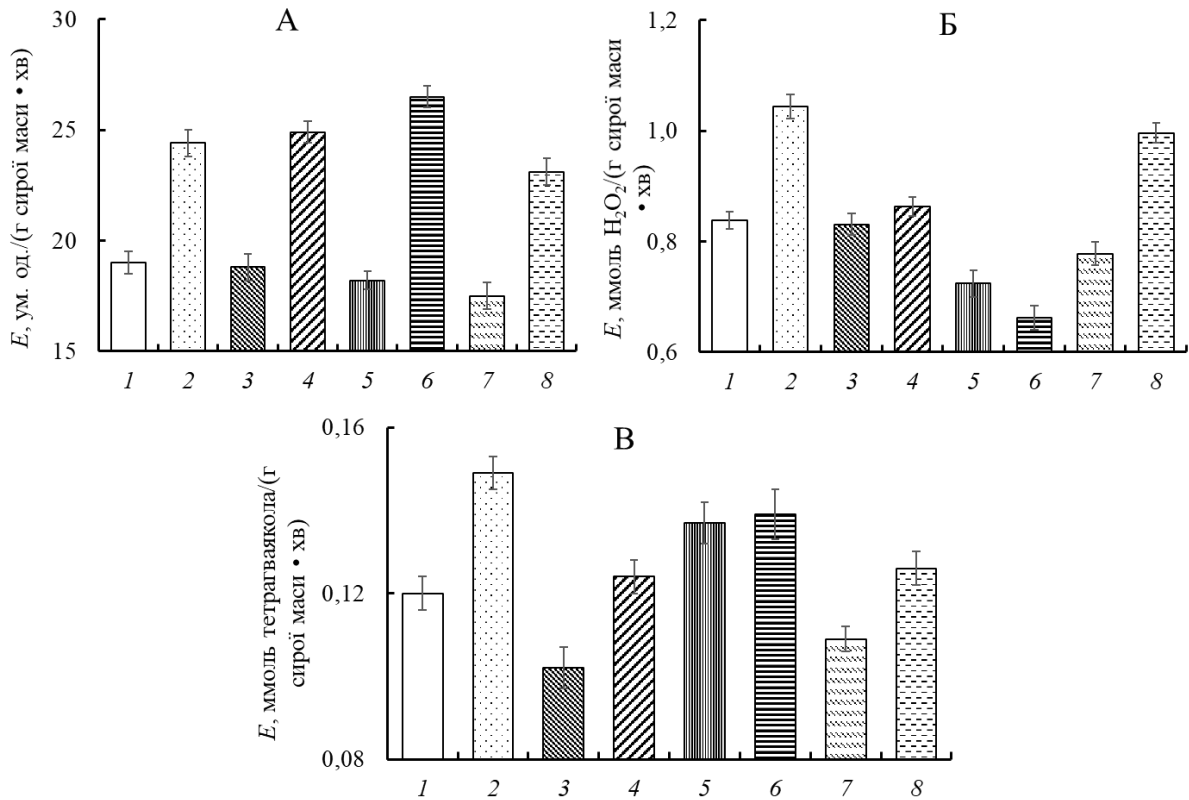


Рис. 3.13. Активність СОД (А), каталази (Б) і гваяколпероксидази (В) у коренях проростків пшениці при обробці кадаверином, ДМТС, аміногуанідином та імідазолом ($M \pm mM$). 1 – контроль; 2 – кадаверин (1 мМ); 3 – ДМТС (150 мкМ); 4 – кадаверин (1 мМ) + ДМТС (150 мкМ); 5 – аміногуанідин (1 мМ); 6 – кадаверин (1 мМ) + аміногуанідин (1 мМ); 7 – імідазол (10 мкМ); 8 – кадаверин (1 мМ) + імідазол (10 мкМ).

Інші ефекти відзначалися при оцінці впливу досліджуваних інгібіторів на активність каталази в коренях проростків, оброблених кадаверином (рис. 3.13, Б). ДМТС усував її підвищення, спричинюване кадаверином. Обробка аміногуанідином також повністю усувала ефект збільшення активності каталази в присутності кадаверину. У той же час інгібітор НАДФН-оксидази імідазол

практично не перешкоджав ефекту підвищення активності каталази під впливом кадаверину.

Скавенджер пероксиду водню ДМТС нівелював підвищення активності пероксидази в коренях, яке викликала обробка кадаверином (рис. 3.13, В). У варіанті з комбінацією кадаверину і аміногуанідину активність ферменту була трохи нижчою, ніж у варіанті з самим кадаверином, однак ця різниця не була значимою при $p \leq 0,05$. Імідазол трохи знижував ефект підвищення активності гваяколпероксидази, спричинюваний кадаверином. Проте, цей ефект імідазолу не був значимим при $p \leq 0,05$.

Отже, підвищення теплостійкості проростків пшениці кадаверином, як і іншим діаміном (путресцином), виявилось залежним від утворення АФК і усувалось дією антиоксиданту ДМТС (див. рис. 3.11). Основним ферментом, який генерує пероксид водню при обробці проростків кадаверином, ймовірно, є ДАО. На це вказує усунення спричинюваного кадаверином підвищення вмісту пероксиду водню в коренях обробкою інгібітором ДАО аміногуанідином (див. рис. 3.10). Крім того, в присутності аміногуанідину не виявлявся вплив кадаверину на інтегральні показники – ефект окиснювального стресу і виживаність проростків після ушкоджуючого прогріву (див. рис. 3.11).

Іншим потужним ферментативним джерелом АФК в рослинних клітинах може бути НАДФН-оксидаза (Kohli et al, 2017). Є дані, що вказують на можливість підвищення її активності під впливом поліамінів, зокрема діаміну путресцину (Todorova et al., 2013). Однак вплив кадаверину на утворення пероксиду водню не усувався інгібітором НАДФН-оксидази імідазолом (див. рис. 3.9). Цей інгібітор практично не впливав і на прояв стрес-протекторних ефектів кадаверину (див. рис. 3.9).

Отримані результати дають підстави вважати наявність в реалізації ефектів кадаверину механізмів як пов'язаних, так і не пов'язаних з його перетворенням діаміноксидазою і утворенням пероксиду водню. Так, підвищення активності СОД, спричинюване кадаверином, не усувалось антиоксидантом ДМТС та інгібіторами ферментів, що генерують АФК

(аміногуанідином та імідазолом) (див. рис. 3.13, А). У роботі (Aronova et al., 2005) було показано, що ефект індукування кадаверином експресії гена Cu/Zn-СОД в клітинах коренів *M. crystallinum* майже повністю зберігався в присутності аміногуанідину. При цьому екзогенний пероксид водню значно слабше порівняно з кадаверином впливав на експресію гена Cu/Zn-СОД. З урахуванням цих фактів автори припустили, що кадаверин може безпосередньо впливати на експресію гена Cu/Zn-СОД в коренях кришталевої травички. Таким чином, можна говорити про схожість механізмів впливу кадаверину на активність СОД у двох таксономічно віддалених видів – *M. crystallinum* і *T. aestivum*. Слід, однак, відзначити, що в наших експериментах не аналізувалася експресія генів різних молекулярних форм СОД і електрофоретичний спектр білків, що виявляють каталітичну активність СОД. Як відомо, серед форм СОД більшості рослин зазвичай домінують Cu/Zn-вмісні ізоформи, однак частина ферментативної активності пов'язана і з наявністю локалізованих в клітинних компартментах Fe- і Mn-СОД (Kolupaev et al., 2019). У зв'язку з цим можна лише припускати, що кадаверин здатний підвищувати активність будь-яких форм СОД та/або експресію відповідних генів, діючи без участі пероксиду водню.

Що стосується інших досліджуваних нами антиоксидантних ферментів – каталази і гваяколпероксидази, то спричинювані кадаверином модифікації їх активності, ймовірно, опосередковані пероксидом водню. Так, підвищення активності каталази під впливом кадаверину не відбувалося в присутності скавенджера H_2O_2 ДМТС і інгібітору ДАО аміногуанідину (див. рис. 3.13, Б). У той же час інгібітор НАДФН-оксидази імідазол не усував такий ефект кадаверину. Можна вважати, що підвищення активності каталази є наслідком збільшення вмісту пероксиду водню, що відбувається в результаті окиснення кадаверину діаміноксидазою. Слід зазначити, що у *M. crystallinum* спричинюване кадаверином підвищення вмісту пероксиду водню та активності каталази в коренях також пригнічувалося аміногуанідином (Shevukova et al., 2006). Підвищення активності гваяколпероксидази в коренях проростків

пшениці, яке відбувалося при обробці кадаверином, так само усувалося дією ДМТС.

Отримані результати дозволяють говорити про значну схожість ефектів екзогенних кадаверину і путресцину. Обробка проростків цими діамінами підвищувала їх теплостійкість. В обох випадках під впливом діамінів відбувалося підвищення активності антиоксидантних ферментів (СОД, каталази і гваяколпероксидази). Вплив обох сполук на теплостійкість практично не виявлявся в присутності скавенджера пероксиду водню ДМТС. Однак за дії путресцину ефекти посилення утворення АФК, збільшення активності антиоксидантних ферментів і підвищення теплостійкості проростків усувалися не тільки ДМТС та інгібітором ДАО аміногуанідином, а й інгібітором НАДФН-оксидази імідазолом. Підвищення активності НАДФН-оксидази у рослин арабідопсису зафіксовано і під впливом екзогенного спермідину (Andronis et al, 2014). Не виключено, що внесок АФК, утворених різними ферментативними системами за дії поліамінів, може залежати від природи останніх.

3.2.2. Іони кальцію.

Окремою складовою фізіологічної активності поліамінів може бути їх вплив на стан іонних каналів. Феноменологія таких ефектів зареєстрована досить давно (Dobrovinskaya et al., 1999). Згідно з сучасними моделями, поліаміни чинять складний і неоднозначний вплив на іонні канали різних типів. Як уже зазначалося, є відомості про їхню здатність пригнічувати калієві і неспецифічні потенціалнезалежні катіонні канали (Pottosin, Shabala, 2014). З іншого боку, показано, що путресцин може спричиняти підвищення концентрації цитозольного кальцію в рослинних клітинах (Bose et al., 2011). Принаймні частково такий ефект може бути зумовлений посиленням утворення АФК при окисненні путресцину за участю ДАО і, як наслідок, відкриванням чутливих до АФК неселективних кальцієвих каналів (Pottosin, Shabala, 2014).

Відомо, що між АФК та іонами кальцію як сигнальними посередниками існують складні зв'язки (Kolupaev, Karpets, 2014). З одного боку, стан кальцієвих каналів (як потенціал-залежних, так і механочутливих) залежить від вмісту АФК (Mori, Schroeder, 2004; Sagi, Fluhr, 2006; Demidchik, Maathuis, 2007). З іншого, АФК-генеруючі ферменти, перш за все НАДФН-оксидаза, можуть активуватися кальцієм (Oda et al., 2010; Karpets et al., 2012). Однак функціональна взаємодія між АФК та іонами кальцію при реалізації ефектів поліамінів на рослинні клітини вивчена поки дуже слабо. Тим більше залишається відкритим питання про роль таких взаємодій в реалізації стрес-протекторних ефектів поліамінів.

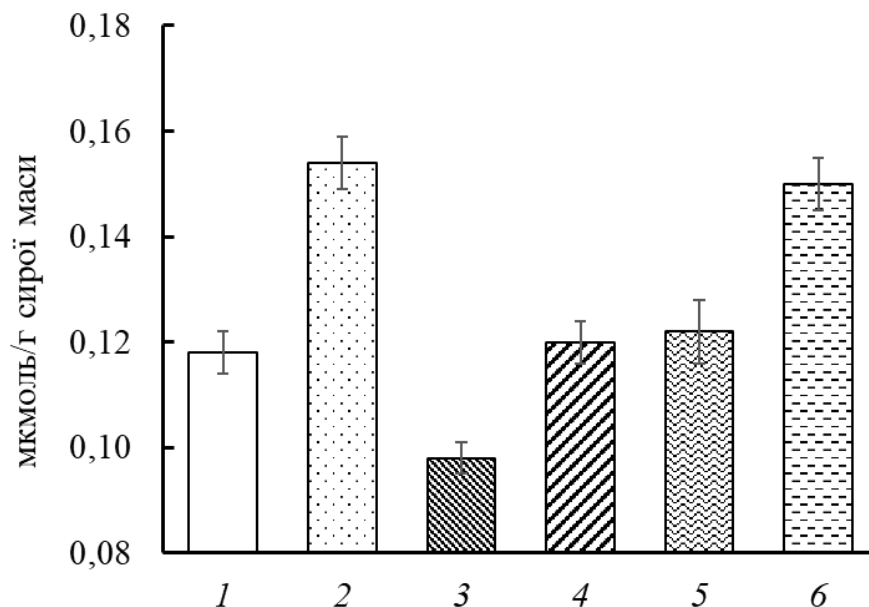


Рис. 3.14. Вміст пероксиду водню (мкмоль/г сирової речовини) в коренях проростків пшениці при обробці путресцином і антагоністами кальцію. 1 – контроль; 2 – путресцин (1 мМ); 3 – ЕГТА (500 мкМ); 4 – путресцин (1 мМ) + ЕГТА (500 мкМ); 5 – неоміцин (200 мкМ); 6 – путресцин (1 мМ) + неоміцин (200 мкМ).

Зважаючи на це, досліджували інгібторним методом участь різних пулів кальцію в регуляції утворення пероксиду водню, активності антиоксидантних

ферментів та індукуванні теплостійкості проростків пшениці путресцином. Як хелатор позаклітинного кальцію використовували ЕГТА, а як інгібітор залежного від фосфоліпази С надходження кальцію в цитозоль з внутрішньоклітинних компартментів – неоміцин.

Обробка коренів проростків хелатором позаклітинного кальцію ЕГТА сама по собі викликала невелике, але вірогідне при $p \leq 0,05$ зниження вмісту H_2O_2 в коренях. При комбінованій обробці ЕГТА і путресцином кількість пероксиду водню в коренях не відрізнялася від величини контролю. Іншими словами, обробка ЕГТА усувала ефект підвищення вмісту H_2O_2 в тканинах коренів, спричинюваний дією путресцину (рис. 3.14). Під впливом іншого антагоніста кальцію – неоміцину – кількість пероксиду водню в коренях не змінювалася. Цей інгібітор надходження кальцію в цитозоль з внутрішньоклітинних компартментів не усував і підвищення вмісту H_2O_2 в коренях в присутності путресцину. Таким чином, посилення утворення пероксиду водню в коренях, що відбувається при їх обробці путресцином, залежало в основному від надходження кальцію в цитозоль з позаклітинного простору.

Для оцінки залежності індукування антиоксидантних ферментів путресцином від кальцієвого гомеостазу вивчали вплив антагоністів Ca^{2+} на величини їх активності через 24 год після початку обробки путресцином або через 26 год впливу антагоністів кальцію. Обробка коренів ЕГТА істотно не впливала на величини активності СОД, каталази і гваяколпероксидази (рис. 3.15). У той же час хелатор іонів кальцію повністю усував спричинюваний путресцином ефект підвищення активності всіх трьох досліджуваних ферментів.

Обробка проростків неоміцином сама по собі істотно не впливала на активність СОД, каталази і гваяколпероксидази. Цей інгібітор майже не впливав і на прояв ефекту підвищення активності СОД, спричинюваного путресцином (рис. 3.15, А). Однак неоміцин практично повністю нівелював

спричинюване пупресцином підвищення активності каталази і гваяколпероксидази.

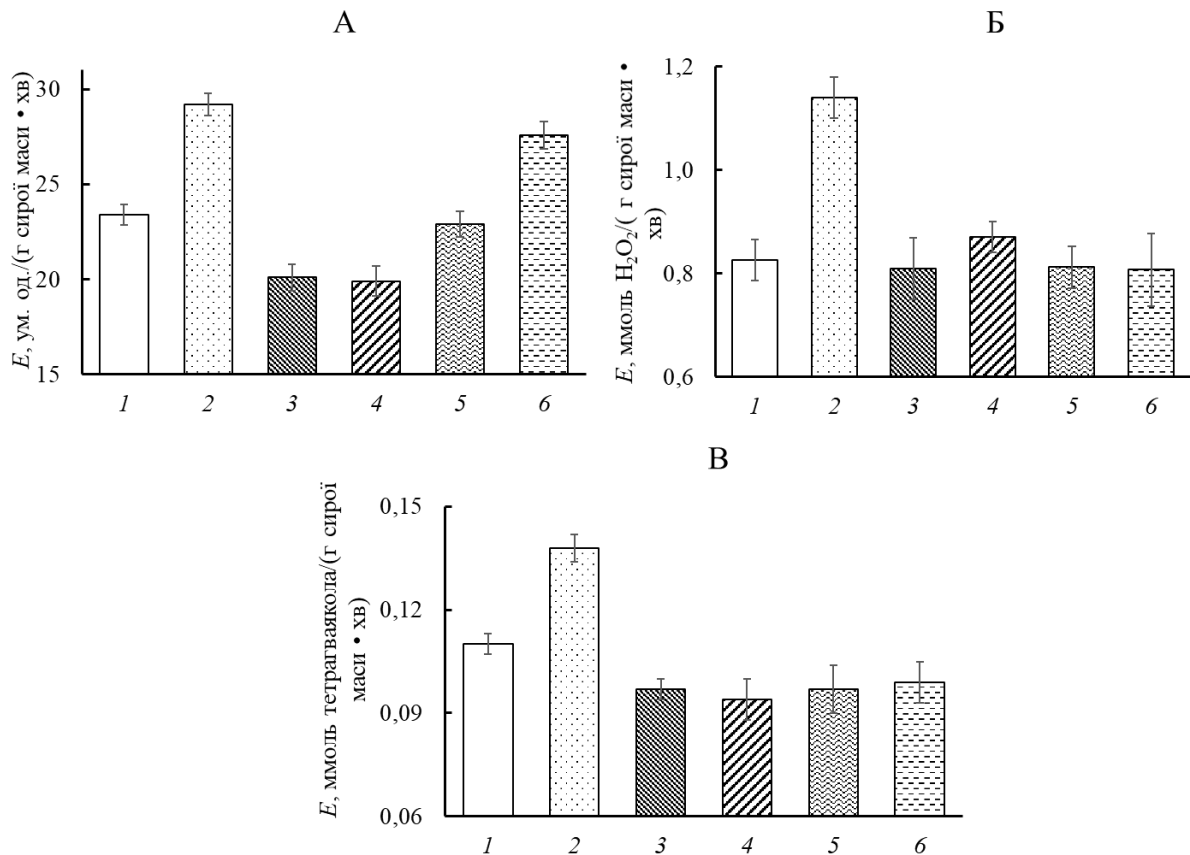


Рис. 3.15. Активність СОД (А), каталази (Б) і гваяколпероксидази (В) в коренях проростків пшениці при обробці пупресцином і антагоністами кальцію. 1 – контроль; 2 – пупресцин (1 мМ); 3 – ЕГТА (500 мкМ); 4 – пупресцин (1 мМ) + ЕГТА (500 мкМ); 5 – неоміцин (200 мкМ); 6 – пупресцин (1 мМ) + неоміцин (200 мкМ).

Дія на проростки теплового стресу викликала підвищення виходу з клітин коренів речовин, що поглинають в області УФ-В, майже на 60% (рис. 3.16, А). Обробка пупресцином сприяла збереженню цілісності біомембран. Під впливом антагоністів кальцію ЕГТА і неоміцину відзначалася тенденція до посилення ушкоджень мембран, хоча цей ефект не був вірогідним при $p \leq 0,05$. При цьому як ЕГТА, так і неоміцин, нівелювали ефект зниження виходу речовин, що поглинають в УФ-В, спричинюваний обробкою проростків пупресцином.

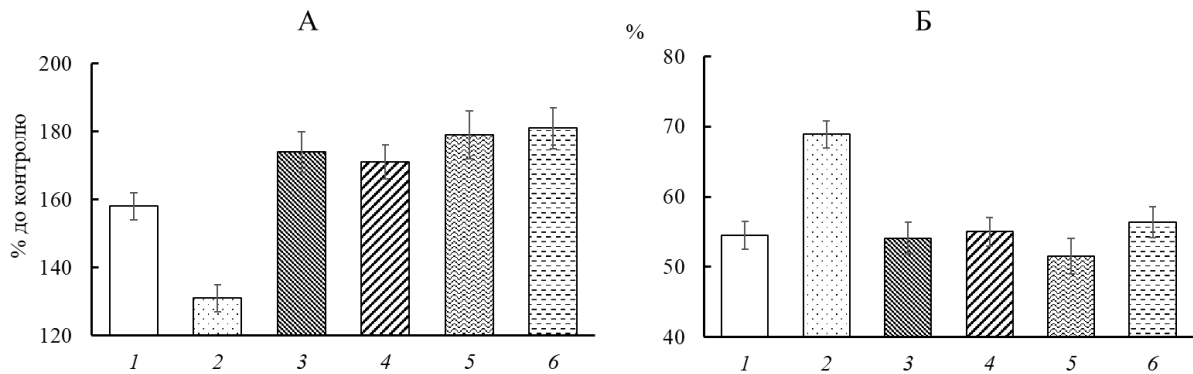


Рис. 3.16. Вихід речовин, поглинаючих в УФ-області спектра, з коренів проростків пшениці (А) і виживаність проростків (Б) після ушкоджуючого прогріву. 1 – контроль; 2 – путресцин (1 мМ); 3 – ЕГТА (500 мкМ); 4 – путресцин (1 мМ) + ЕГТА (500 мкМ); 5 – неоміцин (200 мкМ); 6 – путресцин (1 мМ) + неоміцин (200 мкМ).

Антагоністи кальцію самі по собі в умовах наших експериментів практично не впливали на теплостійкість проростків пшениці (рис. 3.16, Б). Однак вони практично повністю знімали ефект підвищення виживаності проростків після стресу, спричинюваний обробкою путресцином. Таким чином, обидва антагоністи кальцію (ЕГТА і неоміцин) усували позитивний вплив путресцину на стан мембран і виживаність проростків після теплового стресу.

Отже, отримані результати свідчать про участь кальцію як сигнального посередника в реалізації протекторної дії путресцину на проростки пшениці при тепловому стресі. Ймовірно, іони Ca^{2+} задіяні в процесі посилення утворення пероксиду водню, спричинюваного обробкою коренів путресцином, і формуванні АФК-сигналу. Про це свідчить усунення індукованого путресцином підвищення вмісту H_2O_2 хелатор кальцію ЕГТА (рис. 3.14). Примітно, що інший антагоніст кальцію – неоміцин, який, пригнічуючи фосфоліпазу С, зменшує надходження кальцію в цитозоль з внутрішньоклітинних компартментів (Liu et al., 2006), не впливав на ефект підвищення вмісту пероксиду водню в коренях при обробці путресцином.

У літературі є нечисленні і досить неоднозначні відомості про вплив поліамінів, в тому числі путресцину, на кальцієвий гомеостаз. Так, показано, що цей поліамін може активувати Ca^{2+} -насоси плазмалеми і тим самим посилювати вихід кальцію з цитозолу в позаклітинний простір (Pottosin et al., 2014). З іншого боку, активація ДАО і ПАО екзогенними поліамінами призводить до посилення утворення АФК за рахунок окиснення поліамінів (Pottosin, Shabala, 2014). При цьому пероксид водню і утворюваний в результаті неферментативних реакцій гідроксильний радикал можуть сприяти відкриванню неселективних кальцієвих каналів і надходженню кальцію в цитозоль.

Вплив кальцію на активність ДАО у рослин досліджено слабо. Хоча в коренях і пагонах проростків гороху зареєстровано підвищення її активності при обробці екзогенним Ca^{2+} (10 мМ) (Piterková et al., 2012). Схожі ефекти під впливом екзогенного кальцію виявлені і у сім'ядольних листків сої (Guo et al., 2012), проростків кінських бобів (Yang et al., 2011), клітин коренеплодів моркви (Wang et al., 2019). ДАО, що генерує пероксид водню, локалізована в клітинних стінках (Sharova, Medvedev, 2017). Не виключено, що в її активації задіяний кальцій, який потрапляє в апопласт при активації путресцином його виходу з клітин (Pottosin et al., 2014). Крім того, відома здатність поліамінів витіснити кальцій з його комплексів з пектиновими речовинами клітинних стінок (Messiaen, Van Cutsem, 1999). Проте, можливість прямої активації ДАО кальцієм поки не доведена.

Іншим джерелом АФК, що генеруються при обробці коренів проростків пшениці путресцином, очевидно, є НАДФН-оксидаза. На це вказує істотне пригнічення спричинюваного путресцином збільшення вмісту H_2O_2 в тканинах коренів під дією імідазолу – інгібітору НАДФН-оксидази (див. рис. 3.5). Цілком ймовірно, що відкривання частини кальцієвих каналів під впливом АФК, що утворюються внаслідок окиснення путресцину діаміноксидазою, може призводити до активації НАДФН-оксидази. Як відомо, НАДФН-оксидаза може безпосередньо активуватися іонами кальцію при їх приєднанні до

кальційзв'язувальних доменів, локалізованих на цитозольному боці білка (Oda et al., 2010; Glyan'ko, Ischenko, 2010). Показаний ефект активації залежної від НАДФН-оксидази генерації супероксидного аніон-радикала клітинами колеоптилів пшениці при їх обробці кальцієвим іонофором A23187 (Karpets et al., 2012). Оскільки підвищення вмісту пероксиду водню в коренях під впливом путресцину розвивається в часі поступово, можна припустити участь в цьому процесі двох ферментів – ДАО і НАДФН-оксидази. В цілому, отримані результати свідчать, принаймні, про залежність процесу посилення генерації АФК під впливом путресцину від кальцієвого гомеостазу.

Напевно кальцій задіяний і в наступних процесах підвищення активності антиоксидантних ферментів у відповідь на обробку путресцином (рис. 3.16). Примітно, що спричинюване екзогенним путресцином підвищення активності СОД повністю усувалося ЕГТА, але не неоміцином. Ймовірно, цей процес залежить в основному від надходження кальцію з позаклітинного простору. У той же час путресцин-індуковане підвищення активності двох інших антиоксидантних ферментів – каталази і гваяколпероксидази – пригнічувалося не тільки ЕГТА, а й неоміцином, що вказує на залежність цього процесу від надходження кальцію в цитозоль з внутрішньоклітинних компартментів.

Нарешті, зміна інтегральних показників (стабільності біомембран і виживаності проростків після ушкоджуючого прогріву), спричинювана екзогенним путресцином, також залежить від надходження кальцію в цитозоль, до того ж як з позаклітинного простору, так і з внутрішніх компартментів. На це вказує практично повне нівелювання протекторних ефектів путресцину як ЕГТА, так і неоміцином (рис. 3.16). Слід зазначити, що феномен підвищення стабільності біомембран при тепловому стресі під впливом екзогенного путресцину узгоджується з результатами роботи (Asthir et al., 2018), в якій показано підвищення вмісту низькомолекулярних антиоксидантів в коренях і зниження в стресових умовах кількості продукту ПОЛ МДА.

Отже, індукування теплостійкості проростків пшениці путресцином залежить від функціональної взаємодії між іонами кальцію і АФК як сигнальними посередниками.

3.2.3. Оксид азоту.

Крім АФК та іонів кальцію, ще одним сигнальним посередником, залученим в реалізацію дії поліамінів, є оксид азоту. Показано підвищення його вмісту в проростках арабідопсису (Tun et al., 2006) і калусній культурі сої (Yang et al., 2014) за дії екзогенних поліамінів. Однак механізми посилення генерації NO рослинами під впливом поліамінів поки вивчені дуже слабо. Як уже зазначалося, припускають, що NO може утворюватися при їх деградації за участю ді- і поліаміноксидаз (Wimalasekera et al., 2011). З іншого боку, показана здатність екзогенних путресцину, сперміну і спермідину пригнічувати активність нітратредуктази (НР) у листках пшениці (Rosales et al., 2012).

Зважаючи на це, було поставлено завдання дослідити вплив путресцину на синтез оксиду азоту окиснювальним і відновним шляхами і можливу участь NO в розвитку теплостійкості проростків, індукованої обробкою цим діаміном. Також досліджували вплив кальцієвого гомеостазу на синтез NO в коренях проростків і можливі зв'язки між змінами вмісту NO і пероксиду водню за дії путресцину.

Обробка проростків пшениці путресцином викликала значне підвищення вмісту оксиду азоту в коренях вже через 0,5 год після її початку (рис. 3.17). Через 1 год кількість NO в варіанті з путресцин перевищувала відповідну величину контролю на 73%. Однак вже до 2 год інкубації в присутності путресцину вміст оксиду азоту в коренях проростків дослідного варіанта помітно знижувався, а через 4 і 24 год не відрізнявся від контролю.

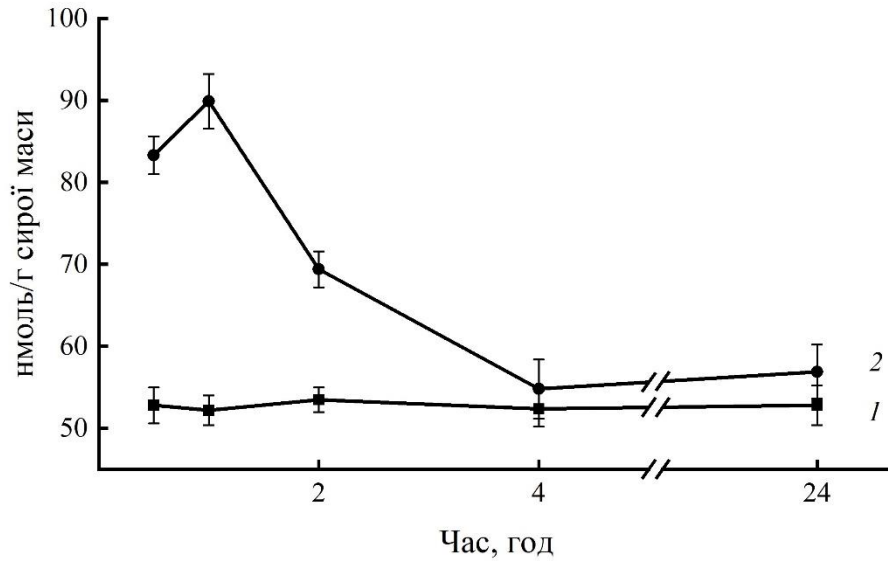


Рис. 3.17. Динаміка вмісту оксиду азоту (нмоль/г сирої речовини) в коренях проростків пшениці при дії путресцину. 1 – контроль; 2 – путресцин (1 мМ).

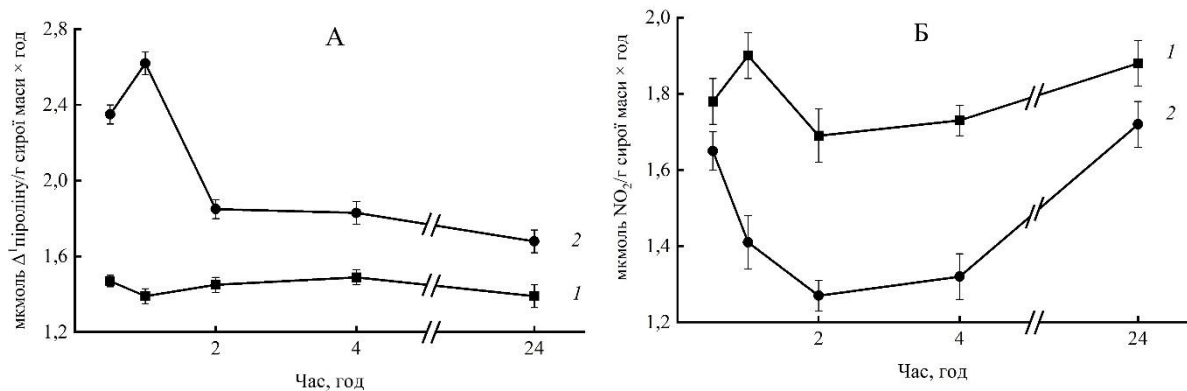


Рис. 3.18. Динаміка активності ДАО (А, мкмоль Δ^1 піроліну/г сирої речовини \times год) і НР (Б, мкмоль NO_2 /г сирої речовини \times год) в коренях проростків пшениці при дії путресцина. 1 - контроль; 2 - путресцин (1 мМ).

Одним з можливих ферментів, задіяних в синтезі NO окислювальним шляхом, вважається ДАО (Wimalasekera et al., 2011). Додавання путресцину в середовище призводило до швидкого збільшення активності ДАО в коренях проростків (рис 3.187, А), помітний ефект спостерігався вже через 15 хв дії поліаміну. Максимальні значення активності ферменту, які перевищували величини контролю майже в 2 рази, спостерігалися через 1 год після початку

обробки проростків путресцином. Надалі активність ДАО в коренях дослідного варіанта поступово знижувалася, проте і через 24 год дещо перевищувала аналогічний показник в контролі.

Основним ферментом, який може каталізувати утворення NO за відновним шляхом, розглядається HP (Mur et al., 2013). Однак обробка проростків путресцином викликала зниження активності HP (рис. 3.18, Б). Помітний ефект відзначався через 1-4 год після початку інкубації на середовищі з додаванням поліаміну, а через 24 год значення активності ферменту наближалися до величин контролю.

Обробка проростків інгібітором ДАО аміногуанідином зменшувала активність ферменту і повністю нівелювала її підвищення, спричинюване путресцином (рис. 3.18, А). Оскільки, як зазначалося, оксид азоту, АФК та іони кальцію перебувають у тісних функціональних зв'язках один з одним (Glyan'ko et al., 2012), досліджували вплив скавенджера пероксиду водню ДМТС і кальцієвих антагоністів на активність ДАО в коренях проростків пшениці, оброблених путресцином. Встановлено, що обробка ДМТС лише незначно зменшувала спричинюване путресцином підвищення активності ДАО (рис. 3.18, А). У той же час під впливом як ЕГТА, так і неоміцину, відзначалося повне усунення індукованого путресцином підвищення активності ДАО (рис. 3.18, А).

Характер зміни вмісту NO в коренях проростків пшениці під впливом досліджуваних модуляторів збігався з таким для ДАО. Виявлено, що обробка проростків аміногуанідином, що інгібує ДАО і NO-синтазу (ферменти окислювального шляху синтезу NO), викликала зменшення вмісту оксиду азоту в коренях (рис. 3.19). При комбінованій дії на проростки путресцину і аміногуанідину цей інгібітор повністю усував підвищення вмісту NO, спричинюване дією діаміну. Обробка проростків інгібітором HP вольфраматом натрію майже не впливала на кількість оксиду азоту в коренях і дуже слабо зменшувала спричинюваний путресцином ефект посилення генерації NO клітинами коренів (рис. 3.189).

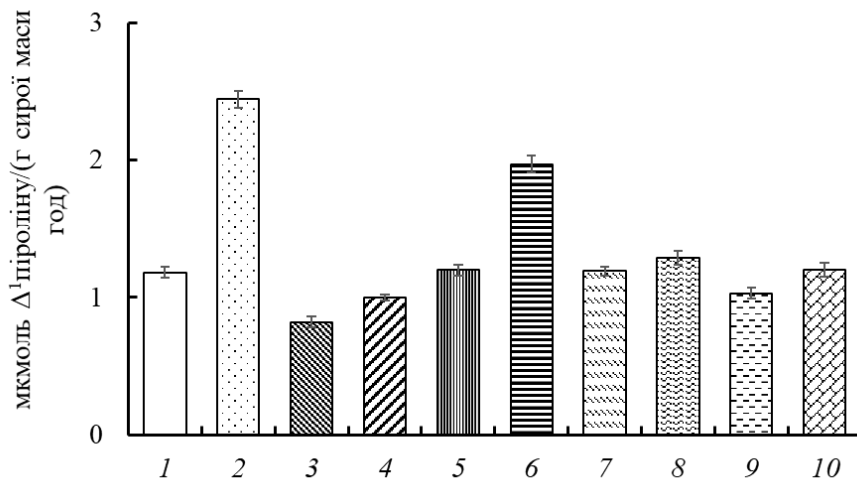


Рис. 3.19. Активність ДАО (мкмоль Δ^1 піроліну/г сирової речовини \times год) в коренях проростків пшениці при дії путресцину, аміногуанідину, ДМТС і модуляторів кальцієвого гомеостазу. 1 – контроль; 2 – путресцин (1 мМ); 3 – аміногуанідин (1 мМ); 4 – путресцин (1 мМ) + аміногуанідин (1 мМ); 5 – ДМТС (0,15 мМ); 6 – путресцин (1 мМ) + ДМТС (0,15 мМ); 7 – ЕГТА (0,5 мМ); 8 – путресцин (1 мМ) + ЕГТА (0,5 мМ); 9 – неоміцин (0,2 мМ); 10 – путресцин (1 мМ) + неоміцин (0,2 мМ).

Примітка. Активність ДАО визначали через 1 год після початку інкубації проростків на середовищі з путресцином та/або через 3 год після початку обробки іншими сполуками.

Антагоністи кальцію ЕГТА і неоміцин самі по собі практично не впливали на вміст оксиду азоту в коренях, проте повністю усували ефект збільшення кількості NO в коренях в присутності путресцину (рис. 3.20).

Антиоксидант ДМТС не впливав на вміст оксиду азоту в коренях і лише частково знімав спричинюване путресцином підвищення кількості NO в коренях (рис. 3.20). У той же час під впливом скавенджера оксиду азоту РТЮ відбувалося практично повне усунення ефекту підвищення вмісту пероксиду водню в коренях проростків в присутності путресцину (рис. 3.21). У варіанті з обробкою коренів тільки РТЮ вміст H_2O_2 майже не відрізнявся від контролю.

Таким чином, спричинюване путресцином підвищення вмісту пероксиду водню в коренях залежало від їх NO-статусу.

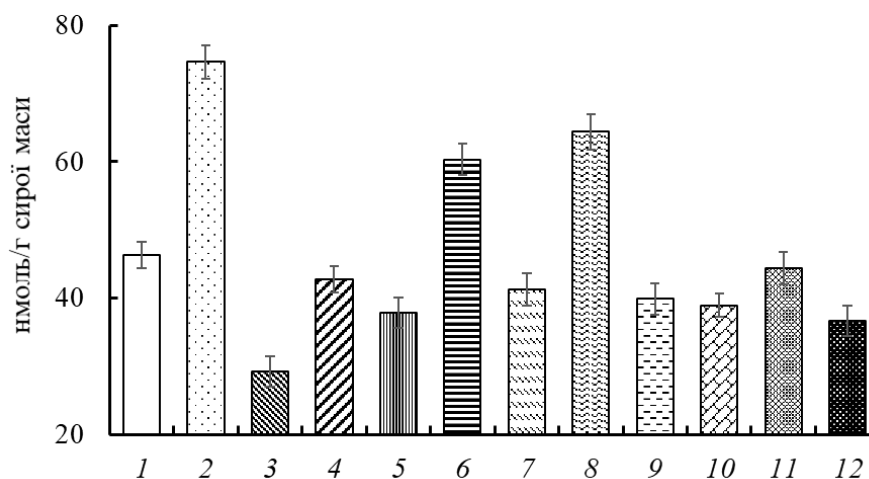


Рис. 3.20. Вміст оксиду азоту (нмоль/г сирової речовини) в коренях проростків пшениці при дії путресцину, аміногуанідину, вольфрамату натрію, ДМТС і модуляторів кальцієвого гомеостазу. 1 – контроль; 2 – путресцин (1 мМ); 3 – аміногуанідин (1 мМ); 4 – путресцин (1 мМ) + аміногуанідин (1 мМ); 5 – вольфрамат натрію (2 мМ); 6 – путресцин (1 мМ) + вольфрамат натрію (2 мМ); 7 – ДМТС (0,15 мМ); 8 – путресцин (1 мМ) + ДМТС (0,15 мМ); 9 – ЕГТА (0,5 мМ); 10 – путресцин (1 мМ) + ЕГТА (0,5 мМ); 11 – неоміцин (0,2 мМ); 12 – путресцин (1 мМ) + неоміцин (0,2 мМ).

Примітка. Вміст NO визначали через 1 год після початку інкубації проростків на середовищі з путресцином та/або через 3 год після початку обробки іншими сполуками.

Обробка РТЮ не впливала на рівень ПОЛ і теплостійкість, але повністю знімала захисні ефекти путресцину (рис. 3.22).

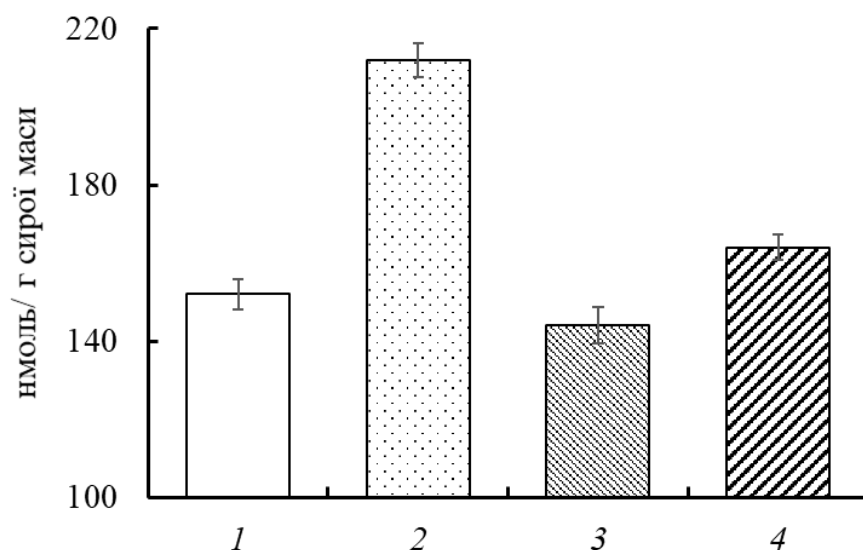


Рис. 3.21. Вміст пероксиду водню (нмоль/ г сирової речовини) в коренях проростків пшениці за дії путресцину і РТІО. 1 – контроль; 2 – путресцин (1 мМ); 3 – РТІО (0,1 мМ); 4 – путресцин (1 мМ) + РТІО (0,1 мМ).

Примітка. Вміст H_2O_2 визначали через 2 год після початку інкубації проростків на середовищі з путресцином та/або через 4 год після початку обробки РТІО.

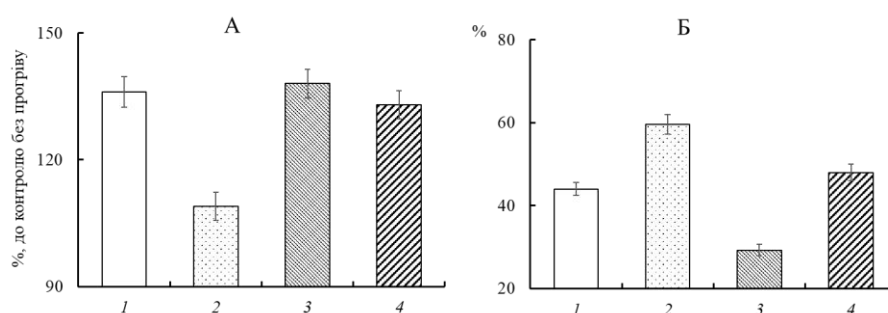


Рис. 3.22. Вміст МДА (% до контролю без прогріву) в коренях (А) і виживаність проростків пшениці (Б) після ушкоджуючого прогріву: 1 - контроль; 2 - путресцин (1 мМ); 3 - РТІО (0.1 мМ); 4 - путресцин (1 мМ) + РТІО (0.1 мМ).

Таким чином, отримані результати свідчать про участь NO як сигнального посередника в розвитку теплостійкості проростків пшениці під

впливом екзогенного путресцину. На це вказує транзиторне збільшення вмісту оксиду азоту в коренях при їх інкубації в присутності путресцину і усунення його стрес-протекторної дії скавенджером NO РТІО. Є підстави вважати, що однією з основних причин підвищення вмісту NO в клітинах коренів в присутності путресцину є збільшення активності ДАО, яке було особливо помітним протягом першої години після початку впливу діаміну. Механізм утворення NO в клітинах рослин під впливом ДАО залишається невідомим (Pal et al., 2015). Однак цей фермент розглядається як одна зі складових ферментативної системи синтезу оксиду азоту в рослинних клітинах (Wimalasekera et al., 2011).

Іншим важливим учасником сигнальної мережі, задіяної в реалізації ефектів екзогенних поліамінів, є пероксид водню. Як зазначалося, при обробці проростків скавенджером H_2O_2 ДМТС не відбувалося активації антиоксидантних ферментів (СОД, каталази і гваяколпероксидази), спричинюваної путресцином (див. рис. 3.8).

Водночас спричинюване путресцином посилення синтезу пероксиду водню значною мірою залежало від наявності в клітинах оксиду азоту і пригнічувалося його скавенджером РТІО (рис. 3.21). З іншого боку, утворення NO, що посилюється при обробці проростків путресцином, лише частково зменшувалося в присутності скавенджера пероксиду водню ДМТС. Динаміка збільшення вмісту NO і H_2O_2 в коренях проростків пшениці була схожою. Підвищена кількість обох посередників відзначалася протягом перших двох годин після початку інкубації коренів в присутності путресцину. Однак максимум вмісту NO був зареєстрований через 1 год (рис. 3.17), а пероксиду водню – через 2 години після початку впливу путресцину (див. рис. 3.4). Можна вважати, що утворення двох посередників взаємозалежне, але не виключено, що оксид азоту в сигнальному шляху все ж міститься вище від пероксиду водню. H_2O_2 може бути продуктом реакції окиснення путресцину під дією ДАО. Можливо, що при обробці коренів путресцином спочатку відбувалася активація ДАО, за рахунок якої формується початковий, необхідний для

запуску сигнальних процесів пул пероксиду водню. У початковий період такого впливу, посилювалася і генерація NO. Не виключено, що підтримання досить великого пулу H_2O_2 за дії путресцину в подальшому може бути зумовлено підвищенням активності НАДФН-оксидази. Відомо, що активність цього ферменту може зростати під впливом NO (Tewari et al., 2008), причому такий ефект може бути опосередкований NO-індукованим зміною концентрації кальцію в цитозолі (Kolupaev, Karpets, 2014).

Отже, отримані результати дозволяють припустити, що найбільш ранніми процесами, які розвиваються за дії путресцину на клітини коренів, є зміни кальцієвого гомеостазу і пов'язана з ними активація ДАО. За участю ДАО відбувається синтез пероксиду водню та оксиду азоту. Ці посередники також можуть реалізувати свої сигнальні ефекти за участю кальцію. Є підстави вважати, що активація сигнальних каскадів, головними компонентами яких є Ca^{2+} , NO і АФК, індукує протекторні системи, що забезпечують розвиток теплостійкості.

3.2.4. Сірководень.

Поряд з оксидом азоту у рослинних клітинах функції газотрансмітера виконує сірководень – H_2S (Kolupaev et al., 2019). Його роль як сигнального посередника досліджена значно слабше порівняно з NO. Проте останніми роками накопичуються відомості про роль H_2S в реалізації ефектів фітогормонів та інших фізіологічних сполук. У роботі Li і співавт. (2016) вперше отримані дані, що вказують на роль сірководню в реалізації протекторної дії путресцину на рослини ячменю в умовах опромінення УФ-В. Обробка рослин путресцином, що зменшує пошкодження, спричинювані дією УФ-В, приводила до підвищення в листках вмісту сірководню. При цьому захисний вплив путресцину, що виявлявся в підвищенні активності антиоксидантних ферментів і зменшенні окиснювальних пошкоджень, усувався обробкою рослин скавенджером H_2S гіпотаурином (Li et al., 2016). Цей факт є

по суті єдиним, що вказує на роль сірководню як посередника в реалізації стрес-протекторної дії путресцину на листки рослин. Можлива роль H_2S в генерації путресцином сигналів, що індукують стійкість рослин до інших стрес-факторів і формуються в інших органах (зокрема, в коренях), на момент виконання нашої роботи залишалася не дослідженою. Зважаючи на це, досліджували роль сірководню в процесі індукування путресцином антиоксидантної системи коренів і теплостійкості проростків пшениці.

Вміст сірководню в коренях проростків контрольного варіанта протягом 24 год експерименту достовірно не змінювався (рис. 3.23). Через 1 год після початку їх обробки путресцином відбувалося помітне збільшення вмісту H_2S в коренях. Протягом наступної години інкубації цей ефект посилювався, а через 4 год істотно зменшувався. До 24 год спостережень вміст сірководню в коренях проростків в варіанті з обробкою путресцином незначно перевищував величини контролю (рис. 3.23). Таким чином, обробка проростків путресцином викликала транзиторне збільшення вмісту H_2S в коренях з максимумом через 2 години після її початку.

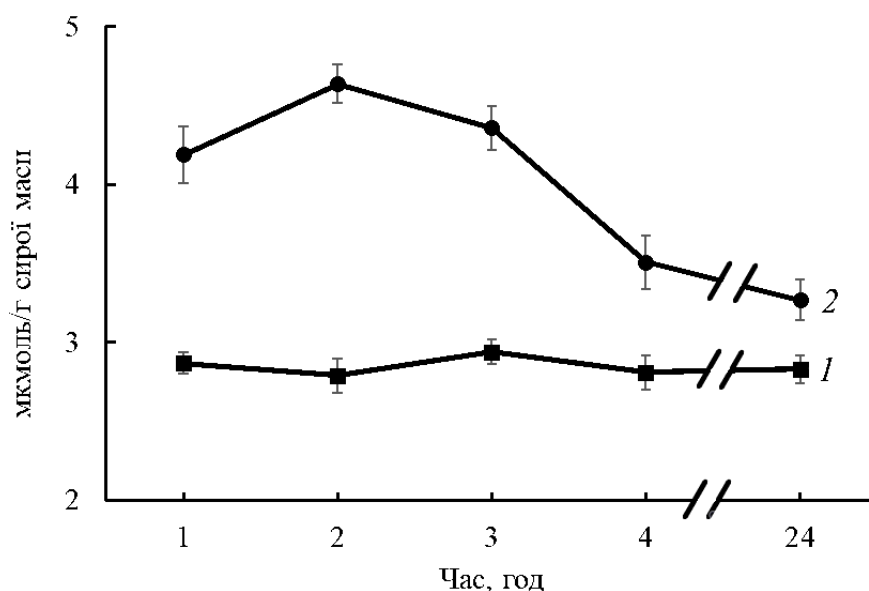


Рис. 3.23. Динаміка вмісту сірководню в коренях проростків пшениці при обробці путресцином. 1 – контроль; 2 – путресцин (1 мМ).

Інкубація проростків на розчинах путресцину і донора сірководню гідросульфіді натрію підвищувала їх виживаність після ушкоджуючого прогріву (рис. 3.24). Обробка проростків піруватом калію – інгібітором L-цистеїндесульфгідрази (ключового ферменту синтезу сірководню) сама по собі не чинила істотного впливу на їх теплостійкість. У той же час за комбінованої обробки з путресцином піруват зменшував, однак не знімав повною мірою його стрес-протекторний ефект (рис. 3.24). При комбінованій обробці проростків путресцином і гідросульфідом натрію відзначалася тенденція до посилення їх захисних ефектів. Хоча відмінності щодо варіантів з окремим використанням путресцину і NaHS були значимими тільки при $p \leq 0,1$.

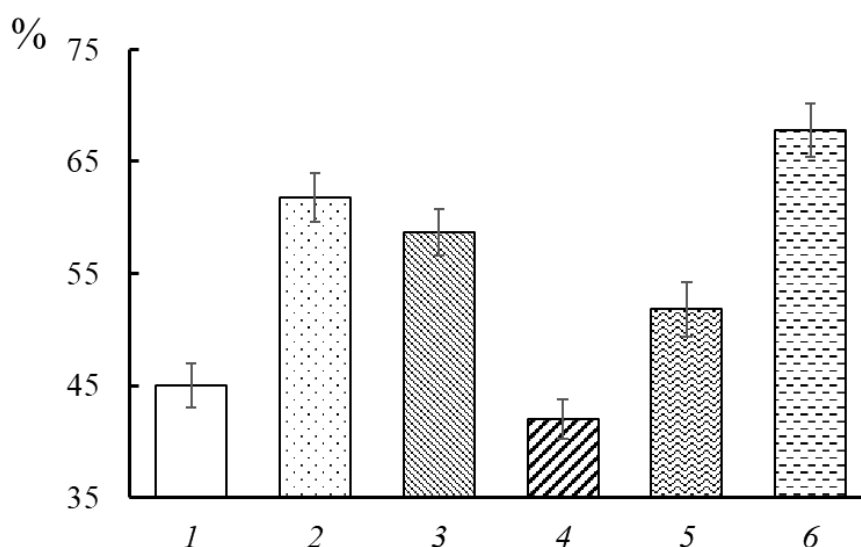


Рис. 3.24. Виживаність проростків пшениці (%) після 10 хв прогріву при 45°C за впливу путресцину, гідросульфіді натрію, пірувату калію і комбінацій зазначених сполук. 1 – контроль; 2 – путресцин (1 мМ); 3 – NaHS (0,1 мМ); 4 – піруват калію (0,3 мМ); 5 – путресцин (1 мМ) + піруват калію (0,3 мМ); 6 – путресцин (1 мМ) + NaHS (0,1 мМ).

Протягом першої доби після прогріву пошкодження проростків не візуалізувалися, тобто всі проростки залишалися живими, що дозволило проаналізувати вміст продукту ПОЛ МДА. Під впливом прогріву його кількість

в коренях проростків збільшувалася (рис. 3.25). Обробка путресцином, донором сірководню та їх комбінацією значною мірою пом'якшувала прояв ефекту окиснювального стресу. У варіанті з піруватом відзначалася тенденція до посилення накопичення МДА в коренях після прогріву проростків, а при комбінованій обробці піруватом і путресцином прояв антиоксидантної дії останнього помітно зменшувався (рис. 3.25).

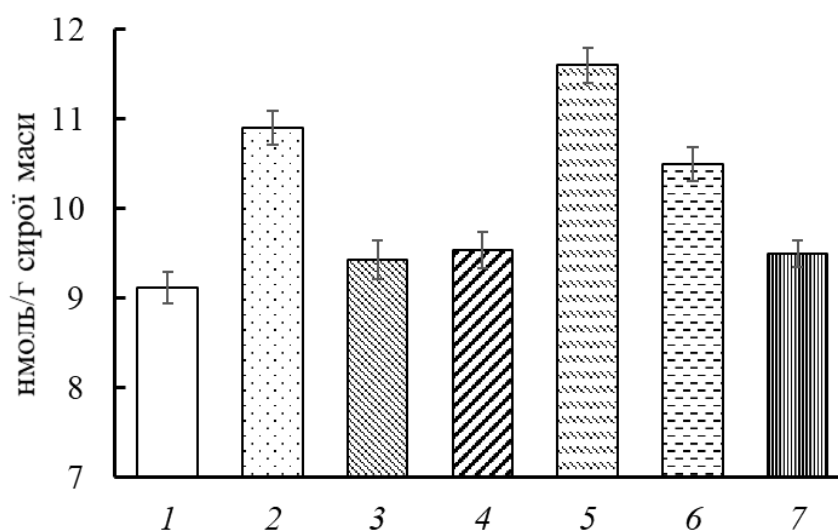


Рис. 3.25. Вміст МДА в коренях проростків пшениці, оброблених путресцином, гідросульфідом натрію, піруватом калію і комбінаціями зазначених сполук через 24 год після 10 хв прогріву при 45°C. 1 – контроль (без прогріву); 2 – прогрів; 3 – прогрів + путресцин (1 мМ); 4 – прогрів + NaHS (0,1 мМ); 5 – прогрів + піруват калію (0,3 мМ); 6 – прогрів + путресцин (1 мМ) + піруват калію (0,3 мМ); 7 – прогрів + путресцин (1 мМ) + NaHS (0,1 мМ).

Інкубація проростків на розчинах путресцину і донора сірководню сприяла підвищенню активності СОД в коренях (рис. 3.26, А). У варіанті з обробкою піруватом калію, навпаки, відзначалася тенденція до її зниження. При цьому обробка проростків інгібітором L-цистеїндесульфгідрази повністю усувала ефект підвищення активності СОД в коренях, спричинюваний путресцином. У варіанті з комбінованим впливом путресцину і NaHS

активність ферменту вірогідно не відрізнялася від величин, які спостерігалися при обробці зазначеними сполуками окремо.

Під впливом прогріву виявлялася тенденція до збільшення активності СОД в коренях проростків контрольного варіанта (рис. 3.26, А). У коренях проростків, оброблених путресцином і NaHS , підвищення активності ферменту після прогріву було більш істотним. Ще більші значення активності СОД після прогріву спостерігалися у варіанті з комбінованою дією путресцину і донора сірководню. У той же час у варіанті з інгібітором L-цистеїндисульфгідрази підвищення активності ферменту після прогріву проростків не відбувалося. При комбінованій обробці проростків путресцином та піруватом останній на тлі впливу теплового стресу частково усував підвищення активності СОД, спричинюване путресцином (рис. 3.26, А).

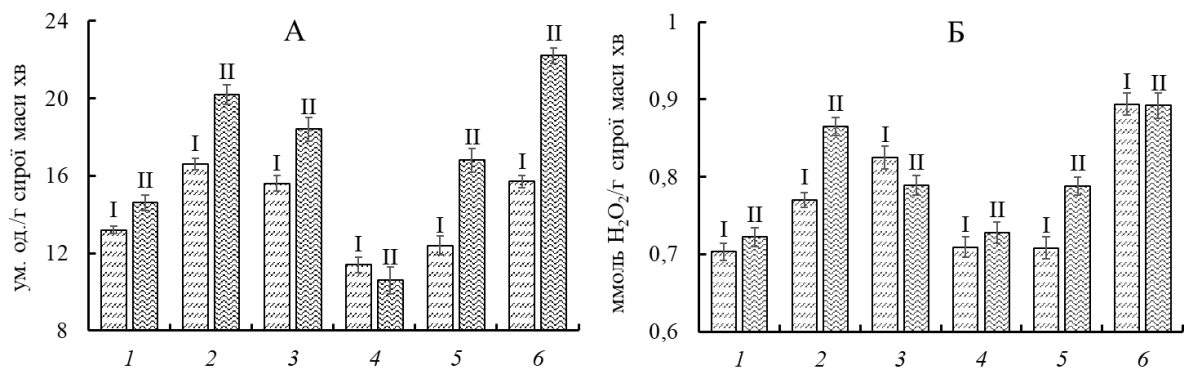


Рис. 3.26. Активність СОД (А) і каталази (Б) в коренях проростків пшениці за впливу путресцину, гідросульфїду натрію, пірувату калію і комбінацій зазначених сполук. I - до стресового впливу; II - через 2 год після 10 хв прогріву при 45°C . 1 – контроль; 2 – путресцин (1 мМ); 3 – NaHS (0,1 мМ); 4 – піруват калію (0,3 мМ); 5 – путресцин (1 мМ) + піруват калію (0,3 мМ); 6 – путресцин (1 мМ) + NaHS (0,1 мМ).

Активність каталази в коренях проростків пшениці під впливом путресцину і донора сірководню підвищувалася (рис. 3.26, Б). Ще більш помітним її підвищення було у варіанті з комбінованою дією путресцину і

NaHS. Обробка піруватом калію сама по собі істотно не впливала на активність ферменту, але повністю усувала її підвищення, яке відбувалося під дією путресцину.

Тепловий стрес майже не впливав на активність каталази в коренях проростків контрольного варіанта (рис. 3.26, Б). У варіанті з впливом путресцину після прогріву активність ферменту підвищувалася. У той же час в коренях проростків, оброблених донором сірководню, а також сумішшю путресцину і NaHS, активність каталази після стресового впливу істотно не змінювалася. Не відбувалося зміни активності ферменту і в коренях проростків, оброблених піруватом калію. При цьому інгібітор L-цистеїндесульфгідрази усував спричинюване путресцином підвищення активності каталази в коренях проростків, що зазнали впливу теплового стресу (рис. 3.26, Б).

Отже, в цілому, отримані результати свідчать про участь сірководню в індукваному путресцином розвитку теплостійкості проростків пшениці. Зокрема, зафіксовано підвищення вмісту сірководню в коренях під впливом обробки путресцином. Ефект збільшення активності L-цистеїндесульфгідрази і вмісту сірководню після 12-годинної обробки путресцином виявлений в листках молодих рослин ячменю (Li et al., 2016). Нами вперше досліджена динаміка вмісту сірководню в коренях при обробці путресцином. Виявлений транзиторний характер зміни кількості H_2S (рис. 3.23) може вказувати на його сигнальну роль. Слід зазначити, що відомостей про характер зміни вмісту сірководню в органах рослин при їх обробці стресовими метаболітами або фітогормонами поки дуже мало. Встановлено ефект монотонного підвищення вмісту сірководню в надземній частині проростків кукурудзи під впливом саліцилової кислоти при індукванні нею теплостійкості (Li et al., 2015). Збільшення вмісту сірководню і експресії гена L-цистеїндесульфгідрази спостерігалося після 6-годинної обробки ізольованих листків арабідопсису АБК (Shi et al., 2015). У зазначених роботах спричинюване путресцином, саліциловою кислотою і АБК збільшення вмісту сірководню розглядають як складову трансдукції сигналу, що викликає підвищення стійкості рослинних

об'єктів до стресорів різної природи: УФ-В (Li et al., 2016), гіпертермії (Li et al., 2015), посухи, засолення і холоду (Shi et al., 2015).

Наші результати показали принаймні часткове усунення позитивного впливу путресцину на теплостійкість проростків пшениці при їх обробці інгібітором L-цистеїндесульфгідрази (рис. 3.24). Ці результати вказують на можливу роль сірководню як посередника в індукуванні теплостійкості проростків путресцином. У той же час не можна виключити наявності альтернативних, не пов'язаних з сірководнем, шляхів передачі сигналу путресцину. В роботі Li і співавт. (2016) показано усунення скавенджером сірководню гіпотаурином протекторної дії путресцину на рослини ячменю, піддані опроміненню УФ-В. Також у присутності скавенджера сірководню і інгібітору його синтезу частково пригнічувалася захисна дія саліцилової кислоти на проростки кукурудзи при тепловому стресі (Li et al., 2015).

Показаний синергічний позитивний вплив саліцилової кислоти і донора сірководню NaHS на проростки кукурудзи при тепловому стресі (Li, 2015). В наших експериментах виявлено лише тенденцію до посилення стрес-протекторної дії путресцину на проростки пшениці в присутності донора сірководню (рис. 3.24). Можливо, що в умовах використовуваної експериментальної моделі ключову роль відіграло індукування путресцином ендогенного синтезу сірководню, а не його надходження ззовні.

Однією з причин захисного впливу путресцину на проростки пшениці при тепловому стресі може бути запобігання ним вторинного окиснювального стресу. Про це свідчить зменшення накопичення МДА в коренях проростків, оброблених путресцином, після теплового стресу (рис. 3.25). Про участь сірководню в цьому процесі свідчить часткове нівелювання захисного ефекту путресцину при обробці рослин антагоністом сірководню піруватом.

У свою чергу можливою причиною підвищення стійкості проростків пшениці до вторинного окислювального стресу за дії путресцину може бути активація ферментативної антиоксидантної системи, зокрема, підвищення активності СОД і каталази (рис. 3.26). При цьому інгібітор синтезу H_2S піруват

принаймні частково нівелював індуковане путресцином підвищення активності антиоксидантних ферментів. Водночас за комбінованої дії путресцину і NaHS на проростки пшениці активність каталази підвищувалася більш істотно, ніж при обробці кожною сполукою окремо. Також на тлі теплового стресу відзначалось більш істотне підвищення активності СОД в коренях проростків пшениці при спільній дії путресцину і донора сірководню (рис. 3.26).

В цілому ж, є підстави вважати, що для реалізації фізіологічних ефектів путресцину має значення підвищення ендogenous вмісту сірководню як сигнального посередника.

Висновки до розділу 3

Діаміни путресцин, кадаверин та тетраамін спермін спричиняли істотне підвищення стійкості проростків пшениці до потенційно летального теплового стресу. Максимальне підвищення виживаності проростків після ушкоджуючого прогріву відзначалося при використанні поліамінів в концентрації 1 мМ. При цьому стрес-протекторна дія сперміну була дещо вищою, ніж ефекти діамінів.

Обробка всіма досліджуваними поліамінами пом'якшувала розвиток окиснювального стресу, спричинюваний прогрівом. При цьому відзначалося підвищення активності антиоксидантних ферментів СОД, каталази і гваяколпероксидази як в коренях, так і в пагонах проростків пшениці.

В реалізації стрес-протекторної дії поліамінів, ймовірно, задіяні ключові клітинні сигнальні посередники. Отримані нами результати вказують на участь АФК, іонів кальцію і газотрансмітерів (оксиду азоту і сірководню) в прояві фізіологічних ефектів поліамінів. Зокрема, встановлено, що під впливом як путресцину, так і кадаверину спостерігалось транзиторне збільшення в коренях вмісту пероксиду водню з максимумом через 2 год від початку обробки. Такий ефект не виявлявся за попередньої обробки коренів проростків антиоксидантом ДМТС та інгібітором ДАО аміногуанідином. Водночас обробка коренів інгібітором НАДФН-оксидази імідазолом частково усувала ефект підвищення

вмісту H_2O_2 , спричинюваний дією путресцину і практично не впливала на ефекти кадаверину. Ймовірно, за дії різних діамінів внесок різних ферментативних систем, що генерують АФК, відрізняється. Обробка проростків ДМТС і аміногуанідином усувала захисний вплив путресцину та кадаверину на проростки пшениці за умов гіпертермії. Водночас обробка інгібітором НАДФН-оксидази імідазолом знімала стрес-протекторний ефект путресцину, але слабо впливала на прояв такого ефекту кадаверину.

Антагоністи АФК (ДМТС, аміногуанідин, імідазол) усували спричинювані путресцином ефекти підвищення в коренях активності антиоксидантних ферментів (СОД, каталази і гваяколпероксидази). Водночас індуковане кадавериним підвищення активності СОД в коренях проростків пшениці не усувалося дією ДМТС, аміногуанідину та імідазолу. Проте підвищення активності каталази і гваяколпероксидази за дії кадаверину нівелювалося дією ДМТС. Отже, можна стверджувати, що вплив кадаверину на активність окремих ферментів антиоксидантної системи може здійснюватися без посередництва АФК.

З використанням антагоністів кальцію досліджували участь іонів Ca^{2+} в процесі індукції антиоксидантної системи і теплостійкості проростків пшениці екзогенним діаміном путресцином. Встановлено, що ефект посилення генерації АФК, спричинюваний путресцином, повністю усувався хелатором позаклітинного кальцію ЕГТА, але не інгібітором надходження кальцію з внутрішньоклітинних компартментів неоміцином. Обробка ЕГТА також усувала індуковане путресцином підвищення активності антиоксидантних ферментів в коренях проростків. Неоміцин знімав ефекти підвищення активності каталази і гваяколпероксидази в коренях проростків пшениці, спричинювані дією путресцину. Як ЕГТА, так і неоміцин зменшували позитивний вплив путресцину на виживаність проростків після теплового стресу. Отже, встановлене значення підвищення кальцію в цитозолі за дії путресцину насамперед за рахунок його надходження з позаклітинного простору.

Ще одним посередником в реалізації ефектів поліамінів є оксид азоту. Встановлено, що обробка проростків 1 мМ путресцином протягом 24 год викликала швидке і транзиторне підвищення вмісту NO в коренях з максимумом через 1 год після її початку. При цьому відзначалося дворазове збільшення активності ДАО. Інгібітор ДАО аміногуанідин повністю усував підвищення вмісту NO, спричинюване путресцином. Збільшення активності ДАО і вмісту NO усувалося і при обробці проростків антагоністами кальцію (ЕГТА і неоміцином). Скавенджер оксиду азоту РТЮ повністю нівелював ефект підвищення вмісту пероксиду водню в коренях проростків пшениці при їх обробці путресцином. У той же час обробка антагоністом пероксиду водню ДМТС лише трохи зменшувала ефект підвищення вмісту NO в коренях, спричинюване путресцином. Антагоністи NO усували захисну дію путресцину при тепловому стресі, яка визначається за інтенсивністю ПОЛ і виживаністю проростків. Отже, можна вважати доведеною роль оксиду азоту, що синтезується за окиснювальним шляхом, і його функціональної взаємодії з АФК та іонами кальцію в реалізації стрес-протекторної дії путресцина на рослинні об'єкти (рис. 3.26). Між цими трьома посередниками, ймовірно, є тісні прямі і зворотні зв'язки. Ферменти, задіяні в синтезі АФК і NO, є кальційзалежними. Водночас АФК і NO можуть брати участь в модуляції кальцієвого гомеостазу (рис. 3.27).

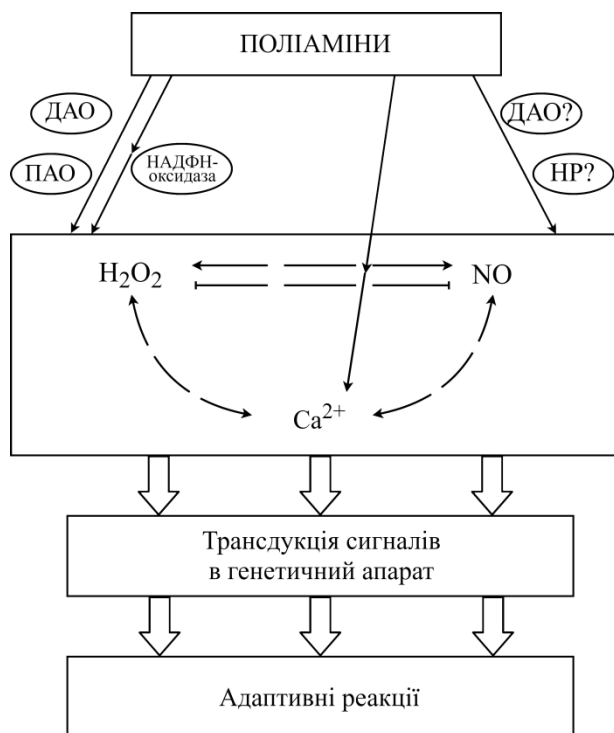


Рис. 3.27. Гіпотетична схема залучення ПА у процесі редокс-, NO- і кальцієвого сигналіngu. ДАО – діаміноксидаза, НР – нітратредуктаза, ПАО – поліаміноксидаза.

У нашій роботі також досліджувалася можлива участь ендogenous сірководню в прояві протекторної дії діаміну путресцину на проростки пшениці при тепловому стресі і активність антиоксидантних ферментів в їх коренях. Інкубація коренів інтактних проростків в середовищі з додаванням 1 мМ путресцину, спричиняла транзиторне посилення генерації сірководню. Обробка коренів проростків інгібітором основного ферменту синтезу H_2S (L-цистеїндесульфгідрази) піруватом калію частково нівелювала спричинюване путресцином підвищення стійкості проростків до ушкоджуючого прогріву. Спричинюване путресцином підвищення активності СОД і каталази також усувалося обробкою проростків піруватом калію. Це дозволяє зробити висновок про можливу участь сірководню як посередника при індукуванні путресцином теплостійкості проростків пшениці та їх антиоксидантної системи.

У подальших дослідженнях доцільно з'ясувати характер взаємодії сірководню з іншими сигнальними посередниками (АФК, NO, іонами кальцію)

при індукуванні стресостійкості рослин путресцином. Крім того, становить інтерес з'ясування питання про участь сірководню в реалізації фізіологічних ефектів інших поліамінів, які також проявляють захисну дію в стресових умовах.

РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ ЕКЗОГЕННИХ ПОЛІАМІНІВ НА СТІЙКІСТЬ РОСЛИН ДО ЗНЕВОДНЕННЯ

4.1. Вплив путресцину і сперміну на стійкість етіюльованих проростків пшениці до зневоднення, спричинюваного дією ПЕГ 6000

Вважається, що екзогенні поліаміни особливо помітно впливають на рослини при стресах, пов'язаних із зневодненням (Prabhavathi, Rajam, 2007; Gill, Tuteja, 2010). Показано, що трансформація рослин арабідопсису геном аргініндекарбоксилази (ключового ферменту синтезу поліамінів) вівса підвищувала їх стійкість до зневоднення, спричинюваного ПЕГ (Alet et al., 2011). Виявлено, що посухостійкі сорти пшениці відрізнялися від нестійких вищим вмістом кон'югованих форм путресцину і спермідину (Grzesiak et al., 2013).

Однією з причин пошкодження рослинних клітин при зневодненні є супутній окислювальний стрес, що виявляється в хлоропластах, мітохондріях та інших компартментах (Колупаев, Кокорев, 2019). Можна припустити, що позитивні ефекти поліамінів при зневодненні рослин зумовлені їх комплексним впливом на антиоксидантну і осмопротекторну системи. Важливим компонентів обох систем є пролін (Колупаев и др., 2014). Показано, що обробка проростків пшениці путресцином сприяла його накопиченню, посилюючи експресію гена Δ^1 піролін-5-карбоксилатсинтази (Pal et al., 2018). Збільшення вмісту проліну під впливом екзогенного путресцину виявлено і у рослин голубиного гороху за умов дії ПЕГ або хлориду натрію (Monteiro et al., 2014). У той же час під впливом 1 мМ екзогенного сперміну у рослин ріпаку зменшувалася акумуляція проліну при осмотичному стресі, такий же ефект чинив і путресцин, проте в дуже високій концентрації (25 мМ) (Larher et al., 1998). Обробка рослин рису сперміном перед впливом ПЕГ не впливала на вміст проліну (Cheng, Као, 2010). Однак при стресовій дії кадмію на рослини

вигни обробка сперміном посилювала накопичення проліну (Nahar et al., 2016b). Таким чином, відомості про вплив поліамінів на накопичення рослинами проліну вельми суперечливі. В цілому, питання про характер взаємини між метаболічними шляхами проліну і поліамінів в стресових умовах досі залишається відкритим (Radyukina et al., 2010).

Не менш складною є функціональна взаємодія між низькомолекулярними і ферментативними антиоксидантами у рослин при стресах (Kolupaev et al., 2019). Так, відомо про реципрокні зв'язки між активністю ключового антиоксидантного ферменту СОД і вмістом проліну (Yang et al., 2011) та цукрів (Si'nkevich et al., 2009). В окремих роботах повідомляється про підвищення активності та посилення експресії генів окремих форм СОД у рослин під впливом поліамінів (Korolkova et al., 2014; Li et al., 2014; 2016). Крім того, є відомості про вплив екзогенних поліамінів на накопичення вторинних метаболітів з антиоксидантними властивостями (Mohamed et al., 2018).

У той же час робіт, в яких би в ідентичних експериментальних умовах вивчався вплив поліамінів на широкий спектр компонентів антиоксидантної та осмопротекторної систем поки недостатньо. Дуже мало порівняльних досліджень впливу різних поліамінів на функціонування цих систем. Зважаючи на це, ми провели порівняльне вивчення впливу екзогенних путресцину і сперміну на активність антиоксидантних ферментів, вміст сумісних осмолітів і флавоноїдних сполук в етіольованих проростках пшениці за дії осмотичного стресу.

4.1.1. Ростові показники.

За відсутності дії стресора екзогенні поліаміни не чинили істотного впливу на ріст пагонів проростків (рис. 4.1). Водночас путресцин і особливо спермін спричиняли деяке інгібування росту коренів. Проте за дії путресцину воно було вірогідним при $P \leq 0,05$ лише у високій концентрації (2,5 мМ), а за дії сперміну – у концентраціях 1 і 2,5 мМ.

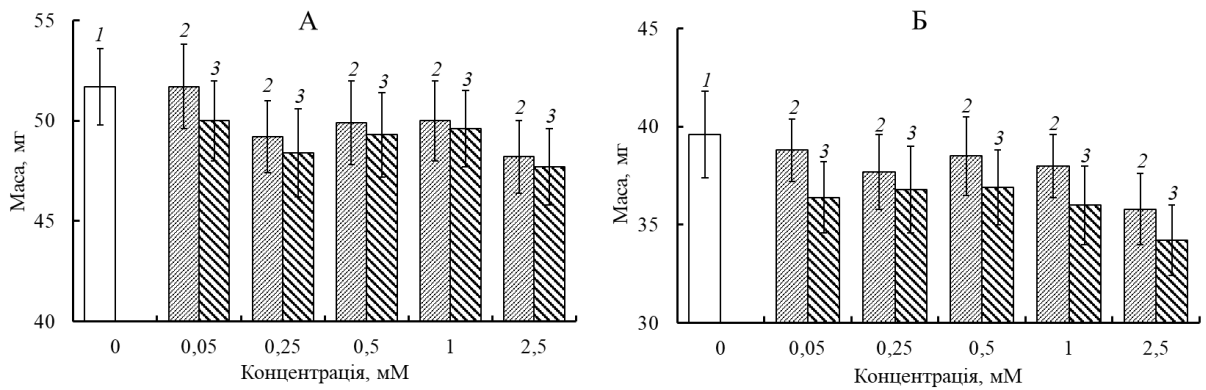


Рис. 4.1. Маса (мг) пагонів (А) і коренів (Б) проростків пшениці за їх обробці поліамінами. 1 – контроль; 2 – путресцин; 3 – спермін.

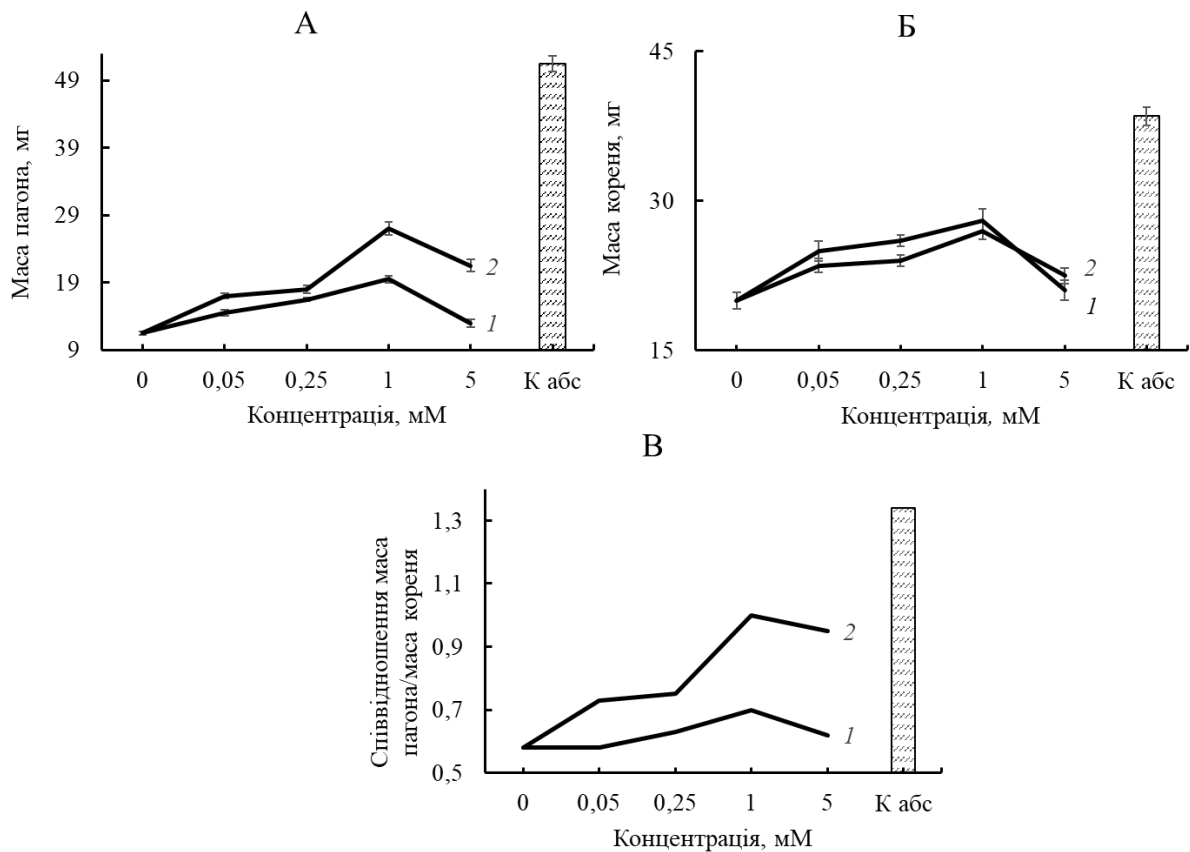


Рис. 4.2. Вплив поліамінів на ростові показники проростків пшениці в умовах осмотичного стресу (дію 12% ПЕГ 6000). А – маса пагона (мг); Б – маса коренів (мг); В - співвідношення маса пагона/маса кореня. 1 – путресцин (1 мМ); 2 – спермін (1 мМ). Стовпчиками (К_{абс}) показані величини в контролі (за відсутності стресу і обробки поліамінами).

Під впливом 12% ПЕГ 6000 істотно пригнічувався ріст пагонів і коренів (рис. 4.2). При цьому стрес-протекторна дія обох поліамінів в концентраціях 0,05 – 1 мМ була вірогідною при $p \leq 0,05$. Слід зазначити, що обробка поліамінами за стресових умов наближала співвідношення «маса пагона/маса коренів» до величини безстресового контролю (рис. 4.2, В). Найбільш виражену протекторну дію обидва поліаміни чинили в концентрації 1 мМ. Саме таку концентрацію путресцину і сперміну використовували у подальших експериментах для оцінки їх впливу на показники антиоксидантної та осмопротекторної систем проростків пшениці.

4.1.2. Стан ферментативної антиоксидантної системи.

Осмотичний стрес викликав істотне збільшення вмісту пероксиду водню в проростках (рис. 4.3). Обробка путресцином повністю, а сперміном значною мірою усувала такий прояв ефекту окиснювального стресу.

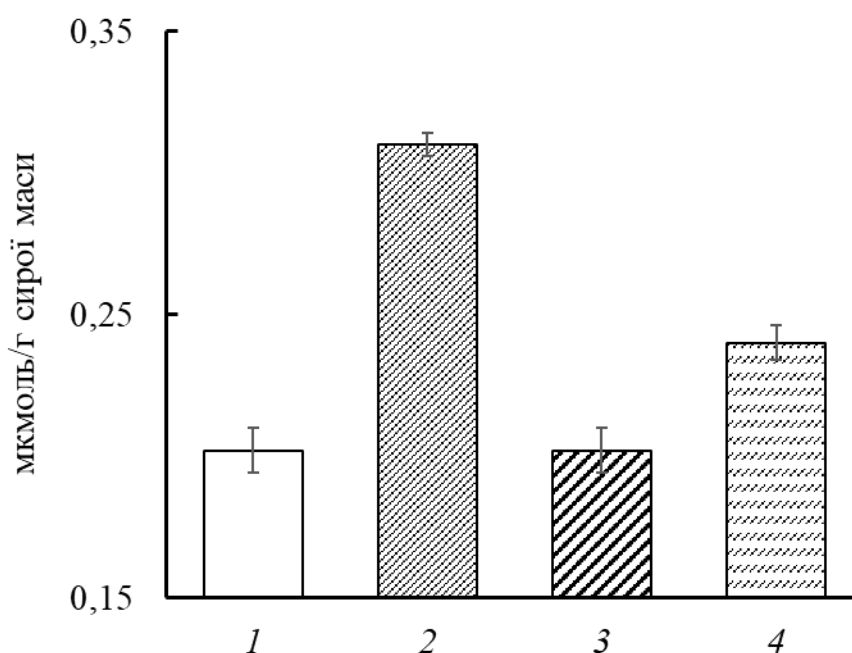


Рис. 4.3. Вміст пероксиду водню (мкмоль/г сирої речовини) в пагонах проростків пшениці. 1 – контроль; 2 – ПЕГ 6000 (12%); 3 – ПЕГ 6000 (12%) + путресцин (1 мМ); 4 – ПЕГ 6000 (12%) + спермін (1 мМ).

Під впливом осмотичного стресу знижувалася активність СОД (рис 4.4, А). Обробка путресцином стабілізувала активність ферменту до величин безстресового контролю. Спермін частково знімав негативний вплив зневоднення на активність СОД.

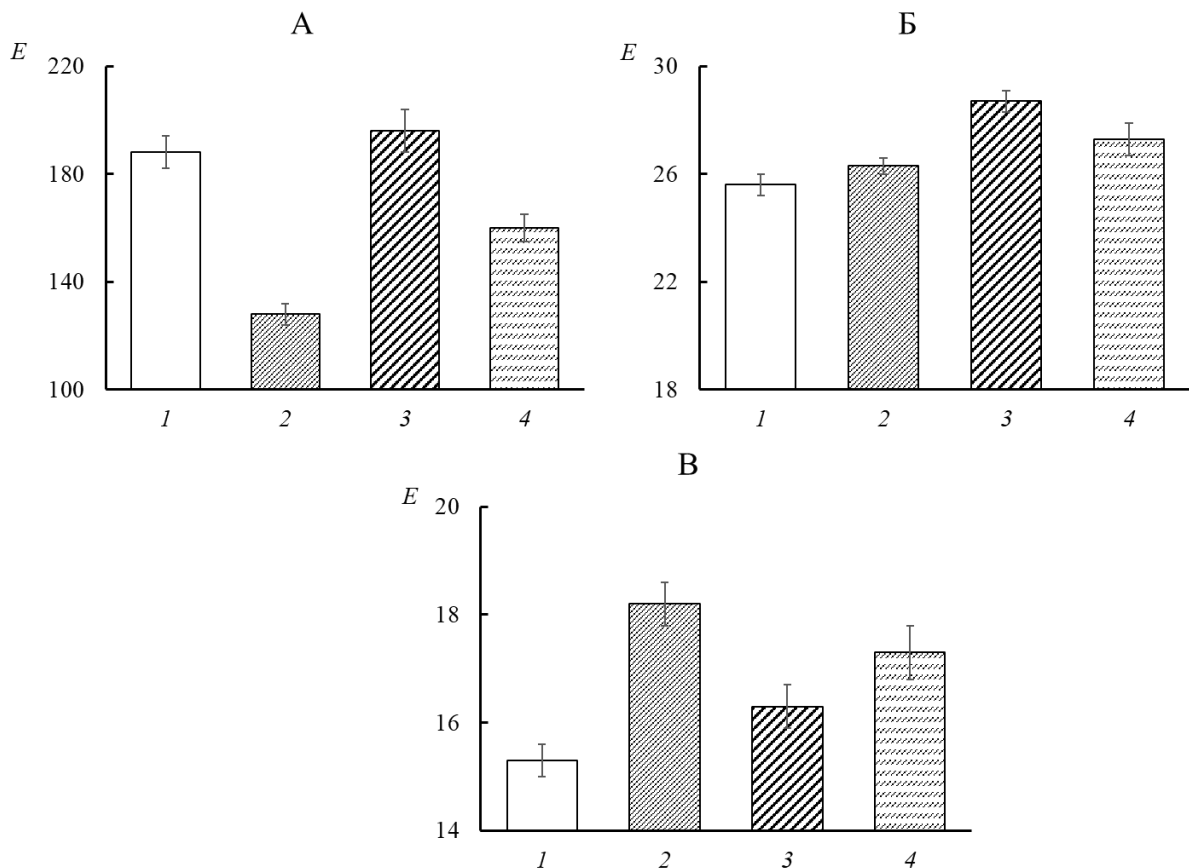


Рис. 4.4. Активність антиоксидантних ферментів в пагонах проростків пшениці. А – СОД (Е, умов. од ./ (г сухої маси • хв)); Б – каталаза (Е, ммоль H₂O₂ / (г сухої маси • хв)); В – гваяколпероксидаза (Е, умов. од ./ (г сухої маси • хв)). 1 – контроль; 2 – ПЕГ 6000 (12%); 3 – ПЕГ 6000 (12%) + путресцин (1 мМ); 4 – ПЕГ 6000 (12%) + спермін (1 мМ).

Активність каталази в проростках пшениці під впливом осмотичного стресу суттєво не змінювалася (рис. 4.4, Б). Обробка поліамінами викликала тенденцію до підвищення активності ферменту, однак цей ефект не був достовірним при $p \leq 0,05$.

Осмотичний стрес спричиняв підвищення активності гваяколпероксидази в проростках пшениці (рис. 4.4, В). У варіанті з обробкою путресцином активність ферменту була трохи нижчою, в той же час спермін не чинив істотного впливу на величину активності гваяколпероксидази в проростках в умовах дії ПЕГ 6000.

4.1.3. Осмоліти і низькомолекулярні антиоксиданти.

Зневоднення проростків викликало відносно невелике, але вірогідне при $p \leq 0,05$ підвищення вмісту проліну (рис. 4.5, А). У присутності путресцину накопичення проліну була значно більшим, в той же час в варіанті з сперміном воно не відрізнялося від безстресового контролю.

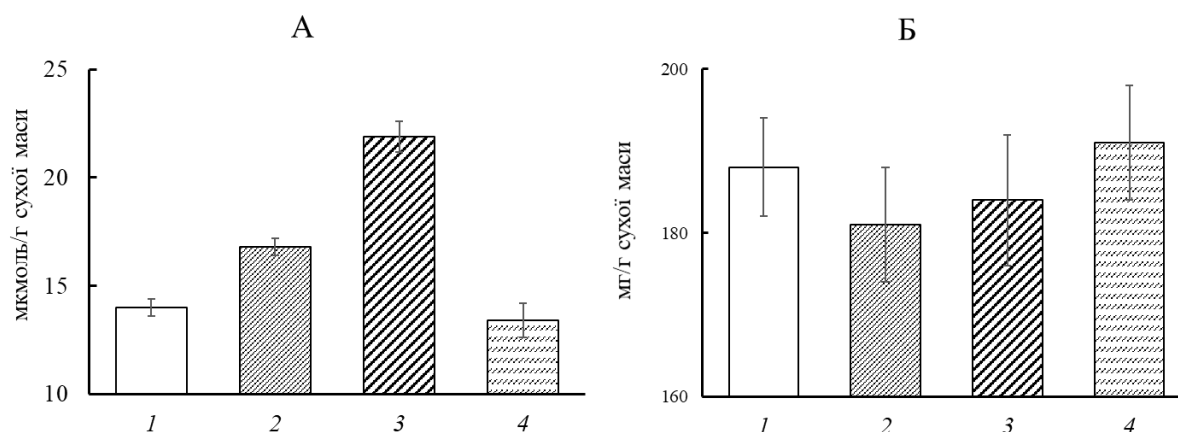


Рис. 4.5. Вміст проліну (А, мкмоль/г сухої маси) і цукрів (Б, мг/г сухої маси). 1 – контроль; 2 – ПЕГ 6000 (12%); 3 – ПЕГ 6000 (12%) + путресцин (1 мМ); 4 – ПЕГ 6000 (12%) + спермін (1 мМ).

Вміст цукрів в проростках пшениці під впливом зневоднення, спричинюваного дією ПЕГ 6000, а також поліамінів, істотно не змінювався (рис. 4.5, Б).

Осмотичний стрес не чинив істотного впливу на вміст антоціанів в проростках (рис. 4.6, А). У той же час в присутності в середовищі путресцину і сперміну воно збільшувалося.

Вміст безбарвних флавоноїдів, що поглинають в УФ-В, під впливом зневоднення проростків істотно не змінювався (рис. 4.6, Б). Не впливало на цей показник і внесення в середовище інкубації проростків путресцину. Водночас обробка сперміном спричиняла збільшення вмісту флавоноїдів в проростках.

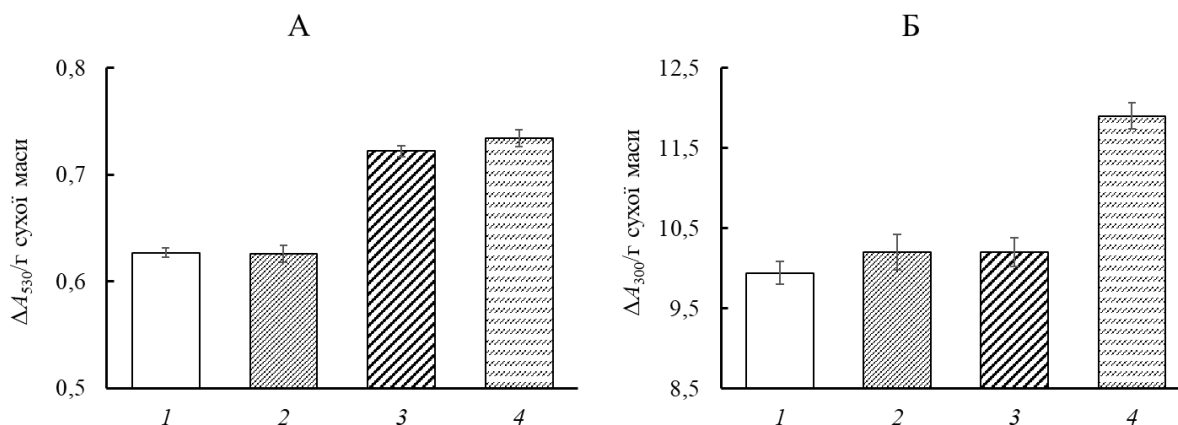


Рис. 4.6. Вміст антоціанів (А, $\Delta A_{530}/\text{г сухої маси}$) і флавоноїдів, що поглинають в УФ-В (Б, $\Delta A_{300}/\text{г сухої маси}$). 1 – контроль; 2 – ПЕГ 6000 (12%); 3 – ПЕГ 6000 (12%) + путресцин (1 мМ); 4 – ПЕГ 6000 (12%) + спермін (1 мМ).

Отже, присутність в середовищі інкубації проростків пшениці путресцину і сперміну помітно підвищувала їх стійкість до осмотичного стресу, спричинюваного дією ПЕГ 6000 (рис. 4.2). Захисна дія поліамінів проявлялася як у зменшенні негативного впливу зневоднення на ріст пагонів і коренів, так і у збільшенні співвідношення маса проростків/маса коренів. При використанні путресцину і сперміну в оптимальних концентраціях (1 мМ) воно наближалось до значень безстресового контролю. Стрес-протекторна дія сперміну на ріст пагонів була більш істотною порівняно з ефектом путресцину. Позитивний вплив двох поліамінів на ріст коренів в умовах осмотичного стресу був приблизно однаковим.

В цілому зафіксовані нами ростові ефекти досліджуваних поліамінів при стресі зневоднення узгоджуються з описаними в літературі. Так, обробка путресцином сприяла проростанню насіння люцерни при осмотичному стресі і

збільшувала співвідношення маси гіпокотилів і коренів (Zeid et al., 2006). Такий же ефект путресцину спостерігався і за дії осмотичного та сольового стресів на проростки голубиного гороху (Monteiro et al., 2014). Додавання путресцину в середовище культивування клітин картоплі в присутності ПЕГ 8000 підвищувало їх виживаність (Scaramagli et al., 2000). Обробка однорічних саджанців апельсину путресцином сприяла збереженню їх ростових процесів за посухи (Mohamed et al., 2018). Під впливом обробки сперміном проростків конюшини повзучої посилювався їх ріст за умов посухи (Li et al., 2016). Також обробка сперміном стабілізувала ростові показники проростків вигни за умов осмотичного стресу або його поєднання з нагріванням (Nahar et al., 2016a).

Однією зі складових стрес-протекторної дії поліамінів, ймовірно, є активація/стабілізація ними антиоксидантної системи. На це, зокрема, вказує зменшення спричинюваного осмотичним стресом накопичення пероксиду водню в проростках за їх обробки сперміном і, особливо, путресцином (рис. 4.3).

Не виключено, що спричинюваний жорстким зневодненням окиснювальний стрес призводив до пошкодження самої антиоксидантної системи проростків. Про це свідчить зниження активності ключового антиоксидантного ферменту СОД, який є єдиним білковим антиоксидантом, що знешкоджує супероксидний аніон-радикал (Kolupaev et al., 2019). У присутності путресцину або сперміну активність цього ферменту при осмотичному стресі була близькою до контролю (рис. 4.4, А). Під впливом сперміну подібні ефекти виявлені у рослин конюшини повзучої (Li et al., 2016) і вигни (Nahar et al., 2016a).

Необхідно зауважити, що в умовах наших експериментів поліаміни слабо впливали на активність ферментів, що знешкоджують пероксид водню – каталази і гваяколпероксидази (рис. 4.4, Б, В). Не виключено, що захисна дія поліамінів в цьому випадку зумовлена їх впливом на інші ферментні системи, що знешкоджують пероксид водню, але не вивчались у даній роботі, наприклад, ферменти аскорбат-глутатіонового циклу. Також більш ефективно

знешкодження пероксиду водню в проростках, оброблених путресцином або сперміном, могло забезпечуватися низькомолекулярними антиоксидантами. Примітно, що під впливом обох поліамінів в проростках пшениці підвищувався вміст антоціанів (рис. 4.6, А), що мають високу антиоксидантну активність щодо різних АФК (Khlestkina et al., 2013).

Вміст безбарвних флавоноїдів в тканинах проростків збільшувався тільки під впливом сперміну (рис. 4.6, Б). Не виключено, що окремі протекторні ефекти поліамінів є специфічними, тобто можуть бути викликані тільки певним поліаміном.

Істотні відмінності в наших експериментах виявлені в дії поліамінів на накопичення проліну. Якщо путресцин сприяв додатковому підвищенню вмісту проліну при осмотичному стресі, то спермін, навпаки, викликав зменшення його кількості до рівня контролю (рис. 4.5, А). Слід зазначити, що в літературі є дані про збільшення під впливом путресцину вмісту проліну у рослин за умов осмотичного стресу. Такий ефект спостерігався у рослин різних видів і міг бути зумовлений посиленням експресії генів Δ^1 піролін-5-карбоксилатсинтази (Pal et al., 2018). Дані про вплив сперміну на синтез проліну не настільки однозначні. Так, у проростків ріпаку під впливом 1 мМ сперміну відзначалося пригнічення накопичення проліну, індукованого осмотичним стресом (Larher et al., 1998). З іншого боку, у вигни спермін посилював ефект накопичення проліну, спричинюваний дією хлориду кадмію (Nahar et al., 2016b). Причини таких відмінностей пояснити поки що складно. Не виключено, що різні поліаміни діють як різні сигнали, що індукують синтез певних осмопротекторів. Оскільки компоненти протекторних систем перебувають між собою в складній функціональній взаємодії, можливий як позитивний, так і негативний вплив поліамінів на накопичення інших стресових метаболітів (Radyukina et al., 2010).

В цілому, можна констатувати складний вплив поліамінів на функціонування протекторних систем, який залежить від природи діючого поліаміну, об'єкта дослідження і природи стресора. В умовах наших експериментів в реалізації стрес-протекторних ефектів обох поліамінів на

проростки пшениці при осмотичному стресі задіяні СОД і антоціани. Накопичення проліну індукувалося тільки дією путресцину, а вміст безбарвних флавоноїдів зростає тільки під впливом сперміну. Таким чином, механізми протекторної дії різних поліамінів мають специфічні складові.

4.2. Вплив поліамінів на стійкість рослин пшениці до ґрунтової посухи

Відомо, що ефекти посухи на модельних системах та інтактних рослинах можуть істотно відрізнятися, оскільки реакція рослинного організму на брак вологи реалізується в результаті взаємодії різних органів і систем (de Carvalho, 2008). Проте більшість фізіологічних ефектів поліамінів досліджувалася переважно в модельних експериментах з використанням ПЕГ, частіше на етіологованих проростках. Вплив поліамінів на посухостійкість інтактних рослин в умовах, наближених до природних, вивчався лише у поодиноких роботах. Так, показано, що обприскування рослин пшениці 0,1 мМ путресцином підвищувало інтенсивність фотосинтезу за умов посухи, а також знижувало вміст проліну і підвищувало вміст цукрів у листках (Gupta et al., 2012). Проте вміст осмолітів у даній роботі розраховувався на сиру речовину, що не дозволяє однозначно тлумачити результати для об'єкта, що зазнавав зневоднення. На рослинах рису за умов посухи в ґрунтовій культурі показано посилення асиміляції CO_2 та підвищення вмісту проліну і фенольних антиоксидантів під впливом путресцину і (більшою мірою) сперміну (Fargooq et al., 2009). Передпосівна обробка насіння сої 0,2 мМ сперміном підвищувала вміст фотосинтетичних пігментів, кількість цукрів, антоціанів і фенольних сполук у листках за умов природної посухи (Dawood, Abeer, 2020). Проте ці результати отримані нефакторостатних умовах польового дослідження.

У зв'язку з викладеним, досліджували вплив фоліарної обробки рослин пшениці путресцином і сперміном на стійкість до посухи в умовах лабораторної ґрунтової культури (Кокорев та ін., 2020). При цьому оцінювали

такі інтегральні параметри, як інтенсивність росту рослин, водний дефіцит, вміст фотосинтетичних пігментів, а також рівень окиснювальних пошкоджень та вміст низькомолекулярних протекторів – проліну, цукрів і флавоноїдних сполук у листках.

4.2.1. Ріст рослин.

Після 4-денного впливу посухи відзначалося істотне пригнічення росту надземної частини рослин (рис. 4.7, 4.8).

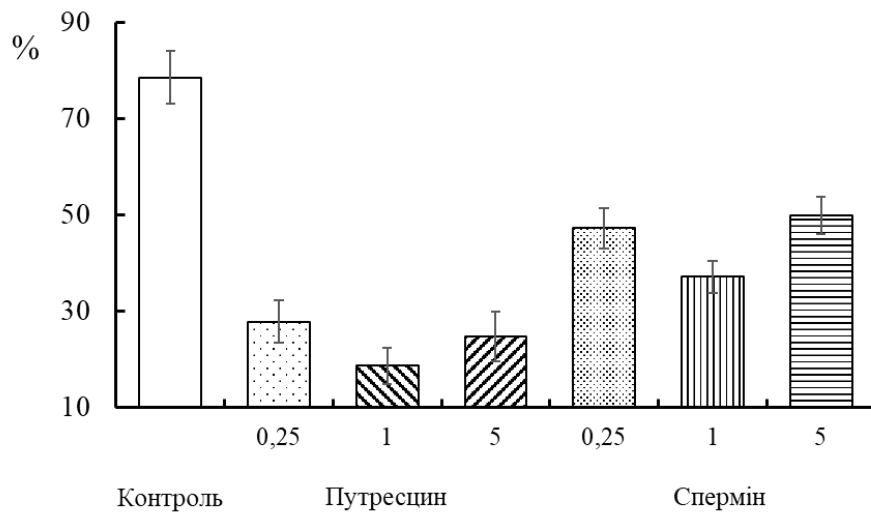


Рис. 4.7. Інгібування росту (%) надземної частини рослин пшениці за умов ґрунтової посухи і дії путресцину та сперміну (концентрації в мМ).



Рис. 4.8. Стан рослин пшениці після 4-денної посухи. 1 – контроль; 2 – посуха; 3 – посуха + Пут (1 мМ); 4 – посуха + Пут (5 мМ); 5 – посуха + Спм (1 мМ); 6 – посуха + Спм (5 мМ).

Фолярна обробка путресцином в усіх трьох досліджуваних концентраціях істотно зменшувала спричинюване посухою інгібування росту рослин. При цьому більш ефективними були концентрації 1 і 5 мМ. За обробки рослин сперміном також спостерігалось пом'якшення ристінгуючого впливу посухи, але його ефект був слабшим від дії путресцину (рис. 4.7, 4.8).

4.2.2. Водний дефіцит.

Після 4-денної посухи водний дефіцит листків зростав майже в чотири рази (рис. 4.9).

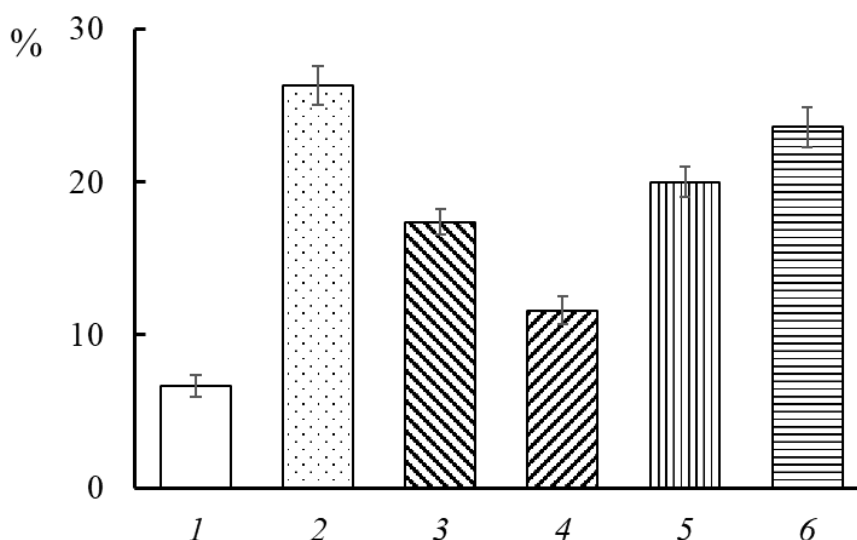


Рис. 4.9. Водний дефіцит (%) листків пшениці за умов ґрунтової посухи і дії путресцину (Пут) та сперміну (Спм). 1 – контроль; 2 – посуха; 3 – посуха + Пут (1 мМ); 4 – посуха + Пут (5 мМ); 5 – посуха + Спм (1 мМ); 6 – посуха + Спм (5 мМ).

Обробка рослин путресцином в концентраціях 1 і особливо 5 мМ істотно зменшувала величину водного дефіциту. Під впливом сперміну відзначалася лише тенденція до зниження водного дефіциту (за обробки 1 мМ розчином ефект був вірогідним при $p \leq 0,1$).

4.2.3. Прояв ефекту окиснювального стресу.

Посуха спричинювала розвиток окиснювального стресу в клітинах листків, про що свідчить зростання вмісту МДА на третину від значень контролю (рис. 4.10).

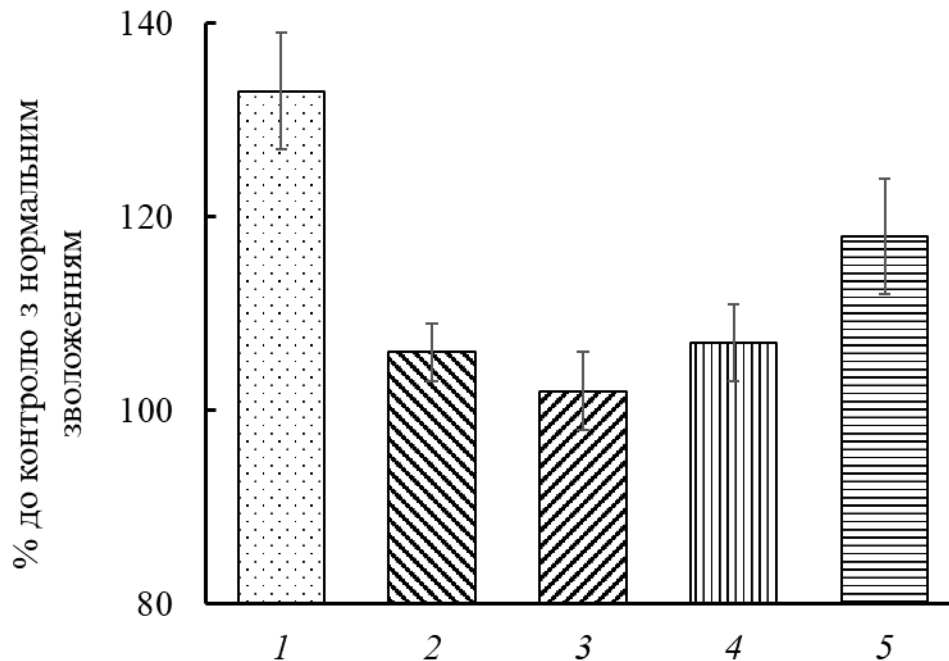


Рис. 4.10. Вміст МДА у листках пшениці (% до контролю з нормальним зволоженням) за умов ґрунтової посухи і дії путресцину та сперміну. 1 – посуха; 2 – посуха + Пут (1 мМ); 3 – посуха + Пут (5 мМ); 4 – посуха + Спм (1 мМ); 5 – посуха + Спм (5 мМ).

Обробка рослин путресцином перед посухою майже повністю усувала цей ефект. За дії сперміну також відзначалося помітне зменшення спричинюваною посухою зростання вмісту МДА у листках (рис. 4.10).

4.2.4. Стан пігментного комплексу.

Під впливом посухи спостерігалось істотне зменшення вмісту хлорофілів у листках (табл. 4.1).

Таблиця 4.1. Вміст фотосинтетичних пігментів (мг/г сухої речовини) у листках рослин пшениці за умов ґрунтової посухи і дії путресцину (Пут) та сперміну (Спм)

Варіант	Хл. <i>a</i>	Хл. <i>b</i>	Хл. <i>a + b</i>	Хл. <i>a/b</i>	Каротиноїди
Контроль	9,73 ± 0,29	4,29 ± 0,07	14,02 ± 0,36	2,27	2,23 ± 0,06
Посуха	5,30 ± 0,20	3,44 ± 0,11	8,64 ± 0,23	1,60	0,91 ± 0,03
Посуха + Пут (1 мМ)	7,15 ± 0,15	3,48 ± 0,08	10,63 ± 0,17	2,03	1,41 ± 0,09
Посуха + Пут (5 мМ)	7,79 ± 0,19	3,53 ± 0,11	11,32 ± 0,22	2,21	1,83 ± 0,11
Посуха + Спм (1 мМ)	7,29 ± 0,16	2,97 ± 0,09	10,26 ± 0,18	2,45	1,40 ± 0,08
Посуха + Спм (5 мМ)	6,67 ± 0,14	3,38 ± 0,12	10,05 ± 0,18	1,97	1,43 ± 0,13

Обробка путресцином в обох концентраціях сприяла збереженню їх пулу після посухи. При цьому вона нівелювала порушення співвідношення між вмістом хлорофілів *a* і *b*, спричинюване посухою. За дії 1 мМ сперміну так само відзначалося збереження близького до нормального сумарного вмісту хлорофілів та співвідношення *a/b*. Захисний ефект 5 мМ сперміну був менш істотним, але вірогідним при $p \leq 0,05$ (табл. 4.1).

4.2.5. Сумісні осмоліти і антиоксиданти.

За дії посухи спостерігалось зростання вмісту проліну у листках більш ніж в 1,6 рази (рис. 4.11, А). Обробка путресцином, особливо в концентрації 1 мМ, зменшувала прояв такого ефекту. Тенденцію до меншого накопичення проліну за умов посухи відзначали і у варіанті з обробкою 5 мМ сперміном.

Вміст цукрів у листках за дії посухи вірогідно не змінювався (рис. 4.11, Б). Обробка путресцином і сперміном сприяла підвищенню вмісту цукрів у листках. Найбільш помітним цей ефект був за дії 1 мМ сперміну. Проте і в інших варіантах з обробкою рослин поліамінами підвищення вмісту цукрів у листках було вірогідним при $P \leq 0,05$ (рис. 4.11, В).

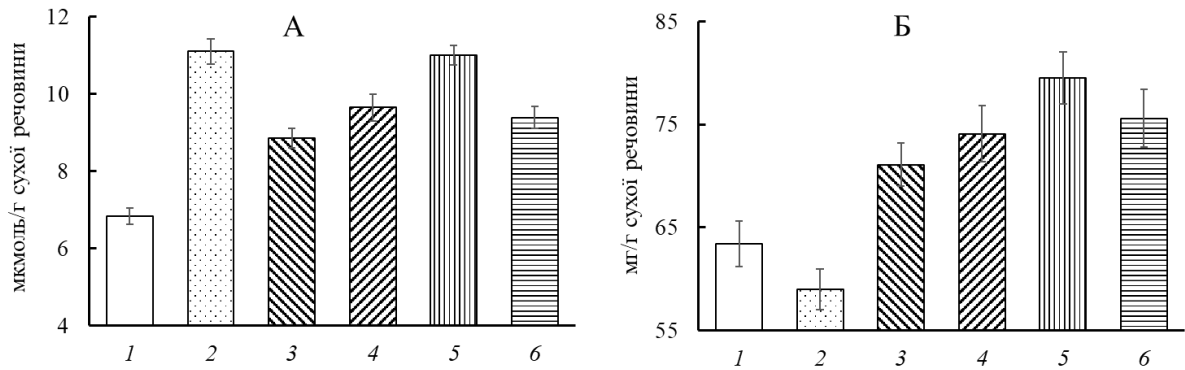


Рис. 4.11. Вміст проліну (А, мкмоль/г сухої речовини) і цукрів (Б, мг/г сухої речовини) у листках рослин пшениці за умов ґрунтової посухи і дії путресцину та сперміну. 1 – контроль; 2 – посуха; 3 – посуха + Пут (1 мМ); 4 – посуха + Пут (5 мМ); 5 – посуха + Спм (1 мМ); 6 – посуха + Спм (5 мМ).

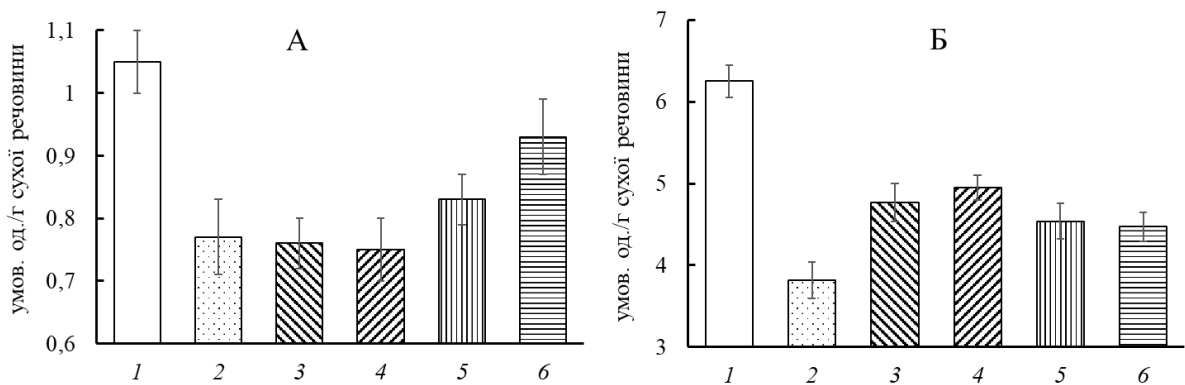


Рис. 4.12. Вміст антоціанів (А, умов. од./г сухої речовини) і флавоноїдів, що поглинають в УФ-В (Б, умов. од./г сухої речовини), у листках рослин пшениці за умов ґрунтової посухи і дії путресцину (Пут) та сперміну (Спм). 1 – контроль; 2 – посуха; 3 – посуха + Пут (1 мМ); 4 – посуха + Пут (5 мМ); 5 – посуха + Спм (1 мМ); 6 – посуха + Спм (5 мМ).

Посуха спричиняла зменшення вмісту в листках антоціанів і флавоноїдів, що поглинають в області УФ-В (рис. 4.12). Обробка путресцином не впливала на вміст антоціанів, а спермін сприяв збереженню більшого їх пулу за умов посухи, хоча цей ефект був вірогідним лише за $p \leq 0,1$. Водночас обидва поліаміни зменшували ефект падіння вмісту флавоноїдів, що поглинають в УФ-В (рис. 4.12, Б).

Отже, обробка рослин поліамінами чинила виражений захисний вплив за умов посухи, ефекти путресцину в цілому були більш виразними порівняно з дією сперміну. Однією з істотних складових стрес-протекторної дії поліамінів напевно може бути їх участь у регуляції водного обміну. Так, у варіантах з обробкою путресцином відзначалося зменшення величини водного дефіциту в 1,5-2 рази (рис. 4.9). Ефект підвищення відносного вмісту води за посухи у рослин пшениці за обробки путресцином був показаний у роботі Gupta і співавт. (2012). Позитивний вплив поліамінів на вміст води у листках може бути зумовлений їх участю у регуляції стану продихів. У роботі Farooq і співавт. (2009) показано зниження продихової провідності за умов посухи у рослин рису, оброблених сперміном або путресцином. Також встановлено, що діаміноксидаза, яка окислює поліаміни, є необхідною ланкою в процесі закривання продихів, індукованого дією АБК (An et al., 2008).

Закривання продихів за умов посухи може мати як позитивні, так і негативні наслідки. Зменшення продихової провідності не лише скорочує втрати води при транспірації, а й збільшує ефективність її використання. При закриванні продихів транспірація знижується швидше і більшою мірою, ніж фотосинтез, в результаті чого рослина фіксує більше вуглецю у розрахунку на одиницю поглинутої води (Kudoyarova et al., 2013). Водночас зменшення продихової провідності може бути причиною розвитку окиснювального стресу, зумовленого браком надходження в клітини мезофілу вуглекислого газу і створенням тим самим передумов для «перевідновлення» електрон-транспортного ланцюга хлоропластів (Lawol, Tezara, 2009). Зважаючи на це, за умов зневоднення зростає значення механізмів знешкодження АФК. При цьому поліаміни можуть як посилювати ефект закривання продихів, так і активувати антиоксиданту систему.

В умовах наших експериментів обробка рослин пшениці путресцином і сперміном попереджала спричинюваний посухою розвиток окиснювального стресу (Кокорев та ін., 2020). Про це свідчить відсутність в умовах посухи підвищення вмісту МДА у листках рослин, оброблених путресцином і менше

порівняно з необробленими рослинами зростання вмісту продукту ПОЛ у варіанті зі сперміном (рис. 4.10). Слід зауважити, що феномен більш ефективного попередження окиснювального стресу за дії путресцину порівняно зі сперміном показано і на рослинах рису в умовах сольового стресу (Ndayiragije, Lutts, 2007).

На попередження путресцином і (меншою мірою) сперміном окиснювальних пошкоджень вказує і вищий вміст хлорофілів та більша величина співвідношення між хлорофілом *a* і *b* у листках рослин, оброблених поліамінами (табл. 4.1). Примітно, що посуха викликала більш ніж дворазове зменшення у листках вмісту каротиноїдів, які виконують функції ключових низькомолекулярних антиоксидантів у ліпідній фазі хлоропластів (Kolupaev et al., 2019). При цьому обробка 5 мМ путресцином сприяла збереженню їх вмісту, близького до величин контролю. Помітно більшим від варіанта без обробки поліамінами за умов посухи був вміст каротиноїдів і у разі застосування 1 мМ путресцину та 1 і 5 мМ сперміну (табл. 4.1). Стабілізація під впливом сперміну вмісту каротиноїдів за умов сольового стресу показана у рослин вигни (Alsokari, 2011).

На етіюльованих проростках пшениці показано підвищення вмісту проліну за умов посухи при обробці путресцином, але не сперміном (див. п. 4.1). Водночас у дорослих рослин обробка путресцином не лише не посилювала накопичення проліну за умов посухи, а й послаблювала його, а обприскування сперміном майже не впливало на вміст проліну (рис. 4.11). Ці результати свідчать, що реакція протекторних систем етіюльованих проростків і дорослих зелених рослин одного виду на обробку поліамінами може відрізнятися. При цьому відсутність помітного впливу поліамінів на вміст проліну не означає відсутності їх позитивних ефектів за умов посухи. Незважаючи на важливість проліну як поліфункціонального протектора, менш істотне підвищення його вмісту при нелетальному стресі може вказувати на вищу резистентність рослин (Кузнецов, Шевякова, 1999). Іншими словами, за більшої резистентності «поріг» активації накопичення проліну стресовим фактором може бути вищим.

При цьому за відсутності істотного підвищення вмісту проліну осмопротекторні і антиоксидантні функції, властиві проліну можуть виконувати інші низькомолекулярні сполуки. В наших експериментах, зокрема, відзначалося підвищення під впливом путресцину і більшою мірою сперміну вмісту цукрів у листках (рис. 4.11). Це узгоджується з даними, отриманими на рослинах кукурудзи, оброблених сперміном, за умов посухи (Talaat, 2020).

Крім того, путресцин і спермін сприяли збереженню пулу флавоноїдних сполук, що поглинають в УФ-В, хоча і слабо впливали на вміст антоціанів (рис. 4.12). Водночас на етіюльованих проростках пшениці за умов осмотичного стресу показано помітне зростання вмісту антоціанів під впливом як путресцину, так і сперміну, останній також викликав підвищення вмісту флавоноїдів, що поглинають в області УФ-В (див. п. 4.1). Загалом підвищення вмісту вторинних метаболітів (фенольних сполук, різних флавоноїдів) або збереження їх пулу за дії екзогенних поліамінів зафіксовано на різних об'єктах: рослинах рису (Farooq et al., 2009), сої (Dawood, Abeer, 2020), мандарину (Mohamed et al., 2018) за умов осмотичних стресів. Показано також підвищення під впливом поліамінів активності фенілаланінаммонійліази – ключового ферменту синтезу флавоноїдів (Ghosh et al., 2012; Mellidou et al., 2017).

Висновки до розділу 4

Вивчення впливу екзогенних путресцину і сперміну на стійкість проростків пшениці до зневоднення, спричинюваного дією 12% ПЕГ 6000, показало, що обидва поліаміни у досить широкому діапазоні концентрацій пом'якшували рістінгібуючу дію осмотичного стресу. У варіантах з обробкою поліамінами не тільки посилювався ріст пагонів і коренів в умовах дії ПЕГ 6000, а й збільшувалося співвідношення маса проростків/маса коренів. Максимальний позитивний ефект спостерігався при використанні путресцину і сперміну в концентраціях 1 мМ, при цьому стрес-протекторний вплив сперміну був більш помітним, ніж дія путресцину.

Обробка обома поліамінами запобігала індукованому осмотичним стресом підвищенню вмісту пероксиду водню в пагонах проростків. Крім того, вплив на проростки путресцину і сперміну запобігав спричинюваному стресом зниженню активності супероксиддисмутази, але істотно не змінював активність каталази і гваяколпероксидази. Обробка путресцином викликала підвищення вмісту в проростках проліну при осмотичному стресі, в той час як під впливом сперміну він знижувався. Екзогенні поліаміни не чинили помітного впливу на вміст цукрів, але сприяли підвищенню вмісту антоціанів у пагонах. Також під впливом сперміну відбувалося підвищення вмісту безбарвних флавоноїдів, що поглинають в області УФ-В.

Дослідження дії фоліарної обробки рослин пшениці путресцином і сперміном на функціонування їх протекторних систем за посухи в умовах лабораторної ґрунтової культури показало, що обприскування рослин путресцином в концентраціях діапазону 0,25-5 мМ істотно зменшувало рістінгібуючий вплив посухи, дія сперміну була менш ефективною, але також вірогідною при $p \leq 0,05$. Путресцин істотно зменшував прояв водного дефіциту, спричинюваний посухою. За дії сперміну відзначалася лише тенденція до зниження водного дефіциту листків.

Посуха спричиняла ефект окиснювального стресу, що проявлявся у збільшенні у листках вмісту МДА. За попередньої обробки рослин сперміном зростання вмісту МДА нівелювалося частково, а за дії путресцину майже повністю. Обробка рослин обома поліамінами сприяла збереженню пулу хлорофілів і каротиноїдів у листках за стресових умов. Вміст проліну у листках під впливом посухи істотно зростав. Передобробка 1 і 5 мМ путресцином, а також 5 мМ сперміном зменшувала ефект зростання вмісту проліну у листках, спричинюваний посухою. Водночас обробка рослин обома поліамінами спричиняла накопичення цукрів у листках. Під впливом посухи у листках істотно знижувався вміст антоціанів і флавоноїдів, що поглинають в області УФ-В. Передобробка сперміном дещо пом'якшувала негативний вплив посухи на вміст антоціанів. За дії як путресцину, так і сперміну відзначалася

стабілізація вмісту у листках флавоноїдів, що поглинають в УФ-В. Отже, захисний вплив поліамінів на дорослі рослини пшениці за умов посухи зумовлений насамперед регуляцією водного обміну та попередженням розвитку окиснювальних пошкоджень, хоча внесок окремих складових протекторного впливу на етіюльовані проростки пшениці при осмотичному стресі і дорослі рослини за посухи у ґрунтовій культурі має певні відмінності.

РОЗДІЛ 5. РЕГУЛЯЦІЯ ЕКЗОГЕННИМИ ПОЛІАМІНАМИ ПРОДИХОВОГО АПАРАТУ РОСЛИН

Як уже зазначалося, останніми роками поліаміни розглядаються як важливі учасники сигнальних процесів. При окисненні поліамінів утворюється пероксид водню і ймовірно NO. Є відомості, що поліаміни, наприклад, путресцин, спроможні викликати підвищення концентрації цитозольного кальцію в рослинних клітинах (Bose et al., 2011).

Також є поодинокі дані щодо впливу поліамінів на сигнальні процеси, що відбуваються з участю фосфоліпаз C і D. Наприклад, показано, що при інгібуванні S-аденозилметіоніндекарбоксилази (одного з ключових ферментів синтезу поліамінів) поряд зі зменшенням ендogenous вмісту поліамінів знижувалася активність фосфоліпази C і пригнічувався ріст коренів *Catharanthus roseus* (Echevarria-Machado et al., 2004). Обробка коренів арабідопсису сперміном посилювала залежно від фосфоліпази D утворення фосфатидної кислоти (Zarza et al., 2019).

Зважаючи на наявність даних про утворення в рослинних клітинах під впливом поліамінів таких сигнальних молекул, як пероксид водню і оксид азоту та їх здатність впливати на кальцієвий гомеостаз і вміст компонентів ліпідного сигналіну, можна очікувати причетність поліамінів до регуляції стану продихів.

Однак феноменологія і механізми впливу поліамінів на функціонування продихового апарату залишаються маловивченими. Перше спеціальне дослідження впливу екзогенних поліамінів на стан продихів було проведено на прикладі епідермісу *Vicia faba* понад два десятиліття тому (Liu et al., 2000). Встановлено, що спермін, спермідин, путресцин і кадаверин здатні спричиняти закривання продихів, впливаючи на потенціал-залежні калієві канали і перешкоджаючи надходженню калію у замикаючі клітини. Пізніше було показано, що путресцин як субстрат діаміноксидази може бути задіяний в

індукованому АБК закриванні продихів (An et al., 2008). При цьому припускають, що путресцин виступає ланкою, яка зумовлює зростання вмісту пероксиду водню у замикаючих клітинах і наступне підвищення в них вмісту цитозольного кальцію. Проте дотепер повністю відкритим залишається питання участі різних пулів кальцію у реалізації впливу поліамінів на стан продихів. Слабо вивчена і роль у такому процесі продуктів реакцій, які каталізуються фосфоліпазами *C* і *D*. Зважаючи на це, було досліджено інгібіторним методом можливе значення різних пулів кальцію та компонентів ліпідного сигналіngu в реалізації впливу діаміну путресцину і тетрааміну сперміну на стан замикаючих клітин продихів епідермісу листків гороху (*Pisum sativum* L.).

5.1. Вплив путресцину і сперміну на стан продихів листків гороху

Обробка епідермісу листків гороху путресцином і сперміном спричинювала зменшення розміру апертури продихів (рис. 5.1, 5.2). За дії путресцину у концентраціях 1 і 5 мМ такий ефект виявлявся уже через 60 хв від початку обробки. Менша концентрація цього поліаміну (0,25 мМ) викликала вірогідне зменшення апертури через 120 хв. Максимальний ефект закривання продихів за дії 0,25 і 1 мМ путресцину відзначався через 150 хв від початку обробки, після чого спостерігалася тенденція до незначного збільшення величини продихової щілини (рис. 5.1, *a*). Слід зауважити, у варіанті з обробкою 5 мМ путресцином через 120–150 хв від початку ефект закривання продихів не посилювався. Навпаки, через 120 хв спостерігалася деяке збільшення апертури порівняно з величинами, які реєструвалися через 60 хв.

Вплив сперміну на стан продихів проявлявся динамічніше. Вірогідне зменшення апертури спостерігалася через 60 хв за дії всіх досліджуваних концентрацій (рис. 5.1, *б*). Найменші величини відзначалися через 150 хв інкубації епідермісу у присутності 1 мМ сперміну. Вплив як меншої (0,25 мМ), так і більшої (5 мМ) концентрацій сперміну у цій часовій точці був менш істотним. Надалі, через 180 хв, відзначалася тенденція до незначного

збільшення апертури у варіанті з 1 мМ сперміном. За дії двох інших його концентрацій істотних змін стану продихів у цей час не спостерігали.

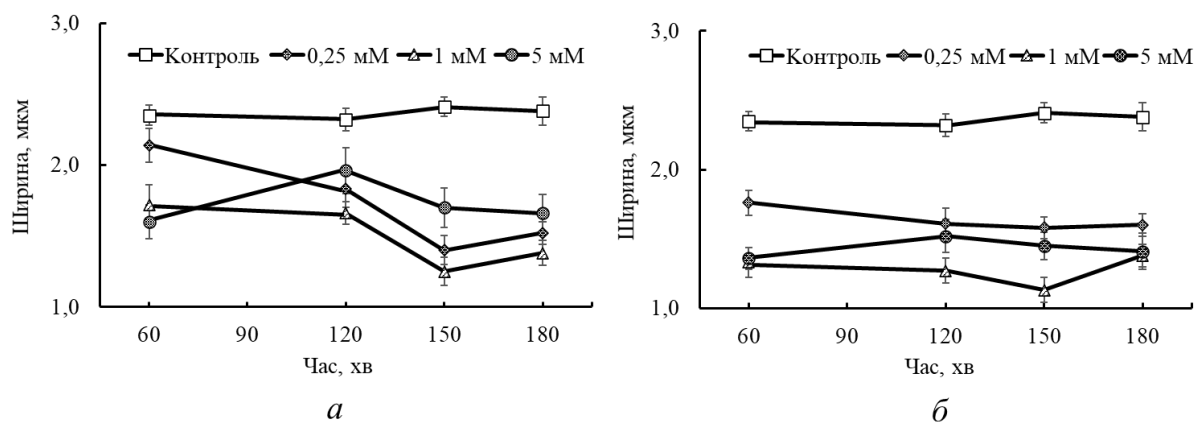


Рис. 5.1. Часова динаміка і концентраційна залежність впливу путресцину (а) і сперміну (б) на величину апертури продихів.

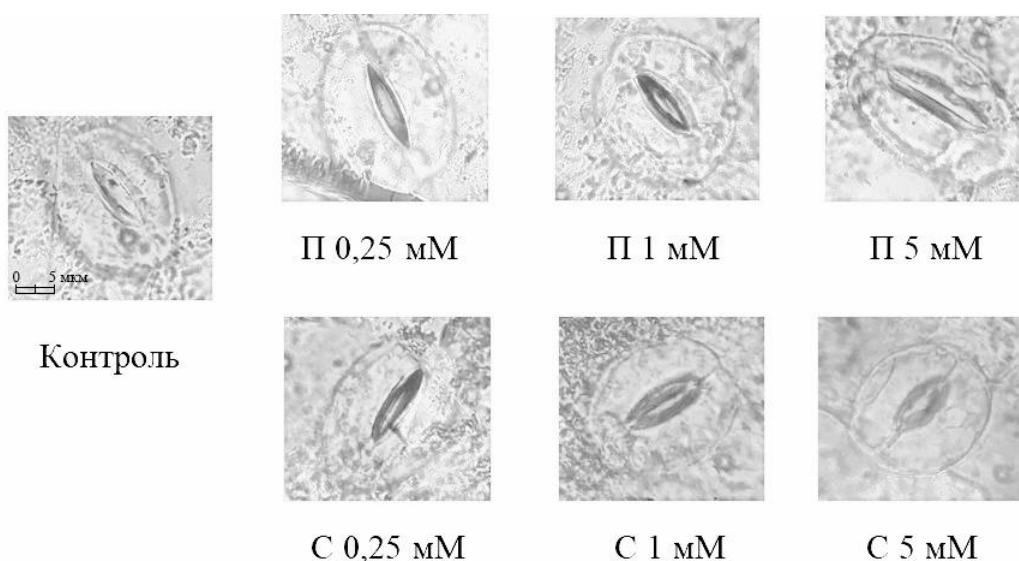


Рис. 5.2. Типовий стан продихів через 150 хв впливу путресцину (П) і сперміну (С) в різних концентраціях.

Загалом динаміка впливу путресцину і сперміну на стан продихів в наших експериментах виявилась схожою з даними, отриманими раніше іншими авторами на епідермісі листків *Vicia faba* (An et al., 2008). У цій роботі відзначено максимальне закривання продихів через 2,5 год від початку обробки

епідермісу 0,5 мМ путресцином або сперміном і стабілізація ефектів за 3 год експерименту.

Таким чином, в цілому найбільш істотний ефект зменшення апертури продихів спостерігався через 150 хв від початку обробки епідермісу путресцином і сперміном в концентрації 1 мМ (рис. 5.1, 5.2). Зважаючи на це, при подальших дослідженнях впливу антагоністів кальцію та інгібіторів фосфоліпаз на прояв ефектів поліамінів на стан продихів їх використовували в концентрації 1 мМ за експозиції 150 хв (Kokorev et al., 2021).

5.2. Сигнальні посередники у реалізації продихових ефектів поліамінів

Інкубація епідермісу листків у розчині неспецифічного блокатора кальцієвих каналів хлориду лантану не викликала змін апертури продихів (рис. 5.3). Обробка хелатором позаклітинного кальцію ЕГТА спричиняла тенденцію до збільшення ступеня відкритості продихів, але цей ефект був вірогідним лише за $p \leq 0,1$. Інкубація в присутності інгібітору фосфоліпази *C* неоміцину, який перешкоджає надходженню кальцію в цитозоль з внутрішньоклітинних компартментів, не викликала змін величини продихових щілин.

Хлорид лантану принаймні частково усував ефект закривання продихів, спричинюваний дією як путресцину, так і сперміну (рис. 5.3). Обробка ЕГТА спричиняла лише тенденцію до зменшення прояву впливу путресцину на стан продихів і дуже слабо впливала на відповідний ефект сперміну. Водночас неоміцин майже повністю нівелював закривання продихів, спричинюване обома поліамінами (рис. 5.3).

Інгібітор залежного від фосфоліпази *D* утворення фосфатидної кислоти *n*-бутанол сам по собі спричиняв тенденцію до збільшення апертури продихів (ефект вірогідний за $p \leq 0,1$). При цьому його неактивний ізомер бутанол-2 на стан продихів не впливав (рис. 5.4).

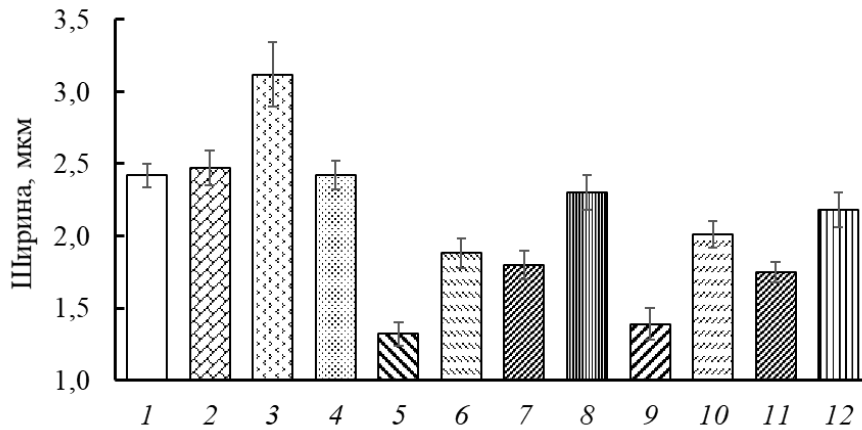


Рис. 5.3. Вплив антагоністів кальцію на прояв дії поліамінів на ширину апертури продихів. 1 – контроль; 2 – LaCl_3 (1 мМ); 3 – ЕГТА (1 мМ); 4 – неоміцин (1 мМ); 5 – путресцин (1 мМ); 6 – путресцин (1 мМ) + LaCl_3 (1 мМ); 7 – путресцин (1 мМ) + ЕГТА (1 мМ); 8 – путресцин (1 мМ) + неоміцин (1 мМ); 9 – спермін (1 мМ); 10 – спермін (1 мМ) + LaCl_3 (1 мМ); 11 – спермін (1 мМ) + ЕГТА (1 мМ); 12 – спермін (1 мМ) + неоміцин (1 мМ).

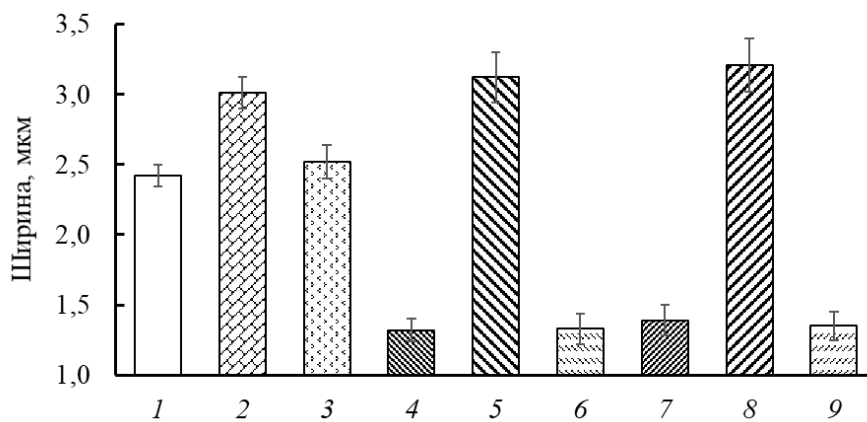


Рис. 5.4. Вплив н-бутанолу і бутанолу-2 на прояв дії поліамінів на ширину апертури продихів. 1 – контроль; 2 – н-бутанол (0,1%); 3 – бутанол-2 (0,1%); 4 – путресцин (1 мМ); 5 – путресцин (1 мМ) + н-бутанол (0,1%); 6 – путресцин (1 мМ) + бутанол-2 (0,1%); 7 – спермін (1 мМ); 8 – спермін (1 мМ) + н-бутанол (0,1%); 9 – спермін (1 мМ) + бутанол-2 (0,1%).

За обробки н-бутанолом вплив путресцину і сперміну на величину продихової щілини не виявлявся. Більше того, її розміри у варіантах з

комбінованою дією *n*-бутанолу та поліамінів були навіть більшими від контролю (рис. 5.4). Натомість у присутності бутанолу-2 ефекти закривання продихів, спричинювані путресцином і сперміном, проявлялися повною мірою.

Отже, отримані результати свідчать про залучення іонів кальцію і компонентів ліпідного сигналіngu в реалізацію впливу поліамінів на стан продихів епідермісу листків гороху. Як уже відзначалося, даних стосовно ролі кальцію у прояві впливу поліамінів на стан продихів дуже мало. У роботі An і співавт. (2008) з використанням флуоресцентного барвника fluo-3 AM зафіксоване транзиторне зростання вмісту цитозольного кальцію через 9–12 хв від початку обробки епідермісу листків бобів 0,5 мМ путресцином. Прямих даних щодо змін концентрації Ca^{2+} в цитозолі замикаючих клітин за дії сперміну у доступних нам літературних джерелах ми не знайшли.

В умовах наших експериментів неспецифічний блокатор кальцієвих каналів $LaCl_3$ помітно нівелював спричинюване дією путресцину і сперміну закривання продихів (рис. 5.3), що вказує на роль надходження кальцію в цитозоль у реалізації продихових ефектів як діаміну путресцину, так і тетрааміну сперміну. Водночас хелатор позаклітинного кальцію ЕГТА спричиняв лише тенденцію до зменшення прояву впливу путресцину на стан продихів і майже не впливав на ефекти сперміну (рис. 5.3). Це свідчить про незначну роль надходження кальцію в цитозоль з позаклітинного простору у реалізації продихових ефектів поліамінів принаймні у даних експериментальних умовах. З іншого боку, неоміцин, який блокує залежний від фосфоліпази *C* синтез інозитол-1,4,5-фосфату ($I\Phi_3$), і може там самим перешкоджати відкриванню внутрішньоклітинних кальцієвих каналів, чутливих до $I\Phi_3$, практично повністю усував прояви впливу обох поліамінів на стан продихів (рис. 5.3). Зауважимо, що у роботі Echevarria-Machado і співавт. (2002) показано, що спермін здатний підвищувати активність фосфоліпази *C* і вміст $I\Phi_3$ у коренях рослин *Catharanthus roseus*.

Однак питання про наявність мішеней $I\Phi_3$ у клітинах рослин і відповідно про його роль у регуляції кальцієвого гомеостазу залишаються предметом

дискусії (Iakovenko et al., 2008b). Це не дозволяє однозначно інтерпретувати результати експериментів з використанням неоміцину як інгібітору синтезу ІФ₃. Проте є прямі експериментальні докази зменшення надходження кальцію в цитозоль рослинних клітин під впливом неоміцину. Наприклад, обробка неоміцином знімала ефект підвищення концентрації іонів кальцію в клітинах тютюну, спричинюваний дією еліситора кріптогеїну (Lescourieux et al., 2002). Нівелювання неоміцином закривання продихів, індукованого АБК, також пов'язують з порушенням надходження кальцію в цитозоль, залежного від вмісту ІФ₃ і активності фосфоліпази *C* (Iakovenko et al., 2008a). Але не виключено, що зміна вмісту ІФ₃ не єдиний шлях впливу неоміцину як інгібітору фосфоліпази *C* на сигнальні процеси, що можуть бути задіяні у регуляції стану продихів. Так, інший посередник, який утворюється за участю фосфоліпази *C* – діацилгліцерол, в рослинних клітинах вважається одним із попередників фосфатидної кислоти (Arisz et al., 2013). Крім того, фосфатидилінозитолбісфосфат, який зв'язується неоміцином, є кофактором фосфоліпази *D* і також бере участь в утворенні фосфатидної кислоти (Parran et al., 1997). Отже, інгібування фосфоліпази *C* може призводити до зменшення синтезу фосфатидної кислоти.

Є відомості, що фосфатидна кислота здатна безпосередньо викликати ефект закривання продихів, інгібуючи калієві канали, якими іони K^+ надходять у замикаючі клітини, так звані inward-rectifying K^+ -канали (K^+_{in}) (Uraji et al., 2012). Також молекулярно-генетичними методами показано, що фосфатидна кислота виконує функцію інтермедіату, необхідного для реалізації впливу АБК і саліцилової кислоти на стан продихів, при цьому у сигнальному шляху вона перебуває вище від пероксиду водню (Kravets et al., 2010; Kalachova et al., 2013).

Припущення про можливе значення фосфатидної кислоти у реалізації впливу поліамінів на стан продихів узгоджується з виявленим нами феноменом повного усунення спричинюваного поліамінами закривання продихів за дії н-

бутанолу – інгібітору залежного від фосфоліпази *D* утворення фосфатидної кислоти (рис. 5.4).

На проростках кукурудзи показано значне підвищення активності фосфоліпази *D* за дії екзогенного путресцину і менш істотне за обробки сперміном (An et al., 2012). На цьому ж об'єкті встановлено, що обробка н-бутанолом призводила до збільшення втрат води листками за дії ПЕГ. На рослинах арабідопсису показано, що путресцин викликав закривання продихів у рослин дикого типу, але не у мутанта, дефектного за однією з форм фосфоліпази *D* – *plda1* (Qu et al., 2014). За даними авторів, фосфатидна кислота може бути компонентом сигнального шляху путресцину, який активує НАДФН-оксидазу – джерело АФК, необхідне для закривання продихів. Проте не можна виключити і вплив фосфатидної кислоти на кальцієвий гомеостаз. На модельних системах – везикулах плазмалемі клітин колеоптилів кукурудзи та протопластах клітин коренів арабідопсису – показано посилення під впливом екзогенної фосфатидної кислоти транспорту іонів Ca^{2+} , що дозволило авторам припустити її значення у регуляції кальцієвого гомеостазу (Medvedev et al., 2019).

Дані про вплив сперміну на активність фосфоліпази *D* у зв'язку з його продиховими ефектами у літературі відсутні, проте недавно встановлено, що він може індукувати утворення фосфатидної кислоти в коренях арабідопсису (Zarza et al., 2019).

Таким чином, отримані результати вказують на ймовірне залучення компонентів ліпідного сигналіngu – фосфатидної кислоти та ІФ₃ – у реалізацію впливу поліамінів на стан продихів. Також дані інгібіторного аналізу можуть свідчити про роль надходження кальцію в цитозоль у процесі закривання продихів, індукованого дією путресцину і сперміну. При цьому, ймовірно, що більш важливим для цього процесу є надходження іонів Ca^{2+} з внутрішньоклітинних компартментів, а не з позаклітинного простору, оскільки хелатор кальцію ЕГТА слабо впливав на продихові ефекти поліамінів. Роль функціональних зв'язків між сигнальними інтермедіатами, що утворюються за

участю фосфоліпаз *C* і *D*, та кальцієвим гомеостазом за дії поліамінів на продиховий апарат потребує спеціальних досліджень із залученням методів безпосереднього визначення вмісту іонів Ca^{2+} та інших посередників у замикаючих клітинах. Також необхідно відзначити, що поліаміни поки що не вважаються «самостійними» регуляторами продихового апарату, але розглядаються як посередники у реалізації впливу АБК на стан продохів (An et al., 2012). Проте так чи інакше, зв'язок поліамінів з NO-, АФК і ліпідним сигналінгом, а також їх ймовірний вплив на кальцієвий гомеостаз дає підстави говорити про можливість залучення цих сполук в регуляцію стану продохів.

Висновки до розділу 5

Отримані результати вказують на участь поліамінів у регуляції стану продохів у рослин. Показано, що інкубація епідермісу листків гороху в середовищі з додаванням путресцину або сперміну в концентраціях діапазону 0,25–5 мМ спричиняла зменшення величини продихової апертури. Такий ефект відзначався через 1 год від початку інкубації, а найбільш вираженим був через 2,5 год експозиції в середовищі, що містило 1 мМ путресцин або спермін.

Вплив поліамінів на функціонування продихового апарату є кальційзалежним. У присутності блокатора кальцієвих каналів LaCl_3 вплив путресцину і сперміну на стан продохів виявлявся слабо. Їх ефекти частково нівелювалися хелатором позаклітинного кальцію ЕГТА, проте повністю усувалися інгібітором фосфоліпази *C* неоміцином.

Отримано дані вказують на причетність компонентів ліпідного сигналінгу до регуляторного впливу поліамінів на стан продохів. Вплив путресцину і сперміну на величину апертури продохів не виявлявся у присутності *n*-бутанолу – інгібітору залежного від фосфоліпази *D* утворення фосфатидної кислоти, але не його неактивного ізомеру бутанолу-2.

В цілому отримані результати свідчать про можливу роль надходження кальцію в цитозоль з внутрішньоклітинних компартментів та значення

сигнальних інтермедіатів, що утворюються за участю фосфоліпаз *C* і *D*, в реалізації продигових ефектів поліамінів.

ВИСНОВКИ

Дисертаційна робота розширює фундаментальні знання про феноменологію і механізми стрес-протекторної дії поліамінів у рослин. У ній показано значення АФК, іонів кальцію, оксиду азоту та сірководню, а також функціональної взаємодії між сигнальними посередниками у реалізації захисних ефектів поліамінів за впливу на рослини абіотичних стресорів (гіпертермії та зневоднення).

1. Встановлено ефект підвищення стійкості проростків пшениці до потенційно летального теплового стресу за обробки путресцином, кадаверином і сперміном. Позитивний ефект тетрааміну сперміну був більш помітним порівняно з дією діамінів.

2. Одним із механізмів стрес-протекторної дії поліамінів на рослини є посилення функціонування антиоксидантної системи. За дії діамінів і тетраамінів відзначалося підвищення активності антиоксидантних ферментів СОД, каталази і гваяколпероксидази в коренях і пагонах проростків пшениці за фізіологічно нормальних і стресових умов.

3. Індукування теплостійкості проростків пшениці дією поліамінів залежить від генерації АФК. Під впливом путресцину і кадаверину спостерігалось транзиторне збільшення в коренях вмісту пероксиду водню. Такий ефект усувався обробкою інгібітором діаміноксидази аміногуанідином. Водночас обробка інгібітором НАДФН-оксидази імідазолом частково нівелювала підвищення вмісту H_2O_2 , спричинюване дією путресцину і не впливала на ефекти кадаверину. Обробка проростків скавенджером пероксиду водню ДМТС і аміногуанідином усувала захисний вплив путресцину та кадаверину за умов гіпертермії. Водночас обробка інгібітором НАДФН-оксидази імідазолом знімала стрес-протекторний ефект путресцину, але слабо впливала на прояв такого ефекту кадаверину. Це свідчить про відмінності внеску

окремих ферментативних систем, що генерують АФК, в реалізацію фізіологічних ефектів різних поліамінів.

4. Стрес-протекторний вплив путресцину на проростки пшениці реалізується з участю оксиду азоту. Встановлено, що обробка проростків путресцином викликала швидке і транзиторне підвищення вмісту NO в коренях. При цьому відзначалося різке збільшення активності діаміноксидази. Інгібітор ДАО аміногуанідин повністю усував підвищення вмісту NO, спричинюване путресцином, що вказує на участь цього ферменту в генерації NO. Антагоністи NO усували захисну дію путресцину на проростки пшениці при тепловому стресі.

5. Спричинюване путресцином посилення генерації АФК і оксиду азоту в коренях проростків, а також його протекторні ефекти при тепловому стресі залежать від кальцієвого гомеостазу. Такі ефекти повністю усувались хелатором позаклітинного кальцію ЕГТА та частково інгібітором надходження кальцію в цитозоль з внутрішньоклітинних компартментів неоміцином.

6. Показано участь сірководню як посередника у реалізації захисної дії путресцину на проростки пшениці при тепловому стресі. За дії путресцину відзначалося транзиторне підвищення вмісту H_2S в коренях. Обробка інгібітором основного ферменту синтезу H_2S (L-цістеїндесульфгідрази) піруватом калію частково знімала ефекти зростання активності антиоксидантних ферментів та підвищення виживаності проростків після ушкоджуючого прогріву. Натомість за комбінованої обробки проростків путресцином і донором сірководню NaHS їх стрес-протекторні ефекти посилювалися.

7. Під впливом путресцину і сперміну пом'якшувалася рістінгібуюча дія зневоднення на етіюльовані проростки пшениці. За обробки поліамінами посилювався ріст пагонів і коренів в умовах дії ПЕГ 6000, збільшувалося співвідношення маса проростків/маса коренів.

8. Обприскування дорослих рослин пшениці путресцином і сперміном в концентраціях діапазону 0,25-5 мМ істотно зменшувало рістінгібуючий вплив

грунтової посухи, дія сперміну була менш ефективною. Путресцин помітно знижував прояв водного дефіциту, спричинюваний посухою.

9. Обробка поліамінами модифікувала зміни вмісту низькомолекулярних протекторів (проліну, цукрів, вторинних метаболітів) в етіюльованих проростках пшениці за дії осмотичного стресу, спричинюваного ПЕГ 6000, та у листках дорослих рослин за умов ґрунтової посухи.

10. Інкубація епідермісу листків гороху в присутності путресцину або сперміну в концентраціях діапазону 0,25–5 мМ спричиняла істотне зменшення величини продихової апертури. Інгібіторним методом показано значення надходження кальцію в цитозоль з внутрішньоклітинних компартментів та участь сигнальних інтермедіатів, що утворюються за допомогою фосфоліпаз C і D, в реалізації продихових ефектів поліамінів.

СПИСОК ВИКОРСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- Альтергот, В. Ф. (1981). Действие повышенной температуры на растение в эксперименте и природе. *40-е Тимиряз. чт. Москва*, 57.
- Веденичова Н.П., Косаківська І.В. (2017). Цитокиніни як регулятори онтогенезу рослин за різних умов зростання. *К.: Наш формат*, 200.
- Галеева, Е. И., Трифонова, Т. В., Пономарева, А. А., Викторова, Л. В., Минибаева, Ф. В. (2012). Нитратредуктаза листьев *Triticum aestivum*: регуляция активности и возможная роль в образовании оксида азота. *Биохимия*, 77(4), 512–520.
- Гончарова, Э. А. (2005). Водный статус культурных растений и его диагностика. *С.-Петербург*, 112.
- Карпец Ю. В., Колупаев Ю. Е., Ястреб Т. О., Луговая А. А., Заярная Е. Ю. (2016). Влияние фунгицида седаксан на устойчивость растений пшеницы (*Triticum aestivum* L.) различных экотипов к почвенной засухе. *Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія*. 3 (39), 39–47.
- Кірізій, Д. А., Шадчина, Т. М., Стасик, О. О., Прядкіна, Г. О., Соколовська-Сергієнко, О. Г., Гуляев, Б. І., Ситник, С. К. (2011). Особливості фотосинтезу і продукційного процесу у високоінтенсивних генотипів озимої пшениці. *Київ: Основа*, 416.
- Кокорев, О. І., Шклярєвський, М. А., Швиденко, М. В., Колупаєв, Ю. Є. (2020). Стрес-протекторний вплив путресцину і сперміну на рослини пшениці за ґрунтової посухи. *Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія*, 3(51), 58–70.
- Колупаєв, Ю. Є., Вайнер А. О., Ястреб Т. О. (2014). Пролин: физиологические функции и регуляция содержания в растениях в стрессовых условиях. *Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія*, 2(32), 6–22.
- Колупаєв, Ю. Е., Карпец, Ю. В., Ястреб, Т. О., Фирсова, Е. Н. (2017). Защитное действие ингибиторов сукцинатдегидрогеназы на проростки пшеницы

- при осмотическом стрессе. *Прикл. биохимия и микробиология.*, 53(3), 316–322.
- Колупаев, Ю. Е. Обозный, А. И. (2012). Участие активных форм кислорода в индуцировании аскорбатпероксидазы и гваяколпероксидазы при тепловом закаливании проростков пшеницы. *Український біохімічний журнал*, 84(6), 131–138.
- Колупаев, Ю.Е., & Карпец, Ю.В. (2014). Активные формы кислорода и стрессовый сигналинг у растений. *Ukr. Biochem. J.*, 86(4), 18–35.
- Колупаев, Ю.Е., Кокорев, А. И. (2019). Антиоксидантная система и устойчивость растений к недостатку влаги. *Физиология растений и генетика*, 51(1), 28–54. doi.org/10.15407/frg2019.01.028
- Козеко Л. Є., & Кордюм Є. Л. (2021). Використання білків теплового шоку HSP70 для індикації стану рослин природних фітоценозів: підходи та проблеми. *Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія*, 2(53), 23–40.
- Коць, С. Я., Кириченко, О. В., Павлице, А. В. (2021). Вміст кадаверину в сої, інокульованій бульбочковими бактеріями за дії фунгіцидів. *Актуальні проблеми фізіології рослин і генетики: матеріали Міжнародної наукової конференції, присвяченої 75-річчю Інституту фізіології рослин і генетики НАН України. К.*, 70–73.
- Кузнецов, Вл. В., & Шевякова, Н. И. (1999). Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция. *Физиология растений*, 46, 321.
- Лакин, Г. Ф. (1980). Биометрия. М., 293.
- Маменко, Т. П., & Ярошенко, О. А. (2012). Реакція антиоксидантної системи контрастних за посухостійкістю сортів озимої пшениці на водний дефіцит. *Физиология и биохимия культ. растений.*, 44(4), 323–330. (In Ukrainian).
- Мелехов, Е. И., & Ефремова, Л. К. (1990). Влияние экзогенных фитогормонов на устойчивость растительных клеток к нагреву и 2,4-Д. *Физиология растений*, 37(3), 561–568.

- Соловьян, В. Т. (1990). Приспособление клеток к неблагоприятным факторам. Характеристика адаптивных ответов. *Биополимеры и клетка*, 6(4), 32–42.
- Терпелец В. И., Слюсарев В. Н. (2010). Учебно-методическое пособие по изучению агрофизических и агрохимических методов исследования почв. Краснодар: КубГАУ, 65.
- Шлык, А. А. (1971). Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев. О. А. Павлинова (ред.), *Биохимические методы в физиологии растений*. М.: Наука.
- Abbasi, N. A., Ali, I., Hafiz, I. A., Khan, A. S. (2017). Application of polyamines in horticulture: A review. *International Journal of Biosciences*, 10(5), 319–342.
- Acharya, B. R., and Assmann, S. M. (2009). Hormone interactions in stomatal function. *Plant Mol. Biol.*, 69(4), 451–462.
- Agurla, S., Gayatri, G., Raghavendra, A. S. (2018). Polyamines increase nitric oxide and reactive oxygen species in guard cells of *Arabidopsis thaliana* during stomatal closure. *Protoplasma.*, 255(1), 153–162.
- Ahuja, I., de Vos, R.C.H., Bones, A. M., Hall, R.D. (2010). Plant molecular stress responses face climate change. *Trends in Plant Science.*, 15(12), 665–683.
- Alcázar, R., Bueno, M., Tiburcio, A. F. (2020). Polyamines: small amines with large effects on plant abiotic stress tolerance. *Cells*, 9(11), 2373. doi: 10.3390/cells9112373
- Alcázar, R., Cuevas, J. C., Patron, M., Altabella, T., Tiburcio, A. F. (2006). Abscisic acid modulates polyamine metabolism under water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.*, 128, 448–455.
- Alet, A. I., Sanchez, D. H., Cuevas, J. C., del Valle, Se., Altabella, T., Tiburcio, A. F., Marco, F., Ferrando, A., Espasandín, F.D., González, M. E., Ruiz, O. A., Carrasco, P. (2011). Putrescine accumulation in *Arabidopsis thaliana* transgenic lines enhances tolerance to dehydration and freezing stress. *Plant Signal. Behav.*, 6(2), 278–286.

- Allakhverdiev, S., Kreslavski, V., Klimov, V., Los, D., Carpentier, R., Mohanty, P. (2008). Heat stress: An overview of molecular responses in photosynthesis. *Photosynth. Res.*, 98, 541–550.
- Alsokari, S. S. (2011). Synergistic effect of kinetin and spermine on some physiological aspects of seawater stressed *Vigna sinensis* plants. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18, 37–44.
- An, Z. F., Li, C. Y., Zhang, L. X., and Alva, A. K. (2012). Role of polyamines and phospholipase D in maize (*Zea mays* L.) response to drought stress. *S. Afr. J. Bot.*, 83, 145–150. doi: 10.1016/j.sajb.2012.08.009
- An, Z., Jing, W., Liu, Y., Zhang, W. (2008). Hydrogen per-oxide generated by copper amine oxidase is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *J. Exp. Bot.*, 59(4), 815–825.
- Andronis, E. A., Moschou, P. N., Toumi, I., Roubelakis-Angelakis, K. A. (2014). Peroxisomal polyamine oxidase and NADPH-oxidase cross-talk for ROS homeostasis which affects respiration rate in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.*, 5, 132.
- Angelini, R., Cona, A., Federico, R., Fincato, P., Tavladoraki, P., Tisi, A. (2010). Plant amine oxidases “on the move”: an update. *Plant Physiol Biochem.*, 48, 560–564.
- Arisz, S. A., Wijk, R., Roels, W., Zhu, J. K., Haring, M. A., and Munnik, T. (2013). Rapid phosphatidic acid accumulation in response to low temperature stress in *Arabidopsis* is generated through diacylglycerol kinase. *Front. Plant Sci.*, 4, 1. doi: 10.3389/fpls.2013.00001
- Aronova, E. E., Shevyakova, N. I., Stetsenko, L. A., Kuznetsov, Vl. V. (2005). Cadaverine-induced induction of superoxide dismutase gene expression in *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Dokl. Biol. Sci.*, 403(1-6), 257–259.
- Asgher, M., Per, T.S., Masood, A. et al. (2017). Nitric oxide signaling and its crosstalk with other plant growth regulators in plant responses to abiotic stress. *Environ Sci Pollut Res*, 24, 2273–2285. doi: 10.1007/s11356-016-7947-8

- Asthir, B., Kumar, R., Bains, N. S. (2018). Why and how putrescine modulates thermotolerance in wheat? *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics.*, 55(6), 404–412.
- Bates, L. S., Walden, R. P., Tear, G. D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil.*, 39, 205–210.
- Bernfur, K., Rutsdottir, G., Emanuelsson, C. (2017). The chloroplast-localized small heat shock protein Hsp21 associates with the thylakoid membranes in heat-stressed plants. *Protein Sci.*, 26, 1773–1784. doi: 10.1002/pro.3213
- Bienert, G. P., Møller, A. L. B., Kristiansen, K. A., Schulz, A., Møller, I. M., Schjoerring, J. K., Jahn, T. P. (2007). Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J Biol Chem*, 282, 1183–1192.
- Bose, J., Pottosin, I. I., Shabala, S. S., Palmgren, M. G., and Shabala, S. (2011). Calcium efflux systems in stress signaling and adaptation in plants. *Front. Plant Sci.*, 2, 85. doi: 10.3389/fpls.2011.00085
- Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F., Martin-Tanguy, J. (1999). Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci.*, 140(2), 103–125.
- Brosché, M., Merilo, E., Mayer, F., Pechter, P., Puzõrjova, I., Brader, G., Kangasjärvi, J., and Kollist H. (2010). Natural variation in ozone sensitivity among *Arabidopsis thaliana* accessions and its relation to stomatal conductance. *Plant Cell Environ.*, 33(6), 914–925.
- Cai, Q., Zhang, J., Guo, C., and Al, E. (2006). Reviews of the physiological roles and molecular biology of polyamines in higher plants. *J. Fujian Educ. Coll.*, 7, 118–124. doi: 10.3969/j.issn.1673-9884.2006.10.039
- Cavusoglu, K., Kabar, K. (2007). Comparative effects of some plant growth regulators on the germination of barley and radish seeds under high temperature stress. *EurAsian Journal of BioSciences.*, 1(1), 1–10.
- Chasov, A. V., Minibayeva, F. V. (2014). Methodological approaches for studying apoplasmic redox activity: 1. Mechanisms of peroxidase release. *Russ J Plant Physiol.*, 61(4), 556–563.

- Chaves, M. M., & Oliveira, M. M. (2004). Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: Prospects for water saving agriculture. *J. Exp. Bot.*, *55*, 2365–2384. doi: 10.1093/jxb/erh269
- Chen D, Shao Q, Yin L, Younis A, Zheng B (2019) Polyamine function in plants: metabolism, regulation on development, and roles in abiotic stress responses. *Frontiers of Plant Science* *9*, 1945.
- Cheng, D. G., Kao, C. H. (2010). Effects of exogenous spermine on polyethylene glycol-induced responses in rice leaves. *Crop Environ. Bioinform.*, *7*, 233–242.
- Cheng, L., Zou, Y., Ding, S., Zhang, J., Yu, X., Cao, J., Lu, G. (2009). Polyamine accumulation in transgenic tomato enhances the tolerance to high temperature stress. *J. Integr. Plant Biol.*, *51*(5), 489–499. doi: 10.1111/j.1744-7909.2009.00816.x
- Choudhury, F. K., Rivero, R. M., Blumwald, E., Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *Plant J.*, *90*, 856–867. doi: 10.1111/tpj.13299
- Corpas, F. J., Barroso, J. B. (2017). Nitric oxide synthase-like activity in higher plants. *Nitric Oxide.*, *68*, 5–6.
- Courtois, C., Besson, A., Dehan, J., Bourque, S., Dobrowolska, G., Pugin, A., Wendehenne, D. (2008). Nitric oxide signalling in plants: interplays with Ca²⁺ and protein kinases. *J. Exp. Bot.*, *59*, 155–163.
- Dawood, M. F. A., Abeed, A. H. A. (2020). Spermine-priming restrained water relations and biochemical deteriorations prompted by water deficit on two soy-bean cultivars. *Heliyon*, *6*, e04038.
- de Carvalho, M. H. C. (2008). Drought stress and reactive oxygen species. Production, scavenging and signaling. *Plant Signal. Behav.*, *3*, 156–165.
- De Oliveira, L. F., Navarro, B. V., Cerruti, G., and Al, E. (2018). Polyamines and amino acid related metabolism: the roles of arginine and ornithine are associated with the embryogenic potential. *Plant Cell Physiol*, *59*, 1084–1098. doi: 10.1093/pcp/pcy049

- Demidchik, V., Maathuis, F. J. M. (2007). Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytologist.*, *175*, 387–404. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02128.x
- Diao, Q., Song, Y., Shi, D., Qi, H. (2017). Interaction of polyamines, abscisic acid, nitric oxide, and hydrogen peroxide under chilling stress in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedlings. *Front Plant Sci*, *8*, 203.
- Dobrovinskaya, O. R., Muniz, J., Pottosin, I. (1999). Inhibition of vacuolar ion channels by polyamines. *J. Membr. Biol.*, *167*, 127–140.
- Dubovskaya, L. V., Kolesneva, E. V., Knyazev, D. M. et al. (2007). Protective role of nitric oxide during hydrogen peroxide-induced oxidative stress in tobacco plants. *Russ J Plant Physiol*, *54*, 755–762. doi: 10.1134/S1021443707060064
- Ebeed, H. T., Hassan, N. M., and Aljarani, A. M. (2017). Exogenous applications of Polyamines modulate drought responses in wheat through osmolytes accumulation, increasing free polyamine levels and regulation of polyamine biosynthetic genes. *Plant Physiol. Biochem.*, *118*, 438–448. doi: 10.1016/j.plaphy.2017.07.014
- Echevarría-Machado, I., Ku-Gonzalez, A., Loyola-Vargas, V. M., Hernandez-Sotomayor, S. M. (2004). Interaction of spermine with a signal transduction pathway involving phospholipase C, during the growth of *Catharanthus roseus* transformed roots. *Physiol. Plant.*, *120*, 140–151. doi: 10.1111/j.0031-9317.2004.0212.x
- Echevarria-Machado, I., Munoz-Sánchez, A., Loyola-Vargas, V. M., and Hernandez-Sotomayor, S. M. T. (2002). Spermine stimulation of phospholipase C from *Catharanthus roseus* transformed roots. *J. Plant Physiol.*, *159*(11), 1179–1188. doi: 10.1078/0176-1617-00893
- Edreva, A., Yordanov, I., Kardjieva, R., Gesheva, E. (1998). Heat shock responses of bean plants: involvement of free radicals, antioxidants and free radical/active oxygen scavenging systems. *Biologia Plantarum.*, *41*(2), 185–191. doi: 10.1023/A:1001846009471

- Fahad, Sh., Bajwa, A. A. Nazir, U., Anjum, Sh. A., Farooq, A., Zohaib, A., Sadia, S., Nasim, W., Adkins, S., Saud, Sh., Ihsan, M. Z., Alharby, H., Wu, Ch., Wang, D., Huang, J. (2017). Crop production under drought and heat stress: plant responses and management. *Front Plant Sci.*, 8, 1147. doi: [org/10.3389/fpls.2017.01147](https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01147)
- Farnese, F. S., Menezes-Silva, P. E., Gusman, G. S., and Oliveira, J. A. (2016). When bad guys become good ones: the key role of reactive oxygen species and nitric oxide in the plant responses to abiotic stress. *Front. Plant Sci.*, 7, 471. doi: [10.3389/fpls.2016.00471](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00471)
- Farooq, M., Wahid, A., Lee, D. J. (2009). Exogenously applied polyamines increase drought tolerance of rice by improving leaf water status, photosynthesis and membrane properties. *Acta Physiol. Plant.*, 31, 937–945.
- Fazlieva, E. R., Kiseleva, I. S., & Zhuikova, T. V. (2012). Antioxidant activity in the leaves of *Melilotus albus* and *Trifolium medium* from man-made disturbed habitats in the Middle Urals under the influence of copper. *Russ. J. Plant Physiol.*, 59, 333–338. doi: [10.1134/S1021443712030065](https://doi.org/10.1134/S1021443712030065)
- Folli-Pereira, M. S., Ramos, A. C., Bertolazi, A. A., Passamani, L. Z., Eutrópico, F. J., Conceição, J. M., Rasool, N. (2016). Water stress and higher plants: An overview. In: *Water Stress and Crop Plants: A Sustainable Approach, First Edition*. Ed. Parvaiz Ahmad., 422 – 451.
- Fraudentali, I., Rodrigues-Pousada, R. A., Angelini, R., Ghuge, S. A., Cona, A. (2021). Plant Copper Amine Oxidases: Key Players in Hormone Signaling Leading to Stress-Induced Phenotypic Plasticity. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(10), 5136. doi: [10.3390/ijms22105136](https://doi.org/10.3390/ijms22105136)
- Gautam, V., Kaur, R., Kohli, S. K., Verma, V., Kaur, P., Singh, R., Saini, P., Arora, S., Thukral, A. K., Karpets, Yu. V., Kolupaev, Yu. E., Bhardwaj, R. (2017). ROS Compartmentalization in Plant Cells Under Abiotic Stress Condition. In: M. Khan, N. Khan (Eds.), *Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation under Abiotic Stress*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5254-5_4

- Gerten, D., Schaphoff, S. & Lucht, W. (2007). Potential future changes in water limitations of the terrestrial biosphere. *Climatic Change*, 80(3-4), 277–299. doi: 10.1007/s10584-006-9104-8
- Ghosh, N., Das, S. P., Mandal, C., Gupta, S., Das, K., Dey, N., Adak, M. K. (2012). Variations of antioxidative responses in two rice cultivars with polyamine treatment under salinity stress. *Physiol. Mol. Biol. Plants.*, 18(4), 301–313.
- Gill, S. S., Tuteja, N. (2010). Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signal. Behav.*, 5, 26–33.
- Glyan'ko, A. K., Ischenko, A. A. (2010). Structural and functional characteristics of plant NADPH oxidase: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology.*, 46(5), 463–471. doi: 10.1134/S0003683810050017
- Glyan'ko, A. K., Mitanova, N. B., Stepanov, A. V. (2012). Influence of environmental factors on the generation of nitric oxide in the roots of etiolated pea seedlings. *Applied Biochemistry and Microbiology.*, 48(1), 95–102.
- Groppa, M. D., Benavides, M. P. (2008). Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids.*, 34(1), 35–45.
- Groß, F., Rudolf, E. E., Thiele, B., Durner, J., Astier, J. (2017). Copper amine oxidase 8 regulates arginine-dependent nitric oxide production in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.*, 68, 2149–2162.
- Grzesiak, M., Filek, M., Barbasz, A., Kreczmer, B. Hartikainen, H. (2013). Relationships between polyamines, ethylene, osmoprotectants and antioxidant enzymes activities in wheat seedlings after short-term PEG- and NaCl-induced stresses. *Plant Growth Regul.*, 69, 177–189.
- Guo, Y., Yang, R., Chen, H., Song, Y., Gu, Z. (2012). Accumulation of γ -aminobutyric acid in germinated soybean (*Glycine max* L.) in relation to glutamate decarboxylase and diamine oxidase activity induced by additives under hypoxia. *European Food Research and Technology.*, 234, 679–687. doi: 10.1007/s00217-012-1678-y
- Gupta, K. J., and Kaiser, W. M. (2010). Production and scavenging of nitric oxide by barley root mitochondria. *Plant Cell Physiol.*, 51(4), 576–584.

- Gupta, K. J., Hancock, J. T., Petrivalsky, M., Kolbert, Z., Lindermayr, C., Durner, J., Barroso, J. B., Palma, J. M., Brouquisse, R., Wendehenne, D., et al. (2020). Recommendations on terminology and experimental best practice associated with plant nitric oxide research. *New Phytol.*, 225, 1828–1834.
- Gupta, K., Dey, A., Gupta, B. (2013). Plant polyamines in abiotic stress responses. *Acta Physiol. Plant.* 35, 2015–2036.
- Gupta, S., Agarwal, V. P., Gupta, N. K. (2012). Efficacy of putrescine and benzyladenine on photosynthesis and productivity in relation to drought tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Physiol. Mol. Biol. Plants.*, 18, 331–336.
- Ha, H. C., Sirisoma, N. S., Kuppusamy, P., Zweier, J. L., Woster, P. M., Casero, R. A. Jr. (1998). The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 95, 11140–11145. doi: 10.1073/pnas.95.19.11140
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam, M. M., Roychowdhury, R., Fujita, M. (2013). Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *Int J Mol Sci*, 14(5), 9643–84.
- Hausman, J. F., Kevers, C., Gaspari, T. (1995). Putrescine control of peroxidase activity in the inductive phase of rooting in poplar shoots in vitro, and the adversary effect of spermidine. *J Plant Physiol.*, 146(5-6), 681–685.
- Hung, K. T., Hsu, Y. T., Kao, C. H. (2006). Hydrogen peroxide is involved in methyl jasmonate induced senescence of rice leaves. *Physiologia Plantarum.*, 127(2), 293–303. doi: 10.1111/j.1399-3054.2006.00662.x
- Hussain, S. S., Ali, M., Ahmad, M., Siddique, K. H. M. (2011). Polyamines: Natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Biotechnol. Adv.*, 29(3), 300–311. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.01.003
- Iakovenko, O. M., Kretynin, S. V., and Kravets, V. S. (2008b). Molecular basis of phosphoinositide-specific phospholipase C signaling pathways in plant cells. *Biopolym. Cell*, 24(6), 441–452.

- Iakovenko, O. M., Kretynin, S. V., Kabachevskaya, E. M., Lyakhnovich, G. V., Volotovski, D. I., Kravets, V. S. (2008a). Role of phospholipase C in ABA regulation of stomata function. *Ukr. Botan. J.*, *65*(4), 605–613.
- Jing, J., Guo, S., Li, Y., & Li, W. (2020). The alleviating effect of exogenous polyamines on heat stress susceptibility of different heat resistant wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–12.
- Kalachova, T., Iakovenko, O., Kretinin, S., and Kravets, V. (2013). Involvement of phospholipase D and NADPH-oxidase in salicylic acid signaling cascade. *Plant Physiol. Biochem.*, *66*, 127–133. doi: 10.1016/j.plaphy.2013.02.006
- Karpets, Yu. V., Kolupaev, Yu. E., Lugovaya, A. A., Shvidenko, N. V., Shkliarevskiy, M. A., and Yastreb, T. O. (2020). Functional Interaction of ROS and Nitric Oxide during Induction of Heat Resistance of Wheat Seedlings by Hydrogen Sulfide Donor. *Russ J Plant Physiol*, *67*, 653–651.
- Karpets, Yu. V., Kolupaev, Yu. E., Yastreb, T. O., and Oboznyi, A. I. (2016). Induction of Heat Resistance in Wheat Seedlings by Exogenous Calcium, Hydrogen Peroxide, and Nitric Oxide Donor: Functional Interaction of Signal Mediators. *Russ J Plant Physiol*, *63*, 490–498.
- Karpets, Yu. V., Kolupaev, Yu. E., Yastreb, T. O., Dmitriev, O. P. (2012). Possible pathways of heat resistance induction in plant cells by exogenous nitrogen oxide. *Cytology and Genetics.*, *46*(6), 354–359. doi: 10.3103/S0095452712060059
- Karpets, Yu. V., Kolupaev, Yu. E., Yastreb, T. O., Oboznyi, A. I. (2015). Effects of NO-status modification, heat hardening, and hydrogen peroxide on the activity of antioxidant enzymes in wheat seedlings. *Russian Journal of Plant Physiology.*, *62*(3), 292–298. doi: 10.1134/S1021443715030097
- Kasukabe, Y., He, L., Watakabe, Y., Otani, M., Shimada, T., Tachibana, S. (2006). Improvement of environmental stress tolerance of sweet potato by introduction of genes for spermidine synthase. *Plant Biotechnol.*, *23*, 75–83. doi: 10.5511/plantbiotechnology.23.75

- Kaur, G., & Asthir, B. (2015). Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. *Biol. Plant.* 59(4), 609–619. doi: 10.1007/s10535-015-0549-3
- Kaur-Sawhney, R., Tiburcio, A. F., Altabella, T., Galston A. W. (2003). Polyamines in plants: An overview. *J. Cell Mol. Biol.*, 2, 1–12.
- Khan, A. S., Singh, Z., Abbasi, N. A., Swinny, E. E. (2008). Pre or post harvest application of putrescine and low temperature storage affect fruit ripening and quality of ‘angelina’ plum. *J Sci Food Agricult*, 88, 1686–1695. doi: 10.1002/jsfa.3265
- Khlestkina, E. K. (2013). The adaptive role of flavonoids: emphasis on cereals. *Cereal Res. Commun.* 41, 185–198.
- Khosrowshahi, Z. T., Slehi-Lisar, S. Y., Ghassemi-Golezani, K., Motafakkerzad, R. (2018). Physiological responses of safflower to exogenous putrescine under water deficit. *J. Stress Physiol. Biochem.*, 14(3), 38–48.
- Kohli, S. K., Handa, N., Gautam, V., Bali, S., Sharma, A., Khanna, K., Arora, S., Thukral, K. A., Ohri, P., Karpets, Y., Kolupaev, Y., Bhardwaj, R. (2017). ROS signaling in plants under heavy metal stress. In: M. I. R. Khan, N. A. Khan (Eds.), *Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation under Abiotic Stress* (pp. 185-214). Singapore: Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5254-5_8
- Kokorev, A. I., Kolupaev, Y. E., Yastreb, T. O., Horielova, E. I., Dmitriev, A. P. (2021). Realization of Polyamines’ Effect on the State of Pea Stomata with the Involvement of Calcium and Components of Lipid Signaling. *Cytology and Genetics*, 55(2), 117–124.
- Kolbert, Z., Barroso, J. B., Brouquisse, R., Corpas, F. J., Gupta, K. J., Lindermayr, C., Loake, G. J., Palma, J. M., Petřivalský, M., Wendehenne, D., Hancock, J. T. (2019). A forty-year journey: The generation and roles of NO in plants. *Nitric Oxide.*, 93, 53–70. doi: 10.1016/j.niox.2019.09.006
- Kolupaev, Yu. E., Karpets, Yu. V. (2014). Reactive oxygen species and stress signaling in plants. *The Ukrainian Biochemical Journal.*, 86(4), 18–35. doi: 10.15407/ubj86.04.018

- Kolupaev, Yu. E., Karpets, Yu. V., & Kabashnikova, L. F. (2019). Antioxidative system of plants: cellular compartmentalization, protective and signaling functions, mechanisms of regulation (Review). *Appl Biochem Microbiol.*, 55(5), 441–459. doi: 10.1134/S0003683819050089
- Kolupaev, Yu. E., Karpets, Yu. V., Beschasniy, S. P., Dmitriev, A. P. (2019). Gasotransmitters and their role in adaptive reactions of plant cells. *Cytol. Genet.*, 53(5), 392–406. doi: 10.3103/S0095452719050098
- Kolupaev, Yu. E., Kokorev, A. I., Yastreb, T. O., Horielova, E. I. (2019). Hydrogen peroxide as a signal mediator at inducing heat resistance in wheat seedlings by putrescine. *The Ukrainian Biochemical Journal.*, 91(6), 103–111. doi: 10.15407/ubj91.06.103
- Kolupaev, Yu. E., Oboznyi, A. I., and Shvidenko, N. V. (2013). Role of Hydrogen Peroxide in Generation of a Signal Inducing Heat Tolerance of Wheat Seedlings. *Russ J Plant Physiol*, 60, 227–234.
- Komayama, K., Khatoon, M., Takenaka, D., Horie, J., Yamashita, A., Yoshioka, M., Nakayama, Y., Yoshida, M., Ohira, S., Morita, N., Velitchkova, M., Enami, I., Yamamoto, Y. (2007). Quality control of photosystem II: Cleavage and aggregation of heat-damage D1 protein in spinach thylakoids. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1767, 838–846. doi: 10.1016/j.bbabi.2007.05.001
- Korolkova, D. V., Radyukina, N. L., Soshinkova, T. N., Kuznetsov, V. V., Mapelli, S. (2014). Effect of spermine treatment on the functioning of *Thellungiella salsuginea* antioxidant system. *Russ. J. Plant Physiol.*, 61(1), 63–69. doi: 10.1134/S1021443714010075
- Krasylenko, Y. A., Yemets, A. I., Blume, Y. B. (2010). Functional role of nitric oxide in plants. *Russ. J. Plant Physiol.*, 57(4), 451–461. doi: 10.1134/S1021443710040011
- Kravets, V. S., Kolesnikov, Ya. S., Kretynin, S. V., Kabachevskaya, E. M., Liahnovitch, G. V., Bondarenko, O. M., Volotovskiy, I. D., and Kukhar, V. P. (2010). Molecular and genetic approaches for investigation of phospholipase D role in plant cells. *Biopolym. Cell*, 26(3), 175–185. doi: 10.7124/bc.000154

- Kudoyarova, G. R., Kholodova, V. P., Veselov, D. S. (2013). Current state of the problem of water relations in plants under water deficit. *Russ. J. Plant Physiol.*, *60*(2), 165–175. doi: 10.1134/S1021443713020143
- Kumar, N., & Mallick, S. (2019). Ameliorative mechanisms of polyamines against abiotic stress in the rice plants. *Advances in Rice Research for Abiotic Stress Tolerance. Woodhead Publishing*, 725–735.
- Kuznetsov, Vl. V., Radyukina, N. L., Shevyakova, N. I. (2006). Polyamines and stress: Biological role, metabolism, and regulation. *Russ. J. Plant Physiol.*, *53*(5), 583–604. doi: 10.1134/S1021443706050025
- Kuznetsov, Vl. V., Shevyakova, N. I. (2011). Polyamines and plant adaptation to saline environment. In: K.B. Ramawat (Eds.), *Desert Plants. Biology and Biotechnology* (pp. 261-297). Berlin, Heidelberg: Springer.
- Larher, F., Aziz, A., Deleu, C., Lemesle, P., Ghaffar, A., Bouchard, F., Plasman, M. (1998). Suppression of the osmoinduced proline response of rapeseed leaf discs by polyamines. *Physiol. Plant.*, *102*, 139–147. doi: 10.1034/j.1399-3054.1998.1020118.x
- Lawlor, D. W. and Tezara, W. (2009). Causes of Decreased Photosynthetic Rate and Metabolic Capacity in Water-Deficient Leaf Cells: A Critical Evaluation of Mechanisms and Integration of Processes. *Ann. Bot.*, *103*, 561–579. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn244>
- Lecourieux, D., Mazars, C., Pauly, N., Ranjeva, R., and Pugin, A. (2002). Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Plant Cell*, *14*(10), 2627–2641. doi: 10.1105/tpc.005579
- Li, B., Gao, K., Ren, H., Tang, W. (2018). Molecular mechanisms governing plant responses to high temperatures. *J. Integr. Plant Biol.*, *60*, 757–779.
- Li, Q., & Lancaster, J. R. (2013). Chemical foundations of hydrogen sulfide biology. *Nitric Oxide*, *35*, 21–34.
- Li, Q., Wang, Z., Zhao, Y., Zhang, X., Zhang, S., Bo, L., Wang, Y., Ding, Y., An, L. (2016). Putrescine protects hullless barley from damage due to UV-B stress via

- H₂S- and H₂O₂-mediated signaling pathways. *Plant Cell Reports.*, 35(5), 1155–1168.
- Li, X. & Liu, F. (2016). Drought stress memory and drought stress tolerance in plants: biochemical and molecular basis. In M. Hossain, S. Wani, S. Bhattacharjee, D. Burritt, L.S. Tran (Eds.), *Drought Stress Tolerance in Plants, 1*, (pp. 17–44). Springer, Cham. doi: 10.1007/978-3-319-28899-4_2
- Li, Y., Wu, Y., Liao, W., Hu, L., Dawuda, M. M., Jin, X., ... Yu, J. (2020). Nitric oxide is involved in the brassinolide-induced adventitious root development in cucumber. *BMC Plant Biol*, 20(1), 102.
- Li, Z. G. (2015). Synergistic effect of antioxidant system and osmolyte in hydrogen sulfide and salicylic acid crosstalk-induced heat tolerance in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Plant Signal. Behav.*, 10(9), e1051278.
- Li, Z. G., Long, W. B., Yang, S. Z., Wang, Y. C., Tang, J. H., Wen, L., ... Min, X. (2015a). Endogenous hydrogen sulfide regulated by calcium is involved in thermotolerance in tobacco *Nicotiana tabacum* L. suspension cell cultures. *Acta Physiol Plant*, 37, 219. doi:10.1007/s11738-015-1971-z
- Li, Z. G., Xie, L. R., Li, X. J. (2015). Hydrogen sulfide acts as a downstream signal molecule in salicylic acid-induced heat tolerance in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *J. Plant Physiol.*, 177, 121–127.
- Li, Z. G., Yi, X. Y., & Li, Y. T. (2014a). Effect of pretreatment with hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide on heat tolerance in relation to antioxidant system in maize (*Zea mays*) seedlings. *Biologia*, 69, 1001–1009.
- Li, Z. G., Yi, X. Y., Li, Y. T. (2014). Effect of pretreatment with hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide on heat tolerance in relation to antioxidant system in maize (*Zea mays*) seedlings. *Biologia.*, 69, 1001–1009.
- Liang, X., Zhang, L., Natarajan, S. K. & Becker, D. F. (2013). Proline mechanisms of stress survival. *Antioxid. Redox Signal.*, 19, 998–1011. doi: 10.1089/ars.2012.5074.

- Liu, Q., Nishibori, N., Imai, I., and Al, E. (2016). Response of polyamine pools in marine phytoplankton to nutrient limitation and variation in temperature and salinity. *Mar. Ecol. Prog.*, 544, 93–105. doi: 10.3354/meps11583
- Liu, W., Tan, M., Zhang, C., and Al, E. (2017). Functional characterization of murB-potABCD operon for polyamine uptake and peptidoglycan synthesis in *Streptococcus suis*. *Microbiol. Res.* 207, 177–187. doi: 10.1016/j.micres.2017.11.008
- Liu, H. T., Huang, W. D., Pan, Q. H., Weng, F. H., Zhan, J. C., Liu, Y., Wan, S., Liu, Y. Y. (2006). Contributions of PIP₂-specific-phospholipase C and free salicylic acid to heat acclimation induced thermotolerance in pea leaves. *Journal of Plant Physiology.*, 163(4), 405–416. doi: 10.1016/j.jpplph.2005.04.027
- Liu, J., Hou, Z. H., Liu, G. H., Hou, L. X., and Liu, X. (2012). Hydrogen sulfide may function downstream of nitric oxide in ethylene-induced stomatal closure in *Vicia faba* L. *J. Integr. Agricult.*, 11(10), 1644–1653. doi: 10.1016/S2095-3119(12)60167-1
- Liu, K., Fu, H., Bei, Q., Luan, S. (2000). Inward potassium channel in guard cells as a target for polyamine regulation of stomatal movements. *Plant Physiol.* 124 (3), 1315–1326.
- Luo, L., Li, Z., Tang, M. Y., Cheng, B. Z., Zeng, W. H., Peng, Y., Nie, G., Zhang, X. Q. (2020). Metabolic regulation of polyamines and γ -aminobutyric acid in relation to spermidine-induced heat tolerance in white clover. *Plant Biol.*, 22, 794–804.
- Mayer, M. P., Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.*, 62, 670. doi: 10.1007/s00018-004-4464-6
- Medvedev, S. S. (2018). Principles of Calcium Signal Generation and Transduction in Plant Cells. *Russ J Plant Physiol.*, 65, 771–783.
- Medvedev, S., Voronina, O., Tankelyun, O., Bilova, T., Suslov, D., Bankin, M., Mackievic, V., Makavitskaya, M., Shishova, M., Martinec, J., Smolikova, G., Sharova, E., and Demidchik, V. (2019). Phosphatidic acids mediate transport

- of Ca²⁺ and H⁺ through plant cell membranes. *Funct. Plant Biol.*, 46(6), 533–542. doi: 10.1071/FP18242
- Mellidou, I., Karamanoli, K., Constantinidou H. A., Roubelakis-Angelakis K. A. (2020) Antisense-mediated S-adenosyl-L-methionine decarboxylase silencing affects heat stress responses of tobacco plants. *Functional Plant Biology*, 47, 651–658.
- Mellidou, I., Karamanoli, K., Beris, D., Haralampidis, K., Constantinidou, H.A., Roubelakis-Angelakis, K.A. (2017). Underexpression of apoplastic polyamine oxidase improves thermotolerance in *Nicotiana tabacum*. *J. Plant Physiol.*, 218, 171–174. doi: 10.1016/j.jplph.2017.08.006
- Messiaen, J., Van Cutsem, P. (1999). Polyamines and pectins. II. Modulation of pectic-signal transduction. *Planta.*, 208, 247–256. doi: 10.1007/s004250050556
- Miller, E. W., Dickinson, B. C., Chang, C. J. (2010). Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 107, 15681–15686. doi: 10.1073/pnas.1005776107
- Minocha, R., Majumdar, R., Minocha, S. C. (2014). Polyamines and abiotic stress in plants: a complex relationship. *Front. Plant Sci.*, 5, 175. doi: 10.3389/fpls.2014.00175
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V. B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V., Van Breusegem, F. (2011). ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci.*, 16(6), 300–9.
- Miura, K., Okamoto, H., Okuma, E., Shiba, H., Kamada, H., Hasegawa, P. M., Murata, Y. (2013). SIZ1 deficiency causes reduced stomatal aperture and enhanced drought tolerance via controlling salicylic acid-induced accumulation of reactive oxygen species in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 73, 91–104. doi: 10.1111/tpj.12014
- Mohamed, S. A., Ahmed, H. S., El-Baowab, A. A. (2018). Effect of chitosan, putrescine and irrigation levels on the drought tolerance of sour orange seedlings. *Egypt. J. Hort.*, 45(2), 257–273. doi: 10.21608/ejoh.2018.3063.1050

- Monteiro, J. G., Cruz, F. J. R., Nardin, M. B., Santos, D. M. M. (2014). Growth and proline content in pigeon pea seedlings subjected to osmotic stress and to exogenous putrescine. *Pesq. Agropec. Bras., Brasilia.*, 49(1), 18–25. doi: 10.1590/S0100-204X2014000100003
- Montillet, J. L., Leonhardt, N., Mondy, S., Tranchimand, S., Rumeau, D., Boudsocq, M., Garcia, A. V., Douki, T., Bigear, J., Lauriere, C., Chevalier, A., Castresana, C. and Hirt, H. (2013). An abscisic acid-independent oxylipin pathway controls stomatal closure and immune defense in *Arabidopsis*. *PLoS Biol.*, 11(3), e1001513.
- Mori, I. C., Schroeder, J. S. (2004). Reactive oxygen species activation of plant Ca^{2+} channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction. *Plant Physiology.*, 135, 702–708. doi: 10.1104/pp.104.042069
- Mostofa, M. G., Yoshida, N., Fujita, M. (2014). Spermidine pretreatment enhances heat tolerance in rice seedlings through modulating antioxidative and glyoxalase systems. *Plant Growth Regul.* 73(1), 31–44.
- Mur, L. A. J., Mandon, J., Persijn, S., Cristescu, S. M., Moshkov, I. E., Novikova, G. V., ... Gupta, K. J. (2013). Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge. *AoB Plants*, 5, pls052. doi:10.1093/aobpla/pls052
- Nahar K, Hasanuzzaman M, Alam MM, Rahman A, Suzuki T, Fujita M (2016) Polyamine and nitric oxide crosstalk: antagonistic effects on cadmium toxicity in mung bean plants through upregulating the metal detoxification, antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems. *Ecotoxicol Environ Safety* 126:245–255
- Nahar, K., Hasanuzzaman, M., Rahman, A., and Al, E. (2016). Polyamines confer salt tolerance in Mung Bean (*Vigna radiata* L.) by reducing sodium uptake, improving nutrient homeostasis, antioxidant defense, and methylglyoxal detoxification systems. *Front. Plant Sci*, 7, 1104. doi: 10.3389/fpls.2016.01104
- Naik, B. I., Goswami, R. G., Srivastava, S. K. A Rapid and Sensitive Calorimetric Assay of Amine Oxidase. *Anal. Biochem.*, 111(1), 146–148.

- Nayyar, H., Chander, S. (2004). Protective effects of polyamines against oxidative stress induced by water and cold stress in chick-pea. *J. Agron. Crop Sci.*, 190, 355–365.
- Ndayiragije, A., Lutts, S. (2007). Long term exogenous putrescine application improves grain yield of a salt-sensitive rice cultivar exposed to NaCl. *Plant Soil.*, 291, 225–238. doi: 10.1007/s11104-006-9188-y
- Neill, S. J., Burnett, E. C. (1999). Regulation of gene expression during water deficit stress. *Plant Growth Regul.*, 29, 23–33. doi: 10.1023/A:1006251631570
- Nogues, S., Baker, N. R. (2000). Effects of drought on photosynthesis in Mediterranean plants grown under UV-B radiation. *J. Exp. Bot.*, 51, 1309–1317. doi: 10.1093/jexbot/51.348.1309
- Oda, T., Hashimoto, H., Kuwabara, N., Akashi, S., Hayashi, K., Kojima, C., Wong, H. L., Kawasaki, T., Shimamoto, K., Sato, M., Shimizu, T. (2010). Structure of the N-terminal regulatory domain of a plant NADPH oxidase and its functional implications. *The Journal of Biological Chemistry.*, 285, 1435–1445. doi: 10.1074/jbc.M109.058909
- Pal, M., Szalai, G., Janda, T. (2015). Speculation: Polyamines are important in abiotic stress signaling. *Plant Sci.*, 237, 16–23.
- Pál, M., Tajti, J., Szalai, G., Peeva, V., Balázs, V., Janda, T. (2018). Interaction of polyamines, abscisic acid and proline under osmotic stress in the leaves of wheat plants. *Sci. Rep.*, 8, 128–139. doi: 10.1038/s41598-018-31297-6
- Pang, X. M., Zhang, Z. Y., Wen, X. P., Ban, Y., Moriguchi, T. (2007). Polyamines, all-purpose players in response to environment stresses in plants. *Plant Stress.*, 1(2), 173–188.
- Pappan, K., Zheng, S., and Wang, X. (1997). Identification and characterization of a novel plant phospholipase D that requires polyphosphoinositides and submicromolar calcium for activity in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.*, 272(11), 7048–7054. doi: 10.1074/jbc.272.11.7048
- Paramonova, N. V., Shevyakova, N. I., Shorina, M. V., Stetsenko, L. A., Rakitin, V. Yu., Kuznetsov, V. V. (2003). The effect of putrescine on the apoplast

- ultrastructure in the leaf mesophyll of *Mesembryanthemum crystallinum* under salinity stress. *Russian J Plant Physiology.*, 50(5), 587-598. doi: 10.1023/A:1025623704298
- Pegg, A. E. (2016). Functions of polyamines in mammals. *J. Biol. Chem.*, 291, 14904–14912. doi: 10.1074/jbc.R116.731661
- Peng, S., Huang, J., Sheehy, J. E., Laza, R. C., Visperas, R. M., Zhong, X., Centeno, G. S., Khush, G. S., Cassman, K. G. (2004). Rice yields decline with higher night temperature from global warming. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, 101, 9971–9975.
- Peynevandi, K. M., Razavi, S. M., Zahri, S. (2018). The ameliorating effects of polyamine supplement on physiological and biochemical parameters of *Stevia rebaudiana Bertonii* under cold stress. *Plant Production Sci.*, 21(2), 123–131.
- Pietrini, F., Massacci, A. (1998). Leaf anthocyanin content changes in *Zea mays* L. grown at low temperature: Significance for the relationship between the quantum yield of PS II and the apparent quantum yield of CO₂ assimilation. *Photosynthesis Res.*, 58, 213–219. doi:10.1023/A:1006152610137
- Pinero, M. C., Otalora, G., Collado, J., Lopez-Marsn, J., del Amor, F. M. (2021). Foliar application of putrescine before a short-term heat stress improves the quality of melon fruits (*Cucumis melo* L.). *J Sci Food Agric*, 101(4), 1428–1435. doi: 10.1002/jsfa.10756
- Piterková, J., Luhová, L., Zajoncová, L., Šebela, M., Petřivalský, M. (2012). Modulation of polyamine catabolism in pea seedlings by calcium during salinity stress. *Plant Protection Science.*, 48(2), 53–64. doi: 10.17221/62/2011-PPS
- Pottosin, I., Shabala, S. (2014). Polyamines control of cation transport across plant membranes: Implications for ion homeostasis and abiotic stress signaling. *Frontiers in Plant Science.*, 5, 154. doi: 10.3389/fpls.2014.00154
- Pottosin, I., Velarde-Buendía, A. M., Bose, J., Fuglsang, A. T., Shabala, S. (2014a). Polyamines cause plasma membrane depolarization, activate Ca²⁺-, and

- modulate H⁺-ATPase pump activity in pea roots. *Journal of Experimental Botany*, 65(9), 2463–2472. doi: 10.1093/jxb/eru133
- Pottosin, I., Velarde-Buendía, A. M., Bose, J., Zepeda-Jazo, I., Shabala, S., Dobrovinskaya, O. (2014b). Cross-talk between reactive oxygen species and polyamines in regulation of ion transport across the plasma membrane: implications for plant adaptive responses. *Journal of Experimental Botany*, 65(5), 1271–1283. doi: 10.1093/jxb/ert423
- Pottosin, I., Velarde-Buendía, A. M., Zepeda-Jazo, I., Dobrovinskaya, O., Shabala, S. (2012). Synergism between polyamines and ROS in the induction of Ca²⁺ and K⁺ fluxes in roots. *Plant Signal Behav.*, 7, 1084–1087.
- Prabhavathi, V. R., Rajam, V. R. (2007). Polyamine accumulation in transgenic eggplant enhances tolerance to multiple abiotic stresses and fungal resistance. *Plant Biotechnol.*, 24(3), 273–282. doi: 10.5511/plantbiotechnology.24.273
- Pradedova, E. V., Nimaeva, O. D., Salyaev, R. K. (2017). Redox processes in biological systems. *Russ J Plant Physiol*, 64, 822–832.
- Qu, Y., An, Z., Zhuang, B., Jing, W., Zhang, Q., and Zhang, W. (2014). Copper amine oxidase and phospholipase D act independently in abscisic acid (ABA)-induced stomatal closure in *Vicia faba* and *Arabidopsis*. *J. Plant Res.*, 127(4), 533–544. doi: 10.1007/s10265-014-0633-3
- Radyukina, N. L., Shashukova, A. V., Mapelli, S., Shevyakova, N. I., Kuznetsov, V. I. (2010). Proline controls the level of polyamines in common sage plants under normal conditions and at UV-B irradiation. *Russ. J. Plant Physiol.*, 57, 422. doi: 10.1134/S1021443710030155
- Rajpal, C., Tomar, P. C. (2020). Cadaverine: A potent modulator of plants against abiotic stresses. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences.*, 10(2), 205–210. doi: 10.15414/jmbfs.2020.10.2.205-210
- Ramirez, V., Coego, A., Lopez, A., Agorio, A., Flors, V., and Vera, P. (2009). Drought tolerance in *Arabidopsis* is controlled by the OCP3 disease resistance regulator. *Plant J.*, 58(4), 578–591.

- Rosales, E. P., Iannone, M. F., Groppa, M. D., Benavides, M. P. (2012). Polyamines modulate nitrate reductase activity in wheat leaves: involvement of nitric oxide. *Amino Acids*, 42(2–3), 857–865. doi:10.1007/s00726-011-1001-4
- Roychoudhury, A., Basu, S., Sengupta, D. N. (2011). Amelioration of salinity stress by exogenously applied spermidine or spermine in three varieties of indica rice differing in their level of salt tolerance. *J. Plant Physiol.*, 168, 317–328.
- Sagi, M., Fluhr, R. (2006). Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiology*, 141, 336–340. doi: 10.1104/pp.106.078089
- Sagisaka, S. (1976). The occurrence of peroxide in a perennial plant. *Populus gelrica*. *Plant Physiol.*, 57, 308.
- Sagor, G. H., Berberich, T., Takahashi, Y., Niitsu, M., Kusano, T. (2013). The polyamine spermine protects Arabidopsis from heat stress-induced damage by increasing expression of heat shock-related genes. *Transgenic Res.*, 22(3), 595–605. doi: 10.1007/s11248-012-9666-3
- Saha, J., Brauer, E. K., Sengupta, A., Popescu, S. C., Gupta, K., Gupta, B. (2015). Polyamines as redox homeostasis regulators during salt stress in plants. *Front. Environ. Sci.*, 3, 21.
- Sarwat, M., Tuteja, N. (2017). Hormonal signaling to control stomatal movement during drought stress. *Plant Gene* 11, 143–153. doi:10.1016/j.plgene.2017.07.007
- Scaramagli, S., Biondi, S., Leone, A., Grillo, S., Torrigiani P. (2000). Acclimation to low water potential in potato cell suspension cultures leads to changes in putrescine metabolism. *Plant Physiol. Biochem.*, 38(4), 345–351. doi:10.1016/S0981-9428(00)00750-6
- Seo, S. Y., Kim, Y. J., and Park, K. Y. (2019). Increasing Polyamine Contents Enhances the Stress Tolerance via Reinforcement of Antioxidative Properties. *Front. Plant Sci*, 10, 1331. doi: 10.3389/fpls.2019.01331
- Sharkey, T. D., Zhang, R. (2010). High temperature effects on electron and proton circuits of photosynthesis. *J. Integr. Plant Biol.*, 52, 712–722. doi: 10.1111/j.1744-7909.2010.00975.x

- Sharova, E. I., Medvedev, S. S. (2017). Redox reactions in apoplast of growing cells. *Russian Journal of Plant Physiology*, 64(1), 1-14. doi: 10.1134/S1021443717010149
- Sharova, E.I., Medvedev, S.S. (2017). Redox reactions in apoplast of growing cells. *Russ J Plant Physiol.*, 64, 1–14. doi: 10.1134/S1021443717010149
- Shen, W., Huber, S. C. (2006). Polycations Globally Enhance Binding of 14-3-3 ω to Target Proteins in Spinach Leaves. *Plant and Cell Physiology*, 47(6), 764–771. doi: 10.1093/pcp/pcj050
- Shen, W., Nada, K., Tachibana, S. (2000). Involvement of polyamines in the chilling tolerance of cucumber cultivars. *Plant Physiol.*, 124, 431–439. doi: 10.1104/pp.124.1.431
- Shevyakova, N. I., Rakitin, V. Yu., Duong, D. B., Sadomov, N. G., Kuznetsov, V. V. (2001). Heat shock-induced cadaverine accumulation and translocation throughout the plant. *Plant Science.*, 161(6), 1125–1133. doi: 10.1016/S0168-9452(01)00515-5
- Shevyakova, N. I., Rakitin, V. Yu., Stetsenko, L. A., Aronova, E. E., Kuznetsov, V. V. (2006). Oxidative stress and fluctuations of free and conjugated polyamines in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* L. under NaCl salinity. *Plant Growth Regulation.*, 50(1), 69–78. doi: 10.1007/PL00021848
- Shi, H., Chan, Z. (2014). Improvement of plant abiotic stress tolerance through modulation of the polyamine pathway. *J. Integr. Plant Biol.*, 56(2), 114–121. doi:10.1111/jipb.12128
- Shi, H., Ye, T., Han, N., Bian, H., Liu, X., Chan, Z. (2015). Hydrogen sulfide regulates abiotic stress tolerance and biotic stress resistance in *Arabidopsis*. *J. Integr. Plant Biol.*, 57(7), 628–640. doi: 10.1111/jipb.12302
- Singh, P., Basu, S., Kumar, G. (2018). Polyamines metabolism: A way ahead for abiotic stress tolerance in crop plants. In S. H. Wani (Eds.), *Biochemical, Physiological and Molecular Avenues for Combating Abiotic Stress Tolerance in Plants*, (pp. 39–55). Academic Press: London, UK.

- Singh, S., Gupta, A.K. & Kaur, N. (2012). Differential responses of antioxidative defence system to long-term field drought in wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes differing in drought tolerance. *J. Agron. Crop Sci.*, 198, 185–195. doi: 10.1111/j.1439-037X.2011.00497.
- Sin'kevich, M. S., Deryabin, A. N. Trunova, T. I. (2009). Characteristics of oxidative stress in potato plants with modified carbohydrate metabolism. *Russ. J. Plant Physiol.*, 56(2), 168. doi:10.1134/S1021443709020046
- Sobieszczuk-Nowicka, E. (2017). Polyamine catabolism adds fuel to leaf senescence. *Amino Acids*, 49, 49–56. doi: 10.1007/s00726-016-2377-y
- Stetsenko, L. A., Vedenicheva, N. P., Likhnevsky, R. V. Kuznetsov, V. V. (2015). Influence of abscisic acid and fluridone on the content of phytohormones and polyamines and the level of oxidative stress in plants of *Mesembryanthemum crystallinum* L. under salinity. *Biol. Bull. Russ. Acad. Sci.* 42, 98–107. doi: 10.1134/S1062359015020107
- Stocker, T. F., and et al. (2013). *Climate Change 2013: The Physical Science Basis*. Cambridge University Press, 1535.
- Stolfa, I., Pfeiffer, T. Z., Spoljaric, D. (2015). Heavy metal-induced oxidative stress in plants: response of the antioxidative system. In: D.K. Gupta et al. (Eds.), *Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Plants Under Stress* (pp. 127-163). Springer International Publishing Switzerland. doi: 10.1007/978-3-319-20421-5_6
- Suhita, D., Raghavendra, A. S., Kwak, J. M., Vavasseur, A. (2004). Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate- and abscisic acid-induced stomatal closure. *Plant Physiol.*, 134, 1536–1545. doi: 10.1104/pp.103.032250
- Sung, M., Hsu, Yi., Hsu, Yu. (2009). Hypersalinity and hydrogen peroxide upregulation of gene expression of antioxidant enzymes in *Ulva fasciata* against oxidative stress. *Marine Biotechnology.*, 11(2), 199–209. doi: 10.1007/s10126-008-9134-5

- Suzuki, N. & Mittler, R. (2006). Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. *Physiol. Plant.*, *126*, 45–51. doi: 10.1111/j.0031-9317.2005.00582.x
- Szalai, G., Janda, K., Darkó, E., Janda, T., Peeva, V., Pál, M. (2017). Comparative analysis of polyamine metabolism in wheat and maize plants. *Plant Physiol. Biochem.*, *112*, 239–250. doi:10.1016/j.plaphy.2017.01.012
- Takahashi, Y., Tahara, M., Yamada, Y., and Al, E. (2017). Characterization of the polyamine biosynthetic pathways and salt stress response in *Brachypodium distachyon*. *J. Plant Growth Regul.*, *37*, 625–634. doi: 10.1007/s00344-017-9761-z
- Talaat, N. B. (2020). 24-Epibrassinolide and spermine combined treatment sustains maize (*Zea mays* L.) drought tolerance by improving photosynthetic efficiency and altering phytohormones profile. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition.*, *20*, 516–529. doi:10.1007/s42729-019-00138-4
- Tang, S., Zhang, H. X., Li, L., Liu, X., Chen, L., Chen, W. Z., et al. (2018). Exogenous spermidine enhances the photosynthetic and antioxidant capacity of rice under heat stress during early grain-filling period. *Funct Plant Biol*, *45*, 911–921.
- Tanou, G., Ziogas, V., Belghazi, M., Christou, A., Filippou, P., Job, D., Fotopoulos, V., Molassiotis, A. (2014). Polyamines reprogram oxidative and nitrosative status and the proteome of citrus plants exposed to salinity stress. *Plant Cell Environ.*, *37*(4), 864–885.
- Tewari, R. K., Hahn, E. J., Paek, K. Y. (2008). Modulation of copper toxicity-induced oxidative damage by nitric oxide supply in the adventitious roots of *Panax ginseng*. *Plant Cell Rep.*, *27*(1), 171–181. doi:10.1007/s00299-007-0423-7
- Todorova, D., Katerova, Z., Sergiev, I., Alexieva, V. (2013). Role of polyamines in alleviating salt stress. In: P. Ahmad, M.M. Azooz, M.N.V. Prasad (Eds.), *Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress*, *13*, (pp. 355-379). New York: Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4747-4_13

- Tomar, P. C., Lakra, N., Narayan, M. S. (2013). Effect of cadaverine on *Brassica juncea* (L.) under multiple stress. *Indian Journal of Experimental Biology*, 51(9), 758–763.
- Toumi, I., Pagoulatou, M. G., Margaritopoulou, T., Milioni, D., Roubelakis-Angelakis, K. A. (2019). Genetically modified heat shock protein90s and polyamine oxidases in arabidopsis reveal their interaction under heat stress affecting polyamine acetylation, oxidation and homeostasis of reactive oxygen species. *Plants*, 8(9), 323. doi: 10.3390/plants8090323
- Tun, N. N., Santa-Catarina, C., Begum, T., Silveira, V., Handro, W., Floh, E. I. S. & Scherer, G. F. E. (2006). Polyamines Induce Rapid Biosynthesis of Nitric Oxide (NO) in Arabidopsis thaliana Seedlings. *Plant Cell Physiol.*, 47(3), 346–354.
- Uraji, M., Katagiri, T., Okuma, E., Ye, W., Hossain, M. A., Masuda, C., Miura, A., Nakamura, Y., Mori, I. C., Shinozaki, K., and Murata, Y. (2012). Cooperative function of PLD δ and PLD α 1 in abscisic acid-induced stomatal closure in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 159(1), 450–460. doi: 10.1104/pp.112.195578
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci*, 9(5), 244–252.
- Wang, K., Xu, F., Cao, S., Wang, H., Wei, Y., Shao, X., Zhou, W., Zheng, Y. (2019). Effects of exogenous calcium chloride (CaCl₂) and ascorbic acid (AsA) on the γ -aminobutyric acid (GABA) metabolism in shredded carrots. *Postharvest Biology and Technology*, 152, 111–117. doi: 10.1016/j.postharvbio.2019.03.005
- Wen, X., Moriguchi, T. (2015). Role of Polyamines in Stress Response in Horticultural Crops. In: Y. Kanayama, A. Kochetov (Eds.), *Abiotic Stress Biology in Horticultural Plants*. Springer, Tokyo. https://doi.org/10.1007/978-4-431-55251-2_3
- Wi, S. J., Kim, W. T., Park, K. Y. (2006). Overexpression of carnation S-adenosylmethionine decarboxylase gene generates a broad-spectrum tolerance

- to abiotic stresses in transgenic tobacco plants. *Plant Cell Rep*, 25, 1111–1121. doi: 10.1007/s00299-006-0160-3
- Wilkinson, S. & Davies, W. (2010). Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant, Cell Environ.*, 33, 510–525. doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.02052.x
- Wimalasekera R, Villar C, Begum T, Scherer GFE (2011a) Copper amine oxidase 1 (CuAO1) of *Arabidopsis thaliana* contributes to abscisic acid- and polyamine-induced nitric oxide biosynthesis and abscisic acid signal transduction. *Mol Plant* 4(4):663–678.
- Wimalasekera R, Tebartz F, Scherer GF (2011b) Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses. *Plant Sci* 181:593–603.
- Xu, C., Wu, X., and Zhang, H. (2009). Impact of D-Arg on drought resistance and endogenous polyamines in mycorrhizal *Pinus massoniana*. *J. Nanjing Forestry Univ.*, 33, 019–023. doi: 10.3969/j.issn.1000-2006.2009.04.004
- Yadav, S. K., Kumar D. P., Tiwari, Y. K., Jainender, Lakshmi N. J., Vanaja, M., and Maheswari, M. (2017). Exogenous Application of Bio-Regulators for Alleviation of Heat Stress in Seedlings of Maize. *J Agri Res*, 2(3): 000137.
- Yamamoto, Y., Aminaka, R., Yoshioka, M., Khatoon, M., Komayama, K., Takenaka, D., Yamashita, A., Nijio, N., Inagawa, K., Morita, N., Sasaki, T., Yamamoto, Y. (2008). Quality control of photosystem II: impact of light and heat stresses. *Photosynth Res.*, 98, 589–608. doi: 10.1007/s11120-008-9372-4
- Yang, B., Wu, J., Gao, F., Wang, J., Su, G. (2014). Polyamine-induced nitric oxide generation and its potential requirement for peroxide in suspension cells of soybean cotyledon node callus. *Plant Physiol. Biochem.* 79, 41–47. doi: 10.1016/j.plaphy.2014.02.025
- Yang, R., Chen, H., Gu, Z. (2011). Factors influencing diamine oxidase activity and γ -aminobutyric acid content of fava bean (*Vicia faba* L.) during germination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 59, 11616–11620. doi: 10.1021/jf202645p

- Yang, Y., Zhang, Y., Wei, X., You, J., Wang, W., Lu, J., Shi, R. (2011). Comparative antioxidative responses and proline metabolism in two wheat cultivars under short term lead stress. *Ecotoxicol. Environ. Safety.*, 74, 733–740. doi: 10.1016/j.ecoenv.2010.10.035
- Yastreb, T. O., Kolupaev, Yu. E., Havva, E. N., Shkliarevskiy, M. A., and Dmitriev, A. P. (2019). Calcium and components of lipid signaling in implementation of hydrogen sulfide influence on the state of stomata in *Arabidopsis thaliana*. *Cytol. Genet.*, 53(2), 99–105.
- Yastreb, T. O., Kolupaev, Yu. E., Kokorev, A. I., Horielova, E. I., and Dmitriev, A. P. (2018). Methyl jasmonate and nitric oxide in regulation of the stomatal apparatus of *Arabidopsis thaliana*. *Cytol. Genet.*, 52(6), 400–405.
- Yastreb, T. O., Kolupaev, Yu. E., Lugovaya, A. A., and Dmitriev, A. P. (2017). Formation of adaptive reactions in *Arabidopsis thaliana* wild-type and mutant *jin1* plants under action of abscisic acid and salt stress. *Cytol. Genet.*, 51(5), 325–330.
- Yemets, A. I., Karpets, Yu. V., Kolupaev, Yu. E., & Blume, Ya. B. (2019). Emerging Technologies for Enhancing ROS/RNS Homeostasis. In M. Hasanuzzaman, V. Fotopoulos, K. Nahar, M. Fujita (Eds.), *Reactive Oxygen, Nitrogen and Sulfur Species in Plants: Production, Metabolism, Signaling and Defense Mechanisms* (pp. 873-922). Wiley.
- Yemets, A. I., Krasylenko, Y. A., Blume, Y. B. (2015). Nitric oxide and UV-B radiation. In M. N. Khan et al. (Eds.), *Nitric Oxide Action in Abiotic Stress Responses in Plants* (pp. 141–154). Switzerland: Springer. doi: 10.1007/978-3-319-17804-2_9
- Yu, Z., Jia, D., Liu, T. (2019). Polyamine oxidases play various roles in plant development and abiotic stress tolerance. *Plants*, 8, 184. doi: 10.3390/plants8060184
- Yun, B. W., Feechan, A., Yin, M., Saidi, N. B. B., Bihan, T. L., Yu, M., ... Loake, G. J. (2011). S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature*, 478, 264–268.

- Zagorchev, L., Teofanova, D. & Odjakova, M. (2016). Ascorbate–Glutathione Cycle: Controlling the Redox Environment for Drought Tolerance. In M. Hossain, S. Wani, S. Bhattacharjee, D. Burritt, L. S. Tran (Eds.), *Drought Stress Tolerance in Plants, 1*, (pp. 187–226). Springer, Cham. doi: 10.1007/978-3-319-28899-4_8
- Zarza, X., Shabala, L., Fujita, M., Shabala, S., Haring, M. A., Tiburcio, A. F., and Munnik, T. (2019). Extracellular spermine triggers a rapid intracellular phosphatidic acid response in Arabidopsis, involving PLD δ activation and stimulating ion flux. *Front. Plant Sci.*, 21(10), 601. doi: 10.3389/fpls.2019.00601
- Zeid, I. M., Shedeed, Z. A. (2006). Response of alfalfa to putrescine treatment under drought stress. *Biol. Plant.*, 50(4), 635–640. doi: 10.1007/s10535-006-0099-9
- Zhao, K., Fan, H., Zhou, S., Song, J. (2003). Study on the salt and drought tolerance of Suaeda salsa and Kal-anchoe claigremontiana under isoosmotic salt and water stress. *Plant Sci.*, 165(4), 837–844. doi:10.1016/S0168-9452(03)00282-6
- Zhou, B., Guo, Z., Xing, J., & Huang, B. (2005). Nitric oxide is involved in abscisic acid-induced antioxidant activities in *Stylosanthes guianensis*. *J. Exp. Bot.*, 56, 3223.
- Zhou, R., Hu, Q., Pu, Q. et al. (2020). Spermidine Enhanced Free Polyamine Levels and Expression of Polyamine Biosynthesis Enzyme Gene in Rice Spikelets under Heat Tolerance before Heading. *Sci Rep*, 10, 8976. doi: 10.1038/s41598-020-64978-2

ДОДАТОК А

Список публікацій за темою дисертації та відомості про апробацію результатів дисертації

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

1. Kokorev, A. I., Kolupaev, Y. E., Yastreb, T. O., Horielova, E. I., Dmitriev, A. P. (2021). Realization of Polyamines' Effect on the State of Pea Stomata with the Involvement of Calcium and Components of Lipid Signaling. *Cytology and Genetics*, 55(2), 117–124. doi: 10.3103/S0095452721020079 (Особистий внесок дисертанта: участь у проведенні експериментів, обробка результатів)
2. Kolupaev, Y. E., Kokorev, A. I., Yastreb, T. O., Horielova, E. I. (2019). Hydrogen peroxide as a signal mediator at inducing heat resistance in wheat seedlings by putrescine. *Ukrainian Biochemical Journal*, 91(6), 103–111. doi: 10.15407/ubj91.06.103 (Особистий внесок дисертанта: участь у проведенні експериментів, обробці результатів, підготовці тексту статті)

Статті у наукових фахових виданнях України:

3. Кокорев О. І. (2021). АФК-залежний стрес-протекторний вплив діамінів на проростки пшениці за умов гіпертермії. *Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія*, 2(53), 53–60. doi: 10.35550/vbio2021.02.053 (Особистий внесок дисертанта: участь у проведенні експериментів, обробка та інтерпретація результатів, участь у підготовці тексту статті)
4. Кокорев, О. І., Колупаєв, Ю. Є., Карпець, Ю. В., Дяченко, А. І. (2020). Участь оксиду азоту в індукуванні теплостійкості проростків пшениці путресцином. *Доповіді Національної академії наук України*, 12, 85–92. doi: 10.15407/dopovidi2020.12.085 (Особистий внесок дисертанта: участь у

проведенні експериментів, обробка та інтерпретація результатів, участь у підготовці тексту статті)

5. Кокорев, О. І., Шклярєвський, М. А., Швиденко, М. В., Колупаєв, Ю. Є. (2020). Стрес-протекторний вплив путресцину і сперміну на рослини пшениці за ґрунтової посухи. *Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія*, 3(51), 58–70. doi: 10.35550/vbio2020.03.058 (Особистий внесок дисертанта: участь у проведенні експериментів, обробка та інтерпретація результатів, участь у підготовці тексту статті)

6. Кокорев, А. И., Шклярєвський, М. А., Швиденко, Н. В., Колупаєв, Ю. Е. (2020). Возможная роль сероводорода в индуцировании путресцином активности антиоксидантных ферментов и теплоустойчивости проростков пшеницы. *Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія*, 1(49), 44–53. doi: 10.35550/vbio2020.01.044 (Особистий внесок дисертанта: участь у проведенні експериментів, обробка та інтерпретація результатів, участь у підготовці тексту статті)

7. Кокорев, А. И., Колупаєв, Ю. Е., Ястреб, Т. О., Горелова, Е. И. (2019). Влияние экзогенных полиаминов на состояние антиоксидантной и осмопротекторной систем проростков пшеницы при обезвоживании. *Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія*, 3(48), 52–65. doi: 10.35550/vbio2019.03.052 (Особистий внесок дисертанта: участь у проведенні експериментів, обробка та інтерпретація результатів, участь у підготовці тексту статті)

8. Кокорев, А. И., Швиденко, Н. В., Ястреб, Т. О., Колупаєв, Ю. Е. (2018). Индуцирование экзогенными полиаминами теплоустойчивости проростков пшеницы и активности антиоксидантных ферментов. *Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія*, 3(45), 85–93. doi: 10.35550/vbio2018.03.085 (Особистий внесок дисертанта: участь у проведенні експериментів, обробка та інтерпретація результатів, участь у підготовці тексту статті)

9. Колупаєв, Ю. Е., Кокорев, А. И. (2019). Участие полиаминов в регуляции редокс-гомеостаза у растений. *Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер.*

Біологія, 1(46), 6–22. doi: 10.35550/vbio2019.01.006 (Особистий внесок дисертанта: участь у проведенні експериментів, обробка та інтерпретація результатів, участь у підготовці тексту статті)

10. Колупаєв, Ю. Є., Кокорев, О. І. (2019). Антиоксидантная система и устойчивость растений к недостатку влаги. *Физиология растений и генетика*, 51(1), 28–54. doi: 10.15407/frg2019.01.028 (Особистий внесок дисертанта: участь у проведенні експериментів, обробка та інтерпретація результатів, участь у підготовці тексту статті)

Матеріали конференцій:

11. Кокорев, А. И., Ястреб, Т. О., Швиденко, Н. В., Горелова, Е. И., Колупаев, Ю. Е. (2018). Влияние экзогенных полиаминов на активность антиоксидантных ферментов в проростках пшеницы и их теплоустойчивость. *Регуляция роста, развития и продуктивности растений. Материалы IX Международной научной конференции (Минск, Беларусь, 24–26 июня 2018 г.)* (С. 66). Минск: Колоград.

12. Kokorev, O. I., Kolupaev, Yu. E., Karpets, Yu. V., Ivanchenko, O. E. (2020). Induction of wheat plants resistance to soil drought by exogenous polyamines. *Сучасні проблеми генетики, біотехнології і біохімії сільськогосподарських рослин. Тези доповідей Міжнародної наукової конференції (Одеса, Україна, 21 жовтня 2020 р.)* (С. 94–95). Одеса: СГІ–НЦНС.

13. Кокорев, О. І., Швиденко, М. В., Колупаєв, Ю. Є. (2021). АФК-залежне індукування теплостійкості проростків пшениці дією кадаверину. *Актуальні проблеми фізіології рослин і генетики. Тези доповідей Міжнародної наукової конференції (Київ, 17 липня 2021 р.)* (С. 170–172). Київ: ІФРГ.

14. Kokorev, A. I., Kolupaev, Yu. E., Diachenko, A. I., Dmitriev, A. P. (2021). Signal mediators in implementation of putrescine influence on state of *pisum sativum* stomata. *Plants stress and adaptation. Proceedings of the International*

scientific conference (Kharkiv, Ukraine, February 25-26, 2021) (pp. 10–11). Kharkiv: KhNAU.

15. Kokorev, A. I., Kolupaev, Yu. E., Karpets, Yu. V., Lugovaya, A. A. (2021). Participation of reactive oxygen species and nitric oxide in heat resistance induction in wheat seedlings by exogenous putrescine. *Plants stress and adaptation. Proceedings of the International scientific conference (Kharkiv, Ukraine, February 25-26, 2021) (pp. 12–13). Kharkiv: KhNAU.*

16. Кокорев, О. І., Швиденко, М. В., Лугова, Г. А., Колупаєв, Ю. Є. (2021). Індукування ферментативної антиоксидантної системи проростків пшениці та їх теплостійкості екзогенним кадаверином. *Стрес і адаптація рослин. Тези міжнародної наукової конференції (Харків, Україна, 25-26 лютого 2021 р.) (с. 245). Харків: ХНАУ.*

17. Колупаєв, Ю. Є., Кокорев, О. І., Ястреб, Т. О., Горєлова, О. І. (2019). Участь активних форм кисню в індукуванні стійкості проростків пшениці поліамінами. *Медична та клінічна хімія. Матеріали XII Українського Біохімічного конгресу (Тернопіль, 30 вересня – 04 жовтня 2019 р.) (С. 309). Тернопіль: ТНМУ.*

Апробація результатів дисертації

Основні положення роботи викладено та обговорено на наукових конференціях:

1. Міжнародна наукова конференція «Регуляція росту, розвитку и продуктивности растений» (Мінськ, Білорусь, 24–26 июня 2018 г., стендова доповідь)

2. XII Український Біохімічний конгрес «Медична та клінічна хімія» (Тернопіль, 30 вересня – 04 жовтня 2019 р., форма участі – заочна)

3. Міжнародна наукова конференція «Стрес і адаптація рослин» (Харків, Україна, 25-26 лютого 2021 р., форма участі – усна доповідь).

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

5. Міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми фізіології рослин і генетики» (Київ, 17 липня 2021 р., форма участі – заочна)