Вестник Томского государственного университета. Биология. 2020. № 51. С. 105–122

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 581.1
doi: 10.17223/19988591/51/6

Ю.Е. Колупаев[1, 2], А.И. Кокорев[1], М.А. Шкляревский[1]

[1] Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева, г. Харьков, Украина
[2] Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, г. Харьков, Украина

Кальцийзависимое изменение активности антиоксидантных ферментов и теплоустойчивости проростков пшеницы под влиянием экзогенного путресцина

Полиамины – важные стрессовые метаболиты растений, участвующие в регуляции редокс-гомеостаза и сигнальных процессах. Исследовали участие ионов Ca^{2+} в процессе индуцирования антиоксидантной системы и теплоустойчивости проростков пшеницы (Triticum aestivum L.) экзогенным диамином путресцином с использованием антагонистов кальция. Отмечено существенное повышение содержания пероксида водорода в корнях через 2 ч после начала обработки проростков 1 мМ раствором путресцина. Этот эффект полностью устранялся хелатором внеклеточного кальция – этиленгликоль-бис(2-аминоэтил-эфир)тетрауксусной кислотой (ЭГТА), но не ингибитором поступления кальция из внутриклеточных компартментов неомицином. Обработка проростков путресцином вызывала повышение активности супероксиддисмутазы, каталазы и гваяколпероксидазы в корнях и способствовала сохранению активности антиоксидантных ферментов после повреждающего прогрева проростков (10 мин при 45 °С). ЭГТА устранял индуцируемое путресцином повышение активности всех трех исследуемых антиоксидантных ферментов. Неомицин снимал эффекты повышения активности каталазы и гваяколпероксидазы в корнях проростков пшеницы, вызываемые действием путресцина. Обработка проростков путресцином способствовала сохранению целостности мембран клеток корней и повышала выживание проростков после повреждающего прогрева. Антагонисты кальция устраняли эти эффекты. Обсуждается роль различных пулов кальция в индуцировании образования активных форм кислорода в клетках корней, регуляции редокс-гомеостаза и развитии устойчивости к тепловому стрессу под действием путресцина.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*; *полиамины; путресцин; редокс-гомеостаз; кальций; теплоустойчивость.*

Сокращения: АФК – активные формы кислорода; СОД – супероксиддисмутаза; ЭГТА – этиленгликоль-бис(2-аминоэтил-эфир)тетрауксусная кислота.

Введение

Полиамины относят к стрессовым метаболитам растений [1]. В обычных условиях они содержатся в растительных тканях в концентрациях, близких

к фитогормональным, – 10^{-9}–10^{-5} М [2]. Однако при действии стрессоров различной природы их количество может увеличиваться в несколько раз и даже на порядок [1, 3, 4]. Считается, что увеличение содержания полиаминов является не столько отображением вызываемой стресс-факторами активации катаболического потока, сколько важной стресс-протекторной реакцией растений [5, 6]. Достаточно давно показана обусловленная катионным состоянием полиаминов способность оказывать стабилизирующее действие на отрицательно заряженные макромолекулы белков, нуклеиновых кислот, а также на мембранные структуры [2]. Позднее было установлено, что полиамины могут вовлекаться в сложные сигнальные процессы в растительных клетках. Такие эффекты отчасти могут быть обусловлены образованием активных форм кислорода (АФК) и оксида азота при метаболизме полиаминов [7]. С другой стороны, полиамины могут влиять на редокс-гомеостаз путем связывания свободных радикалов [8] и участия в регуляции экспрессии генов антиоксидантных ферментов [7, 9].

Отдельной составляющей физиологической активности полиаминов может быть их влияние на состояние ионных каналов. Феноменология таких эффектов зарегистрирована достаточно давно [10]. Согласно современным моделям, полиамины оказывают сложное и неоднозначное влияние на ионные каналы различных типов. Так, есть сведения об их способности ингибировать калиевые и неспецифические потенциалнезависимые катионные каналы [11]. С другой стороны, показано, что путресцин способен вызывать повышение концентрации цитозольного кальция в растительных клетках [12]. По крайней мере отчасти такой эффект может быть связан с усилением образования АФК при деградации путресцина диаминоксидазой и как следствие открыванием чувствительных к действию пероксида водорода и гидроксильного радикала неселективных кальциевых каналов [11].

Известно, что между АФК и ионами кальция как сигнальными посредниками существуют сложные связи [13]. С одной стороны, состояние кальциевых каналов (как потенциалзависимых, так и механочувствительных) зависит от содержания АФК [14–16]. С другой – АФК-генерирующие ферменты, прежде всего НАДФН-оксидаза, могут активироваться кальцием [17, 18]. Однако функциональное взаимодействие между АФК и ионами кальция при реализации эффектов полиаминов на растительные клетки изучено пока очень слабо. Тем более остается открытым вопрос о роли таких взаимодействий в реализации стресс-протекторных эффектов полиаминов.

Экзогенные полиамины, в том числе диамин путресцин, обладают способностью повышать устойчивость растений к абиотическим стрессорам различной природы [7, 19], в частности, к гипертермии [20]. Ранее нами показано участие АФК в проявлении стресс-протекторного действия путресцина на проростки пшеницы при повреждающем нагреве [21]. Данные ингибиторного анализа указывали на участие как НАДФН-оксидазы, так и диаминоксидазы в формировании сигнального пула пероксида водорода

в корнях проростков пшеницы. Однако неисследованной оставалась роль кальция как в образовании АФК при действии путресцина, так и в активации защитных реакций, в частности, компонентов антиоксидантной системы. В связи с этим целью работы явилось исследование ингибиторными методами участия различных пулов кальция в регуляции образования пероксида водорода, активности антиоксидантных ферментов и индуцировании путресцином теплоустойчивости проростков пшеницы.

Материалы и методики исследования

Объект исследования – этиолированные проростки мягкой озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Досконала, полученные из коллекции Института растениеводства им. В.Я. Юрьева НААН Украины, репродукция 2019 г. Зерновки поверхностно обеззараживали в течение 30 мин в 6% растворе H_2O_2 и проращивали при температуре 20–22 °С на воде, очищенной с использованием системы водоподготовки, включающей в себя фильтр механической очистки, угольный фильтр и полупроницаемую обратноосмотическую мембрану с размером ячеек 1 нм. На третьи сутки проращивания семян в среду добавляли путресцин в концентрации 1 мМ и выдерживали проростки на его растворе в течение одних суток, проростки контрольного варианта продолжали инкубировать на очищенной водопроводной воде. Концентрация путресцина, индуцирующая максимальное развитие теплоустойчивости проростков, установлена ранее [21]. В отдельных вариантах опыта проростки в течение 26 ч обрабатывали антагонистами кальция – 500 мкМ ЭГТА (хелатор внеклеточного Ca^{2+}) и 200 мкМ неомицином – ингибитором зависимого от фосфолипазы С поступления кальция в цитозоль из внутриклеточных компартментов. В вариантах по изучению комбинированного действия путресцина и антагонистов кальция последние вносили в среду инкубации проростков за 2 ч до добавления в нее путресцина. Концентрации антагонистов Ca^{2+}, существенно модифицирующие эффекты экзогенного путресцина, но не вызывающие заметных токсических эффектов, выбирали в предварительных опытах.

Все биохимические показатели определяли в корнях проростков, поскольку они более чувствительны к воздействиям экзогенных соединений и нагрева [22]. Содержание пероксида водорода в корнях определяли через 2 ч после начала их обработки путресцином [21] либо через 4 ч от начала обработки антагонистами Ca^{2+}. Количество H_2O_2 анализировали с помощью ферротиоцианатного метода, экстрагируя пероксид водорода из растительного материала на льду 5% трихлоруксусной кислотой [23].

Активность антиоксидантных ферментов определяли через 4 и 24 ч после начала инкубации проростков на растворе путресцина, а также через 5 ч после повреждающего прогрева проростков (10 мин при 45 °С). В вариантах с изучением эффектов кальциевых антагонистов время инкубации корней в

их растворах, а также в растворах путресцина и его комбинаций с ЭГТА или неомицином составляло 24-26 ч.

При определении активности антиоксидантных ферментов навески корней гомогенизировали на холоде в 0,15 М K, Na-фосфатном буфере (pH 7,6), содержавшем ЭДТА (0,1 мМ) и дитиотрейтол (1 мМ) [24]. Для анализа использовали супернатант после центрифугирования гомогената при 8000 *g* в течение 10 мин при 4 °С на центрифуге MPW 350R («MPW MedInstruments», Польша). Активность цитозольной супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1) определяли при pH 7,6, используя метод, в основе которого способность фермента конкурировать с нитросиним тетразолием за супероксидные анионы, образующиеся вследствие аэробного взаимодействия НАДН и феназинметосульфата; оптическую плотность определяли при 540 нм на спектрофотометре СФ-46 («ЛОМО», Россия). Активность каталазы (КФ 1.11.1.6) анализировали при pH 7,0 по количеству пероксида водорода, разложившегося за единицу времени. Активность гваяколпероксидазы (КФ 1.11.1.7) определяли, используя в качестве донора водорода гваякол, в качестве субстрата – пероксид водорода. Оптическую плотность продукта окисления гваякола определяли при 470 нм. Активность СОД выражали в усл. ед./(г сырой массы × мин), каталазы – в ммоль H_2O_2/(г сырой массы × мин), гваяколпероксидазы – в ммоль гваякола/(г сырой массы × мин).

Для определения теплоустойчивости проростков их подвергали повреждающему прогреву в водяном ультратермостате при температуре 45,0 ± 0,1 °С в течение 10 мин. После этого проростки всех вариантов переносили на очищенную воду. Через 3 суток оценивали относительное количество выживших проростков [22].

Состояние мембран клеток корней оценивали через 5 ч после повреждающего прогрева по выходу веществ, поглощающих в ультрафиолетовой области спектра (преимущественно свободных нуклеотидов) [25]. Корни интактных проростков погружали в стаканчики с дистиллированной водой на 1 ч, после чего отделяли от проростков и взвешивали. Оптическую плотность инкубационного раствора определяли при A_{252} и A_{264} на спектрофотометре СФ 46 («ЛОМО», Россия). Выход веществ рассчитывали как отношение усредненной величины, измеренной при указанных длинах волны, к массе корней и выражали в процентах к величинам, вычисленным для корней проростков, не подвергнутых повреждающему прогреву.

Опыты проводили в 5-кратной биологической повторности и каждый независимо воспроизводили два раза. На рисунках и в таблице приведены средние арифметические величины и их стандартные ошибки ($M \pm m_M$). Статистическую значимость различий определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента. Кроме специально оговоренных случаев, обсуждаются эффекты, значимые при $p \leq 0{,}05$.

Результаты исследования

Проведенное нами ранее исследование динамики содержания пероксида водорода в корнях проростков пшеницы при обработке 1 мМ путресцином показало, что уже через 1 ч после ее начала количество H_2O_2 увеличивалось. Максимальное повышение его содержания наблюдалось через 2 ч, через 4 ч содержание пероксида водорода в опытном варианте несколько снижалось, хотя и существенно превышало значения контроля, а к 24 ч от начала обработки почти возвращалось к величинам контрольного варианта [21]. В связи с этим влияние антагонистов кальция на проявление эффекта накопления пероксида водорода, вызываемого обработкой путресцином, оценивали через 2 ч после его воздействия на корни проростков. В это время в варианте с путресцином оно увеличивалось более чем на 30% (рис. 1).

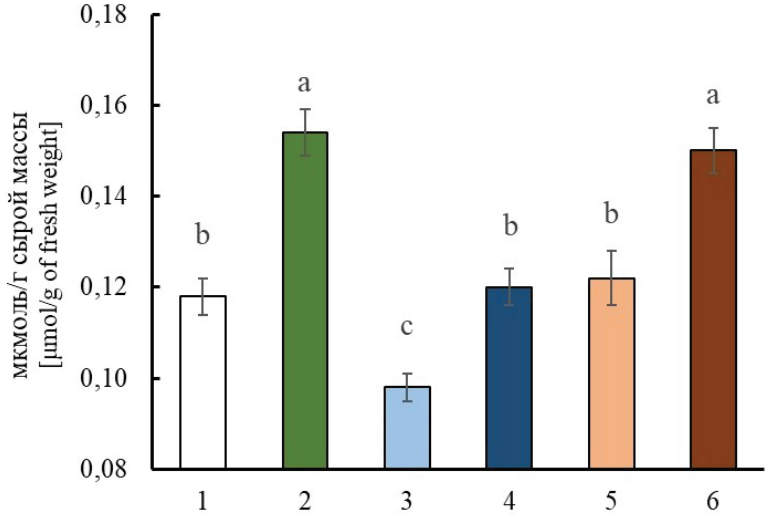

Рис. 1. Содержание пероксида водорода (мкмоль/г сырой массы) в корнях проростков пшеницы при обработке путресцином и антагонистами кальция ($M \pm m_M$): *1* – контроль; *2* – путресцин (1 мМ); *3* – ЭГТА (500 мкМ); *4* – путресцин (1 мМ) + ЭГТА (500 мкМ); *5* – неомицин (200 мкМ); 6 – путресцин (1 мМ) + неомицин (200 мкМ). Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми статистически не значимы ($p \leq 0{,}05$)

[**Fig. 1.** The content of hydrogen peroxide (µmol/g of fresh weight) in the roots of wheat seedlings when treated with putrescine and calcium antagonists ($M \pm m_M$). 1 - Control; 2 - Putrescine (1 mM); 3 - EGTA (500 µM); 4 - Putrescine (1 mM) + EGTA (500 µM); 5 - Neomycin (200 µM); 6 - Putrescine (1 mM) + neomycin (200 µM). The data are expressed as the mean with standard error using Student's *t*-test. The same Latin letters denote quantities between which differences are not significant ($p \leq 0.05$)]

Обработка корней проростков хелатором внеклеточного кальция ЭГТА сама по себе вызывала небольшое, но статистически не значимое ($p \leq 0{,}05$) снижение содержания H_2O_2 в корнях. При комбинированной обработке ЭГТА и путресцином количество пероксида водорода в корнях не отлича-

лось от величины контроля. Иными словами, обработка ЭГТА устраняла эффект повышения содержания H_2O_2 в тканях корней, вызываемый действием путресцина (см. рис. 1). Под влиянием другого антагониста кальция – неомицина – количество пероксида водорода в корнях не изменялось. Этот ингибитор поступления кальция в цитозоль из внутриклеточных компартментов не устранял и повышение содержания H_2O_2 в корнях в присутствии путресцина. Таким образом, усиление образования пероксида водорода в корнях, происходящее при их обработке путресцином, зависело в основном от поступления кальция в цитозоль из внеклеточного пространства.

Обработка проростков путресцином вызывала изменение активности антиоксидантных ферментов в корнях. Так, уже через 4 ч после начала обработки отмечалось повышение активности СОД, каталазы и гваяколероксидазы (таблица). Еще более высокие значения активности СОД проявлялись через 24 ч инкубации проростков в среде с путресцином. Активность других исследуемых ферментов в этот период также была повышенной.

Через 5 ч после повреждающего прогрева активность СОД и каталазы в корнях проростков контрольного варианта снижалась, а гваяколпероксидазы – существенно не изменялась (см. таблицу).

Активность антиоксидантных ферментов в корнях проростков пшеницы при обработке путресцином и действии теплового стресса [The activity of antioxidant enzymes in the roots of wheat seedlings during treatment with putrescine and the action of heat stress] ($M \pm m_M$)

Вариант [Sample]	Фаза эксперимента [Experiment phase]		
	Через 4 ч после начала обработки путресцином [4 hours after the start of treatment with putrescine]	Через 24 ч после начала обработки путресцином [24 hours after the start of treatment with putrescine]	Через 5 ч после повреждающего прогрева [5 hours after damaging warm-up]
СОД, усл. ед./(г сырой массы • мин) [SOD, con. u./(g of fresh weight • min)]			
Контроль [Control]	22,8 ± 0,64 b*	22,6 ± 0,52 b	18,2 ± 0,62 c
Путресцин (1 мМ) [Putrescine (1 mM)]	27,7 ± 0,71 a	29,8 ± 0,76 a	22,6 ± 0,66 b
Каталаза (ммоль H_2O_2/(г сырой массы • мин) [Catalase, mmol H_2O_2/(g of fresh weight • min)]			
Контроль [Control]	0,83 ± 0,05 b	0,80 ± 0,04 b	0,67 ± 0,03 c
Путресцин (1 мМ) [Putrescine (1 mM)]	1,12 ± 0,04 a	1,17 ± 0,06 a	0,96 ± 0,06 ab
Пероксидаза, ммоль тетрагваякола/(г сырой массы • мин) [Peroxidase, mmol tetra guaiacol/(g of fresh weight • min)]			
Контроль [Control]	0,110 ± 0,005 b	0,122 ± 0,004 b	0,104 ± 0,006 b
Путресцин (1 мМ) [Putrescine (1 mM)]	0,143 ± 0,006 a	0,148 ± 0,004 a	0,139 ± 0,003 a

* Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не значимы при $p \leq 0,05$.

[The same Latin letters denote quantities between which differences are not significant for $p \leq 0.05$].

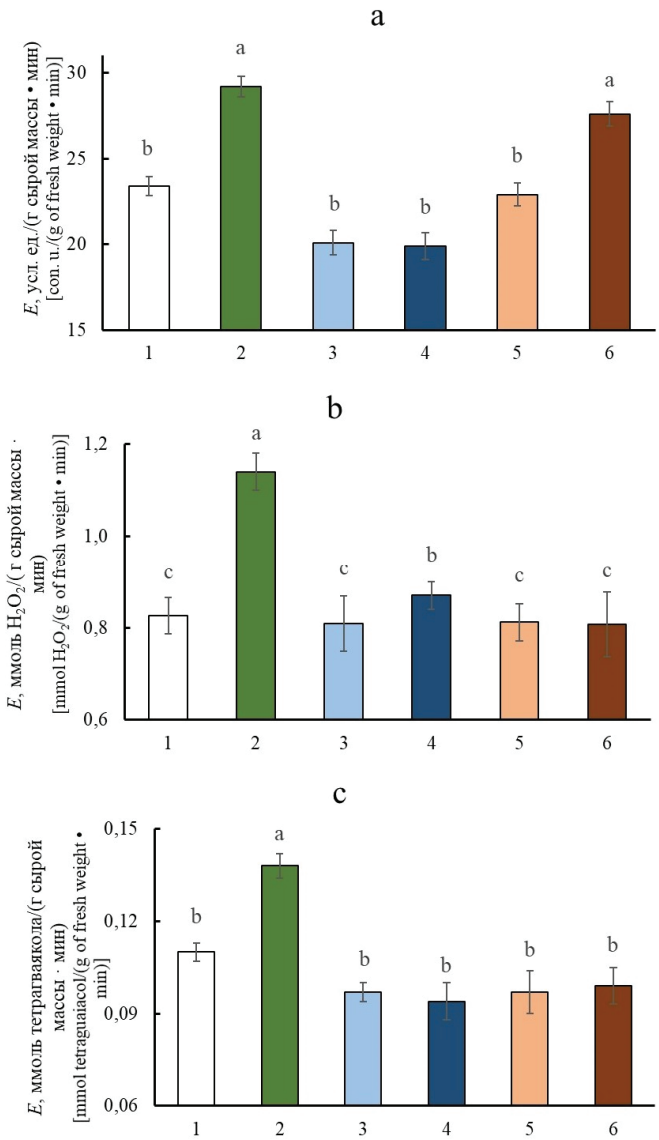

Рис. 2. Активность СОД (*a*), каталазы (*b*) и гваяколпероксидазы (*c*) в корнях проростков пшеницы при обработке путресцином и антагонистами кальция ($M \pm m_M$): *1* – контроль; *2* – путресцин (1 мМ); *3* – ЭГТА (500 мкМ); *4* – путресцин 1 мМ) + ЭГТА (500 мкМ); *5* – неомицин (200 мкМ); *6* – путресцин (1 мМ) + неомицин (200 мкМ). Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми статистически не значимы ($p \leq 0{,}05$)

[**Fig. 2.** SOD activity (a), catalase (b), and guaiacol peroxidase (c) in the roots of wheat seedlings when treated with putrescine and calcium antagonists ($M \pm m_M$). 1 - Control; 2 - Putrescine (1 mM); 3 - EGTA (500 μM); 4 - Putrescine (1 mM) + EGTA (500 μM); 5 - Neomycin (200 μM); 6 - putrescine (1 mM) + neomycin (200 μM). The same Latin letters denote quantities between which differences are not significant ($p \leq 0.05$)]

При этом в варианте с обработкой путресцином значения активности всех трех исследуемых ферментов существенно превышали соответствующие величины контроля.

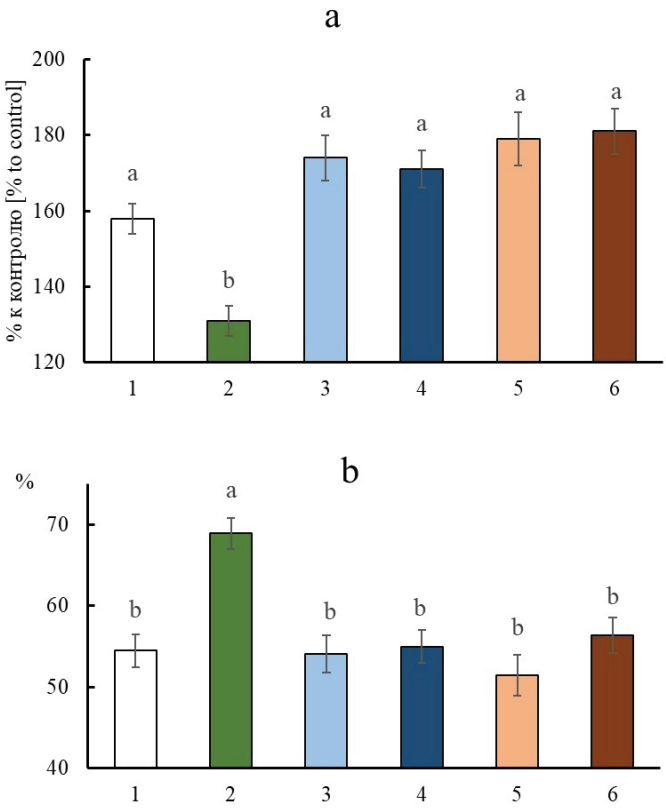

Рис. 3. Выход веществ, поглощающих в УФ-области спектра, из корней проростков пшеницы (*a*) и выживание проростков (*b*) после повреждающего прогрева ($M \pm m_M$): *1* – контроль; *2* – путресцин (1 мМ); *3* – ЭГТА (500 мкМ); *4* – путресцин (1 мМ) + ЭГТА (500 мкМ); *5* – неомицин (200 мкМ); *6* – путресцин (1 мМ) + неомицин (200 мкМ). Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не значимы при $p \leq 0{,}05$

[**Fig. 3.** Yield substances, absorbing in the UV region of the spectrum, from the roots of wheat seedlings (a) and seedling survival (b) after a damaging heating ($M \pm m_M$). 1 - Control; 2 - Putrescine (1 mM); 3 - EGTA (500 μM); 4 - Putrescine (1 mM) + EGTA (500 μM); 5 - Neomycin (200 μM); 6 - Putrescine (1 mM) + neomycin (200 μM). The same Latin letters denote quantities between which differences are not significant for $p \leq 0.05$]

Для оценки зависимости индуцирования антиоксидантных ферментов путресцином от кальциевого гомеостаза изучали влияние антагонистов Ca^{2+} на величины их активности через 24 ч после начала обработки путресцином или через 26 ч воздействия антагонистов кальция. Обработка корней ЭГТА

существенно не влияла на наблюдаемые величины активности СОД, каталазы и гваяколпероксидазы (рис. 2). В то же время хелатор ионов кальция почти полностью устранял вызываемый путресцином эффект повышения активности всех трех исследуемых ферментов.

Обработка проростков неомицином сама по себе существенно не влияла на активность СОД, каталазы и гваяколпероксидазы. Этот ингибитор почти не влиял и на проявление эффекта повышения активности СОД, вызываемого путресцином (см. рис. 2). Однако неомицин практически полностью нивелировал вызываемое путресцином повышение активности каталазы и гваяколпероксидазы.

Действие на проростки теплового стресса вызывало повышение выхода из клеток корней веществ, поглощающих в области УФ, почти на 60% (рис. 3, *a*). Обработка путресцином способствовала сохранению целостности биомембран. Под влиянием антагонистов кальция ЭГТА и неомицина отмечалась тенденция к усилению повреждений мембран, хотя этот эффект был статистически не значимым ($p \leq 0{,}05$). При этом как ЭГТА, так и неомицин нивелировали эффект снижения выхода веществ, поглощающих в УФ-В, вызываемый обработкой проростков путресцина.

Антагонисты кальция сами по себе в условиях наших экспериментов практически не влияли на теплоустойчивость проростков пшеницы (рис. 3, *b*). Однако они практически полностью снимали эффект повышения выживаемости проростков после стресса, вызываемый обработкой путресцином. Таким образом, оба антагониста кальция (ЭГТА и неомицин) устраняли положительное влияние путресцина на состояние мембран и выживание проростков после теплового стресса.

Обсуждение результатов исследования

Полученные результаты свидетельствуют об участии кальция как сигнального посредника в реализации протекторного действия путресцина на проростки пшеницы при тепловом стрессе. По-видимому, ионы Ca^{2+} задействованы в процессе усиления образования пероксида водорода, происходящего при обработке корней путресцином и формировании АФК-сигнала. Об этом свидетельствует устранение индуцированного путресцином повышения содержания H_2O_2 хелатором кальция ЭГТА (см. рис. 1). Примечательно, что другой антагонист кальция – неомицин, который, ингибируя фосфолипазу С, угнетает поступление кальция в цитозоль из внутриклеточных компартментов [26], не влиял на эффект повышения содержания пероксида водорода в корнях при обработке путресцином.

В литературе имеются немногочисленные и весьма неоднозначные сведения о влиянии полиаминов, в том числе путресцина, на кальциевый гомеостаз. Так, показано, что этот полиамин может активировать Ca^{2+}-насосы плазмалеммы и тем самым усиливать выход кальция из цитозоля во внекле-

точное пространство [27]. С другой стороны, как отмечалось, происходящая при увеличении содержания полиаминов активация диаминоксидазы и полиаминоксидазы приводит к усилению образования АФК за счет окисления полиаминов [11]. При этом пероксид водорода и образующийся в результате неферментативных реакций гидроксильный радикал могут способствовать открыванию неселективных кальциевых каналов и поступлению кальция в цитозоль. Следует отметить, что ранее нами показано устранение вызываемого путресцином усиления образования пероксида водорода в корнях при их обработке ингибитором диаминоксидазы гуанидином, что указывает на значительный вклад этого фермента в индуцируемую путресцином генерацию АФК клетками корней проростков пшеницы [21].

Влияние кальция на активность диаминоксидазы у растений исследовано слабо. Хотя в корнях и побегах проростков гороха зарегистрировано повышение ее активности при обработке экзогенным Ca^{2+} (10 мМ) [28]. Похожие эффекты под влиянием экзогенного кальция обнаружены и у семядольных листьев сои [29], проростков конских бобов [30], клеток корнеплодов моркови [31]. Диаминоксидаза, генерирующая пероксид водорода, локализована в клеточных стенках [32]. Не исключено, что в ее активации задействован кальций, попадающий в апопласт при активации путресцином его выхода из клеток [27]. Кроме того, известна способность полиаминов вытеснять кальций из его комплексов с пектиновыми веществами клеточных стенок [33]. Тем не менее возможность прямой активации диаминоксидазы кальцием пока не доказана. В связи с этим для выяснения вопроса о том, требует ли вызываемый путресцином процесс активации диаминоксидазы ионов кальция, необходимы специальные исследования.

Другим источником АФК, генерируемых при обработке корней проростков пшеницы путресцином, очевидно, является НАДФН-оксидаза. На это указывает существенное угнетение вызываемого путресцином увеличения содержания H_2O_2 в тканях корней под действием имидазола – ингибитора НАДФН-оксидазы [21]. Вполне вероятно, что открывание части кальциевых каналов под влиянием АФК, образующихся вследствие окисления путресцина диаминоксидазой, может приводить к активации НАДФН-оксидазы. Как известно, НАДФН-оксидаза может непосредственно активироваться ионами кальция при их присоединении к кальцийсвязывающим доменам, локализованным на цитозольной стороне белка [17, 34]. Показан эффект активации зависимой от НАДФН-оксидазы генерации супероксидного анион-радикала клетками колеоптилей пшеницы при их обработке кальциевым ионофором А23187 [18]. Поскольку, как обнаружено ранее, повышение содержания пероксида водорода в корнях под влиянием путресцина развивается во времени постепенно, можно предположить участие в этом процессе двух ферментов – диаминоксидазы и НАДФН-оксидазы [21]. Как уже упоминалось, о роли двух ферментов в процессе генерации АФК свидетельствуют и результаты ингибиторного анализа (угнетение образования пероксида

водорода под влиянием ингибиторов диаминоксидазы и НАДФН-оксидазы). В целом полученные результаты свидетельствуют, по крайней мере, о зависимости процесса усиления генерации АФК под влиянием путресцина от кальциевого гомеостаза.

По-видимому, кальций задействован и в последующих процессах повышения активности антиоксидантных ферментов в ответ на обработку путресцином (см. рис. 2). Примечательно, что вызываемое экзогенным путресцином повышение активности СОД полностью устранялось ЭГТА, но не неомицином. Вероятно, данный процесс зависит в основном от поступления кальция из внеклеточного пространства. В то же время путресцин-индуцированное повышение активности двух других антиоксидантных ферментов – каталазы и гваяколпероксидазы – угнеталось не только ЭГТА, но и неомицином, что указывает на зависимость этого процесса от поступления кальция в цитозоль из внутриклеточных компартментов.

Наконец, изменение интегральных показателей (стабильности биомембран и выживания проростков после повреждающего прогрева), вызываемое экзогенным путресцином, также зависит от поступления кальция в цитозоль, притом как из внеклеточного пространства, так и из внутренних компартментов. На это указывает практически полное нивелирование протекторных эффектов путесцина как ЭГТА, так и неомицином (см. рис. 3). Следует отметить, что феномен повышения стабильности биомембран при тепловом стрессе под влиянием экзогенного путресцина согласуется с результатами работы [20], в которой показано повышение содержания низкомолекулярных антиоксидантов в корнях и снижение в стрессовых условиях количества продукта пероксидного окисления липидов малонового диальдегида.

Итак, индуцирование теплоустойчивости проростков пшеницы путресцином зависит от функционального взаимодействия между ионами кальция и АФК как сигнальными посредниками.

Заключение

Последовательность развития процессов в тканях корней проростков пшеницы в ответ на обработку путресцином можно представить в виде следующей гипотетической схемы: повышение концентрации путресцина во внеклеточном пространстве → активация диаминоксидазы и изменение содержания кальция в апопласте → повышение содержания АФК в апопласте → открывание кальциевых каналов → повышение $[Ca^{2+}]_{цит.}$ → увеличение активности НАДФН-оксидазы → усиление генерации АФК и поступление их в цитозоль (в первую очередь H_2O_2) → дополнительная модификация кальциевого гомеостаза → формирование Ca^{2+}- и АФК-сигналов, усиливающих экспрессию генов антиоксидантных ферментов → активация ферментативной антиоксидантной и других протекторных систем → повышение теплоустойчивости. Безусловно, для подтверждения такой последователь-

ности развития событий необходимы специальные исследования, в частности, непосредственное изучение динамики активности диаминоксидазы и НАДФН-оксидазы, исследование механизма влияния кальция на активность диаминоксидазы, определение экспрессии генов антиоксидантных ферментов и ее зависимости от кальциевого гомеостаза при действии путресцина.

Литература

1. Gill S.S., Tuteja N. Polyamines and abiotic stress tolerance in plants // Plant Signaling Behavior. 2010. Vol. 5, № 1. PP. 26–33. https://doi.org/10.4161/psb.5.1.10291
2. Кузнецов Вл.В., Радюкина Н.Л., Шевякова Н.И. Полиамины при стрессе: биологическая роль, метаболизм и регуляция // Физиология растений. 2006. Т. 53, № 5. С. 658–683.
3. Szalai G., Pap M., Janda T. Light-induced frost tolerance differs in winter and spring wheat plants // Journal Plant Physiology. 2009. Vol. 166. PP. 1826–1831. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.04.016
4. Alcazar R., Altabella T., Marco F., Bortolotti C., Reymond M., Koncz C., Carrasco P., Tiburcio A.F. Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance // Planta. 2010. Vol. 231, № 6. PP. 1237–1249. https://doi.org/10.1007/s00425-010-1130-0
5. Campestre M.P., Bordenave C.D., Origone A.C., Menendez A.B., Ruiz O.A., Rodriguez A.A., Maiale S.J. Polyamine catabolism is involved in response to salt stress in soybean hypocotyls // Journal Plant Physiology. 2011. Vol. 168. PP. 1234–1240. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.01.007
6. Kuznetsov Vl.V., Shevyakova N.I. Polyamines and plant adaptation to saline environment // Desert Plants. Biology and Biotechnology, ed. Ramawat K.B. Berlin, Heidelberg: Springer, 2011. PP. 261–297. https://doi.org/10.1007/978-3-642-02550-1_13
7. Pal M., Szalai G., Janda T. Speculation: Polyamines are important in abiotic stress signaling // Plant Science. 2015. Vol. 237. PP. 16–23. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.05.003
8. Ha H.C., Sirisoma N.S., Kuppusamy P., Zweier J.L., Woster P.M., Casero R.A.Jr. The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 1998. Vol. 95, № 19. PP. 11140–11145. https://doi.org/10.1073/pnas.95.19.11140
9. Tanou G., Ziogas V., Belghazi M., Christou A., Filippou P., Job D., Fotopoulos V., Molassiotis A. Polyamines reprogram oxidative and nitrosative status and the proteome of citrus plants exposed to salinity stress // Plant, Cell & Environment. 2014. Vol. 37, № 4. PP. 864–885. https://doi.org/10.1111/pce.12204
10. Dobrovinskaya O.R., Muniz J., Pottosin I. Inhibition of vacuolar ion channels by polyamines // The Journal of Membrane Biology. 1999. Vol. 167. PP. 127–140. https://doi.org/10.1007/s002329900477
11. Pottosin I., Shabala S. Polyamines control of cation transport across plant membranes: implications for ion homeostasis and abiotic stress signaling // Frontiers in Plant Science. 2014. Vol. 5, Art. 154. https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00154
12. Bose J., Pottosin I.I., Shabala S.S., Palmgren M.G., Shabala S. Calcium efflux systems in stress signaling and adaptation in plants // Frontiers in Plant Science. 2011. Vol. 2, Art. 85. https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00085
13. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Активные формы кислорода и стрессовый сигналинг у растений // The Ukrainian Biochemical Journal. 2014. Vol. 86, № 4. PP. 18–35. http://dx.doi.org/10.15407/ubj86.04.018
14. Mori I.C., Schroeder J.S. Reactive oxygen species activation of plant Ca^{2+} channels.

A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction // Plant Physiology. 2004. Vol. 135. PP. 702–708. https://doi.org/10.1104/pp.104.042069
15. Sagi M., Fluhr R. Production of reactive oxygen pecies by plant NADPH oxidases // Plant Physiology. 2006. Vol. 141. PP. 336–340. https://doi.org/10.1104/pp.106.078089
16. Demidchik V., Maathuis F.J.M. Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development // New Phytologist. 2007. Vol. 175. PP. 387–404. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02128.x
17. Oda T., Hashimoto H., Kuwabara N., Akashi S., Hayashi K., Kojima C., Wong H.L., Kawasaki T., Shimamoto K., Sato M., Shimizu T. Structure of the N-terminal regulatory domain of a plant NADPH oxidase and its functional implications // The Journal of Biological Chemistry. 2010. Vol. 285. PP. 1435–1445. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.058909
18. Karpets Yu.V., Kolupaev Yu.E., Yastreb T.O., and Dmitriev O.P. Possible pathways of heat resistance induction in plant cells by exogenous nitrogen oxide // Cytology and Genetics. 2012. Vol. 46, № 6. PP. 354–359. https://doi.org/10.3103/S0095452712060059
19. Ghalati R.E., Shamili M., Homaei A. Effect of putrescine on biochemical and physiological characteristics of guava (*Psidium guajava* L.) seedlings under salt stress // Scientia Horticulturae. 2020. Vol. 261. Art. 108961. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108961
20. Asthir B., Kumar R., Bains N.S. Why and how putrescine modulates thermotolerance in wheat? // Indian Journal of Biochemistry and Biophysics. 2018. Vol. 55, № 6. PP. 404–412.
21. Kolupaev Yu.E., Kokorev A.I., Yastreb T.O., Horielova E.I. Hydrogen peroxide as a signal mediator at inducing heat resistance in wheat seedlings by putrescine // The Ukrainian Biochemical Journal. 2019. Vol. 91, № 6. PP. 103–111. https://doi.org/10.15407/ubj91.06.103
22. Колупаев Ю.Е., Обозный А.И., Швиденко Н.В. Роль пероксида водорода в формировании сигнала, индуцирующего развитие теплоустойчивости проростков пшеницы // Физиология растений. 2013. Т. 60, № 2. С. 221–229. https://doi.org/10.7868/S0015330313020127
23. Sagisaka S. The occurrence of peroxide in a perennial plant, *Populus gelrica* // Plant Physiology. 1976. Vol. 57, № 2. PP. 308–309. https://doi.org/10.1104/pp.57.2.308
24. Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О., Обозный А.И. Влияние модификации NO-статуса, закаливающего прогрева и пероксида водорода на активность антиоксидантных ферментов в проростках пшеницы // Физиология растений. 2015. Т. 62, № 3. С. 317–323. https://doi.org/10.7868/S0015330315030094
25. Мелехов Е.И., Ефремова Л.К. Влияние экзогенных фитогормонов на устойчивость растительных клеток к нагреву и 2,4-Д // Физиология растений. 1990. Т. 37, № 3. С. 561–568.
26. Liu H.T., Huang W.D., Pan Q.H., Weng F.H., Zhan J.C., Liu Y., Wan S.B., Liu Y.Y. Contributions of PIP2-specific-phospholipase C and free salicylic acid to heat acclimation induced thermotolerance in pea leaves // Journal of Plant Physiology. 2006. Vol. 163, № 4. PP. 405–416. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.04.027
27. Pottosin I., Velarde-Buendía A.M., Bose J., Fuglsang A.T., Shabala S. Polyamines cause plasma membrane depolarization, activate Ca^{2+}-, and modulate H^{+}-ATPase pump activity in pea roots // Journal of Experimental Botany. 2014. Vol. 65, № 9. PP. 2463–2472. https://doi.org/10.1093/jxb/eru133
28. Piterková J., Luhová L., Zajoncová L., Šebela M., Petřivalský M. Modulation of polyamine catabolism in pea seedlings by calcium during salinity stress // Plant Protection Science. 2012. Vol. 48, № 2. PP. 53–64. https://doi.org/10.17221/62/2011-PPS
29. Guo Y., Yang R., Chen H., Song Y., Gu Z. 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. 2012. Vol. 234. PP. 679–687. https://doi.org/10.1007/s00217-012-1678-y
30. Yang R., Chen H., Gu Z. Factors influencing diamine oxidase activity and γ-aminobutyric acid content of fava bean (*Vicia faba* L.) during germination // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2011. Vol. 59. PP. 11616–11620. https://doi.org/10.1021/jf202645p
31. Wang K., Xu F., Cao S., Wang H., Wei Y., Shao X., Zhou W., Zheng Y. Effects of exogenous calcium chloride ($CaCl_2$) and ascorbic acid (AsA) on the γ-aminobutyric acid (GABA) metabolism in shredded carrots // Postharvest Biology and Technology. 2019. Vol. 152. PP. 111–117. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.03.005
32. Шарова Е.И., Медведев С.С. Редокс-реакции в апопласте растущих клеток // Физиология растений. 2017. Т. 64, № 1. С. 3–18. https://doi.org/10.7868/S0015330317010146
33. Messiaen J., Van Cutsem P. Polyamines and pectins. II. Modulation of pectic-signal transduction // Planta. 1999. Vol. 208. PP. 247–256. https://doi.org/10.1007/s004250050556
34. Глянько А.К., Ищенко А.А. Структурные и функциональные особенности НАДФН-оксидазы растений (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2010. Т. 46, № 5. С. 509–518.

Поступила в редакцию 09.07.2020 г.;
принята 19.08.2020 г.; опубликована 25.09.2020 г.

Авторский коллектив:
Колупаев Юрий Евгеньевич – д-р биол. наук, профессор, зав. кафедрой ботаники и физиологии растений, факультет защиты растений, Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева (Украина, 62483, г. Харьков, п/о Докучаевское-2); профессор кафедры физиологии и биохимии растений и микроорганизмов, биологический факультет, Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина (Украина, 61002, г. Харьков, пл. Свободы, 4).
ORCID iD: https://orcid.org/0000-0001-7151-906X
E-mail: plant.biology.knau@gmail.com
Кокорев Александр Игоревич – аспирант кафедры ботаники и физиологии растений, факультет защиты растений, Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева (Украина, 62483, г. Харьков, п/о Докучаевское-2).
E-mail: plant.biology.knau@gmail.com
Шкляревский Максим Анатольевич – ассистент кафедры лесоводства, факультет лесного хозяйства, Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева (Украина, 62483, г. Харьков, п/о Докучаевское-2)
ORCID iD: http://orcid.org/0000-0001-7781-4481
E-mail: plant.biology.knau@gmail.com

Для цитирования: Колупаев Ю.Е., Кокорев А.И., Шкляревский М.А. Кальцийзависимое изменение активности антиоксидантных ферментов и теплоустойчивости проростков пшеницы под влиянием экзогенного путресцина // Вестн. Том. гос. ун-та. Биология. 2020. № 51. С. 105–122. doi: 10.17223/19988591/51/6

For citation: Kolupaev YE, Kokorev AI, Shkliarevskyi MA. Calcium-dependent changes in the activity of antioxidant enzymes and heat resistance of wheat seedlings under the influence of exogenous putrescine. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2020;51:105-122. doi: 10.17223/19988591/51/6 In Russian, English Summary

Yuriy E. Kolupaev[1, 2], Alexandr I. Kokorev[1], Maxim A. Shkliarevskyi[1]

[1] *Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University, Kharkiv, Ukraine*
[2] *Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine*

Calcium-dependent changes in the activity of antioxidant enzymes and heat resistance of wheat seedlings under the influence of exogenous putrescine

Polyamines are important stress plant metabolites involved in the regulation of redox homeostasis and other signaling processes. Polyamines can affect redox homeostasis by binding free radicals and participating in the regulation of gene expression of antioxidant enzymes. However, their metabolism produces hydrogen peroxide and other reactive oxygen species (ROS). A separate component of the physiological activity of polyamines may be their effect on the state of ion channels. It is known that there are complex bonds between ROS and calcium ions as signal mediators. However, the functional interaction between ROS and calcium ions in the implementation of the effects of polyamines on plant cells has been studied very poorly. Moreover, the question of the role of such interactions in the realization of stress-protective effects of polyamines remains open. The aim of this research was to study the inhibitory methods of the involvement of different pools of calcium in the regulation of the formation of hydrogen peroxide, the activity of antioxidant enzymes and inducing putrescine thermostability of wheat seedlings.

The object of the study was etiolated seedlings of soft winter wheat (*Triticum aestivum* L.) of Doskonala variety. Three-day-old seedlings were treated with putrescine at a concentration of 1 mM. In certain experimental variants, the seedlings were treated with calcium antagonists - EGTA (Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N′,N′-tetraacetic acid - extracellular Ca^{2+} chelator) and neomycin - an inhibitor of phospholipase C-dependent calcium intake into the cytosol from intracellular compartments, as well as with the indicated inhibitors in combination with putrescine. In the roots of seedlings some time after treatment with test compounds, we determined hydrogen peroxide content and the activity of antioxidant enzymes. One day after seedling treatment with putrescine, calcium antagonists and a combination of effectors, the seedlings were subjected to damaging heating in a water thermostat (10 min at 45 °C). 5 hours after heating, we assessed damage to the root cell membranes by the yield of compounds absorbing in the UV-B, as well as the activity of antioxidant enzymes.

2 hours after the start of root treatment with putrescine, we noted a significant increase in the content of hydrogen peroxide in them (*See Fig. 1*). This effect was eliminated by treatment with EGTA, but not with neomycin. The treatment of seedlings with putrescine caused a change in the activity of all three studied antioxidant enzymes in roots (superoxide dismutase - SOD, catalase, and guaiacol peroxidase) (*See Table*). The increased activity of these enzymes in the roots of seedlings treated with putrescine was also observed after damaging heating. The calcium ion chelator completely eliminated the putrescine-induced effect of increasing the activity of all three studied enzymes (*See Fig. 2*). Neomycin almost did not affect the manifestation of the effect of increasing the activity of SOD, however, it neutralized the increase in the activity of catalase and guaiacol peroxidase caused by putrescine. The effect of heat stress on the seedlings caused an increase in the yield of substances absorbing in the UV from the root cells. Treatment with putrescine helped preserve the integrity of biomembranes. Calcium antagonists EGTA and neomycin leveled off the effect of reducing the yield of substances absorbing in the UV-B caused by putrescine (*See Fig. 3*). They also almost completely eliminated the putrescine-induced increase in survival of seedlings after stress.

We can conclude that the induction of heat resistance of wheat seedlings by putrescine depends on the functional interaction between calcium ions and ROS as signaling agents. The activation process of the enzymatic antioxidant system, necessary for the formation of heat resistance of plants, depends on the formation of ROS, which occurs with the participation of diamine oxidase and NADPH oxidase. At the same time, the accumulation of the signal pool of hydrogen peroxide is dependent on the influx of calcium into cytosol from extracellular space. The further activation process of the antioxidant enzyme complex under the influence of putrescine treatment also depends on the influx of calcium into cytosol, not only from extracellular space, but also from intracellular compartments.

The paper contains 3 Figures, 1 Table and 34 References.

Key words: *Triticum aestivum;* polyamines; putrescine; redox homeostasis; calcium; heat resistance.

The Authors declare no conflict of interest.

References

1. Gill SS, Tuteja N. Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signaling Behavior*. 2010;5(1):26-33. doi: 10.4161/psb.5.1.10291
2. Kuznetsov VlV, Radyukina NL, Shevyakova NI. Polyamines and stress: Biological role, metabolism, and regulation. *Russian J Plant Physiology*. 2006;53(5):583-604. doi: 10.1134/S1021443706050025
3. Szalai G, Pap M, Janda T. Light-induced frost tolerance differs in winter and spring wheat plants. *J Plant Physiology*. 2009;166:1826-1831. doi: 10.1016/j.jplph.2009.04.016
4. Alcazar R, Altabella T, Marco F, Bortolotti C, Reymond M, Koncz C, Carrasco P, Tiburcio AF. Polyamines: Molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta.* 2010;231(6):1237-1249. doi: 10.1007/s00425-010-1130-0
5. Campestre MP, Bordenave CD, Origone AC, Menendez AB, Ruiz OA, Rodriguez AA, Maiale SJ. Polyamine catabolism is involved in response to salt stress in soybean hypocotyls. *J Plant Physiology*. 2011;168:1234-1240. doi: 10.1016/j.jplph.2011.01.007
6. Kuznetsov VlV, Shevyakova NI. Polyamines and plant adaptation to saline environment. In: *Desert Plants. Biology and Biotechnology*. Ramawat KB, editor. Berlin, Heidelberg: Springer Publ.; 2011. pp. 261-297. doi: 10.1007/978-3-642-02550-1_13
7. Pal M, Szalai G, Janda T. Speculation: Polyamines are important in abiotic stress signaling. *Plant Science*. 2015;237:16-23. doi: 10.1016/j.plantsci.2015.05.003
8. Ha HC, Sirisoma NS, Kuppusamy P, Zweier JL, Woster PM, Casero RAJr. The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1998;95(19):11140-11145. doi: 10.1073/pnas.95.19.11140
9. Tanou G, Ziogas V, Belghazi M, Christou A, Filippou P, Job D, Fotopoulos V, Molassiotis A. Polyamines reprogram oxidative and nitrosative status and the proteome of citrus plants exposed to salinity stress. *Plant, Cell & Environment*. 2014;37(4):864-885. doi: 10.1111/pce.12204
10. Dobrovinskaya OR, Muniz J, Pottosin I. Inhibition of vacuolar ion channels by polyamines. *The J Membrane Biology*. 1999;167:127-140. doi: 10.1007/s002329900477
11. Pottosin I, Shabala S. Polyamines control of cation transport across plant membranes: Implications for ion homeostasis and abiotic stress signaling. *Frontiers in Plant Science*. 2014;5:154. doi: 10.3389/fpls.2014.00154
12. Bose J, Pottosin II, Shabala SS, Palmgren M., Shabala S. Calcium efflux systems in stress signaling and adaptation in plants. *Frontiers in Plant Science*. 2011;2:85. doi: 10.3389/fpls.2011.00085

13. Kolupaev YuE, Karpets YuV. Reactive oxygen species and stress signaling in plants. *The Ukrainian Biochemical J*. 2014;86(4):18-35. doi: 10.15407/ubj86.04.018
14. Mori IC., Schroeder JS. Reactive oxygen species activation of plant Ca^{2+} channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction. *Plant Physiology*. 2004;135:702-708. doi: 10.1104/pp.104.042069
15. Sagi M, Fluhr R. Production of reactive oxygen pecies by plant NADPH oxidases. *Plant Physiology*. 2006;141:336-340. doi: 10.1104/pp.106.078089
16. Demidchik V, Maathuis FJM. Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytologist*. 2007;175:387-404. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02128.x
17. Oda T, Hashimoto H, Kuwabara N, Akashi S, Hayashi K, Kojima C, Wong HL., Kawasaki T, Shimamoto K, Sato M, Shimizu T. Structure of the N-terminal regulatory domain of a plant NADPH oxidase and its functional implications. *The J Biological Chemistry*. 2010;285:1435-1445. doi: 10.1074/jbc.M109.058909
18. Karpets YuV, Kolupaev YuE, Yastreb TO, Dmitriev OP. Possible pathways of heat resistance induction in plant cells by exogenous nitrogen oxide. *Cytology and Genetics*. 2012;46(6):354-359. doi: https://doi.org/10.3103/S0095452712060059
19. Ghalati RE, Shamili M, Homaei A. Effect of putrescine on biochemical and physiological characteristics of guava (*Psidium guajava* L.) seedlings under salt stress. *Scientia Horticulturae*. 2020;261:108961. doi: https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108961
20. Asthir B, Kumar R, Bains NS. Why and how putrescine modulates thermotolerance in wheat? *Indian J Biochemistry and Biophysics*. 2018;55(6):404-412.
21. Kolupaev YuE, Kokorev AI, Yastreb TO, Horielova EI. Hydrogen peroxide as a signal mediator at inducing heat resistance in wheat seedlings by putrescine. *The Ukrainian Biochemical J*. 2019;91(6):103-111. doi: 10.15407/ubj91.06.103
22. Kolupaev YuE., Oboznyi AI, Shvidenko NV. Role of hydrogen peroxide in generation of a signal inducing heat tolerance of wheat seedlings. *Russian J Plant Physiology*. 2013;60(2):227-234. doi: 10.1134/S102144371302012X
23. Sagisaka S. The occurrence of peroxide in a perennial plant, *Populus gelrica*. Plant Physiology. 1976;57(2):308-309. doi: 10.1104/pp.57.2.308
24. Karpets YuV, Kolupaev YuE, Yastreb TO, Oboznyi AI. Effects OF NO-status modification, heat hardening, and hydrogen peroxide on the activity of antioxidant enzymes in wheat seedlings. *Russian J Plant Physiology*. 2015;62(3):292-298. doi: doi: 10.1134/S1021443715030097
25. Melekhov EI, Efremova LK. Effect of phytohormones on plant cell stability to heating and to 2,4-D treatments. *Fiziologiya rasteniy = Russian J Plant Physiology*. 1990;37(3):561-568. In Russian
26. Liu HT, Huang WD, Pan QH, Weng FH, Zhan JC, Liu Y, Wan S, Liu YY. Contributions of PIP2-specific-phospholipase C and free salicylic acid to heat acclimation induced thermotolerance in pea leaves. *J Plant Physiology*. 2006;163(4):405-416. doi: 10.1016/j.jplph.2005.04.027
27. Pottosin I, Velarde-Buendía AM, Bose J, Fuglsang AT, Shabala S. Polyamines cause plasma membrane depolarization, activate Ca^{2+}-, and modulate H^{+}-ATPase pump activity in pea roots. *J Experimental Botany*. 2014;65(9):2463-2472. doi: 10.1093/jxb/eru133
28. Piterková J, Luhová L, Zajoncová L, Šebela M, Petřivalský M. Modulation of polyamine catabolism in pea seedlings by calcium during salinity stress. *Plant Protection Science*. 2012;48(2):53-64. doi: 10.17221/62/2011-PPS
29. Guo Y, Yang R, Chen H, Song Y, Gu Z. 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*. 2012;234:679-687. doi: 10.1007/s00217-012-1678-y

30. Yang R, Chen H, Gu Z. Factors influencing diamine oxidase activity and γ-aminobutyric acid content of fava bean (*Vicia faba* L.) during germination. *J Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59:11616-11620. doi: 10.1021/jf202645p
31. Wang K, Xu F, Cao S, Wang H, Wei Y, Shao X, Zhou W, Zheng Y. Effects of exogenous calcium chloride ($CaCl_2$) and ascorbic acid (AsA) on the γ-aminobutyric acid (GABA) metabolism in shredded carrots. *Postharvest Biology and Technology*. 2019;152:111-117. doi: 10.1016/j.postharvbio.2019.03.005
32. Sharova EI, Medvedev SS. Redox reactions in apoplast of growing cells. *Russian J Plant Physiology*. 2017;64(1):1-14. doi: 10.1134/S1021443717010149
33. Messiaen J, Van Cutsem P. Polyamines and pectins. II. Modulation of pectic-signal transduction. *Planta*. 1999;208:247-256. doi: 10.1007/s004250050556
34. Glyan'ko AK, Ischenko AA. Structural and functional characteristics of plant NADPH oxidase: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2010;46(5):463-471. doi: 10.1134/S0003683810050017

Received 09 July 2020;
Accepted 19 August 2020; Published 25 September 2020

Author info:
Kolupaev Yuriy E, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Head of the Department of Botany and Plant Physiology, Faculty of Plant Protection, Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University, p/o Dokuchaevskoe-2, Kharkiv 62483,Ukraine; Professor, Department of Physiology and Biochemistry of Plants and Microorganisms, Faculty of Biology, Karazin Kharkiv National University, 4 Svobody square, Kharkiv 61002, Ukraine.
ORCID iD: https://orcid.org/0000-0001-7151-906X
E-mail: plant.biology.knau@gmail.com
Kokorev Alexandr I, Graduate Student, Department of Botany and Plant Physiology, Faculty of Plant Protection, Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University, p/o Dokuchaevskoe-2, Kharkiv 62483,Ukraine.
E-mail: plant.biology.knau@gmail.com
Shkliarevskyi Maxim A, Assistant of the Department of Forestry, Faculty of Forestry, Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University, p/o Dokuchaevskoe-2, Kharkiv 62483,Ukraine.
ORCID iD: https://orcid.org/0000-0001-7781-4481
E-mail: plant.biology.knau@gmail.com