

РЕАЛІЗАЦІЯ ВПЛИВУ ПОЛІАМІНІВ НА СТАН ПРОДИХІВ ГОРОХУ ІЗ ЗАЛУЧЕННЯМ КАЛЬЦІЮ ТА КОМПОНЕНТІВ ЛІПІДНОГО СИГНАЛІНГУ

О.І. КОКОРЕВ¹, Ю.Є. КОЛУПАЄВ^{1,2,1}, Т.О. ЯСТРЕБ¹, О.І. ГОРЕЛОВА¹, О.П. ДМИТРИЄВ^{3,2}

¹ Харківський національний аграрний університет ім. В.В. Докучаєва, п/в Докучаєвське-2, 62483, Харків, Україна

² Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна, площа Свободи, 4, 61022, Харків, Україна

³ Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, вул. Академіка Заболотного, 148, 03143, Київ, Україна

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

*Поліаміни – метаболіти з широким спектром фізіологічної дії. Їх вплив на функціонування продихового апарату рослин залишається маловивченим. Метою роботи було дослідити з використанням інгібиторного аналізу можливу участь різних пулів кальцію та компонентів ліпідного сигналіngu в реалізації дії путресцину і сперміну на величину апертури продохів листків гороху (*Pisum sativum* L.). Показано, що інкубація епідермісу в присутності обох поліамінів в концентраціях діапазону 0,25–5 мМ спричиняла зменшення величини продихової апертури. Такий ефект відзначався вже через 1 год від початку інкубації, а найбільш вираженим був через 2,5 год експозиції в середовищі, що містило 1 мМ путресцин або спермін. У присутності блокатора кальцієвих каналів $LaCl_3$ вплив поліамінів на стан продохів виявлявся слабо. Їх ефекти частково нівелювалися хелатором позаклітинного кальцію ЕГТА, проте повністю усувалися інгібитором фосфоліпази С неоміцином. 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. Отримані результати вказують на можливу роль надходження кальцію в цитозоль з внутрішньоклітинних компартментів та значення сигнальних інтермедіатів, що утворюються за участю фосфоліпаз С і D, в реалізації продихових ефектів поліамінів.*

Ключові слова: поліаміни, продохи, кальцій, ліпідний сигналінг, *Pisum sativum*.

Вступ. Стан продохів у рослин залежить від багатьох зовнішніх і внутрішніх чинників. До останніх належать фітогормони і сигнальні посередники (Agurla et al, 2017; Raghavendra, Murata, 2017). Одним з основних гормонів, що впливають на стан продихового апарату рослин, вважається абсцизова кислота (АБК) (Neill, Burnett, 1999). Однак АБК далеко не

єдиний регулятор стану продохів. Їх закривання може бути індуковано іншими фітогормонами: етиленом, жасмоновою і саліциловою кислотами (Suhita et al, 2004; Liu et al, 2012; Miura et al, 2013; Yastreb et al, 2018), а також сигнальними посередниками – активними формами кисню (АФК), іонами кальцію, оксидом азоту (NO) (Kwak et al, 2006; Munemasa et al, 2011), сірководнем (H_2S) (Honda et al, 2015; Yastreb et al, 2019) і монооксидом вуглецю (She, Song, 2008). Принаймні частина цих посередників задіяна у реалізації регуляторних ефектів фітогормонів. Проте зміна їх концентрації може бути і самостійним механізмом регуляції стану продохів (Neill et al, 2008; Honda et al, 2015; Jin, Pei, 2015). При цьому вплив NO, H_2S , АБК, саліцилової кислоти і, ймовірно, інших агентів реалізується за посередництва компонентів ліпідного сигналіngu, які утворюються за допомогою фосфоліпаз С і D (Distéfano et al, 2008; Iakovenko et al, 2008a; Kalachova et al, 2013; Scuffi et al, 2018). Останніми роками також з'являються відомості про роль фосфорилування білків у функціонуванні молекулярної сигнальної мережі, що забезпечує регуляцію стану продохів (Panget al, 2020).

Поліаміни являють собою аліфатичні аміни, виявлені в усіх живих клітинах. Найбільш поширеними поліамінами рослин є путресцин, спермідин і спермін (Kuznetsov, Shevyakova, 2011; Pal et al, 2015). Нині поліаміни розглядаються як важливі учасники сигнальних процесів. При окисненні поліамінів ді- і поліаміноксидазами утворюється пероксид водню (Pal et al, 2015), генерація рослинними клітинами активних форм кисню (АФК) у присутності поліамінів може посилюватися і через підвищення активності НАДФН-оксидази (Andronis et al, 2014; Kolupaev et al, 2019). На прикладі рослин різних видів показано, що екзогенні

© О.І. КОКОРЕВ, Ю.Є. КОЛУПАЄВ, Т.О. ЯСТРЕБ,
О.І. ГОРЕЛОВА, О.П. ДМИТРИЄВ, 2021

поліаміни індукували генерацію ще однієї сигнальної молекули – NO (Yang et al, 2014). Зниження вивільнення NO спостерігалось у рослин арабідопсису, нокаутних за Cu-аміноксидазою 1 (Wimalasekera et al, 2011). Ці результати свідчать про те, що діаміноксидаза причетна до біосинтезу NO, зокрема, за дії екзогенних поліамінів. Повідомляється також про здатність поліамінів модулювати активність нитратредуктази та ферменту, подібного до NO синтази тварин (Pal et al, 2015). Зрештою, є відомості, що поліаміни, наприклад, путресцин, спроможні викликати підвищення концентрації цитозольного кальцію в рослинних клітинах (Bose et al, 2011). Принаймні частково такий ефект може бути пов'язаний з посиленням утворення АФК при деградації путресцину діаміноксидазою і, як наслідок, з відкриванням чутливих до дії пероксиду водню та гідроксильного радикала неселективних кальцієвих каналів (Pottosin, Shabala, 2014).

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

Зважаючи на 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 їх причетність до регуляції стану продохів.

Однак феноменологія і механізми її впливу поліамінів на функціонування продохового апарату залишаються маловивченими. Перше спеціальне дослідження впливу екзогенних поліамінів на стан продохів було проведено на прикладі епідермісу *Vicia faba* два десятиліття тому (Liu et al, 2000). Встановлено, що спермін, спермідин, путресцин і кадаверин здатні спричинити закривання продохів, впливаючи на потенціал-залежні калієві канали і пере-

шкоджаючи надходженню калію у замикаючі клітини. Пізніше було показано, що путресцин як субстрат діаміноксидази може бути задіяний в індукованому АБК закриванні продохів (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. На замикаючих клітинах епідермісу арабідопсису з використанням інгібіторного аналізу та молекулярно-генетичних методів показано значення утворення пероксиду водню та синтезу NO у реалізації продохових ефектів поліамінів (Agurla et al, 2018). Проте дотепер повністю відкритим залишається питання участі різних пулів кальцію у реалізації впливу поліамінів на стан продохів. Слабо вивчена і роль у такому процесі продуктів реакцій, які каталізуються фосфоліпазами С і D. Зважаючи на це, метою роботи було дослідження інгібіторним методом можливого значення різних пулів кальцію та компонентів ліпідного сигналіну в реалізації впливу діаміну путресцину і тетрааміну сперміну на стан замикаючих клітин продохів епідермісу листків гороху (*Pisum sativum* L.).

Матеріали і методи. Для досліджень використовували 12–15-денні рослини гороху (*Pisum sativum* L.) сорту Царевич. Рослини вирощували в кюветах з ґрунтом за оптимального поливу, температури 24/18 °С (день/ніч), освітлення 6000 лк і фотоперіоду 15 год.

Апертуру продохів визначали за методикою, описаною Ramirez et al (2009) з модифікаціями (Yastreb et al, 2017). Для досягнення ефекту відкривання продохів 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 (LaCl_3) в концентрації 1 мМ, хелатор позаклітинного кальцію ЕГТА (1 мМ), інгібітор фосфатидилінозитол-специфічної фосфоліпази С (ФІ-ФЛС) неоміцин (1 мМ), інгібітор залежного від фосфоліпази D утворення фосфатидної кислоти 0,1% *n*-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.

У кожному варіанті оцінювали стан не менше 60 продихів на листках, взятих з шести різних рослин. Досліди повторювали незалежно у різні дні 3 рази. На рисунках наведені середні величини та їх стандартні похибки. Крім випадків, відзначених окремо, обговорюються ефекти, вірогідні при $P \leq 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення. Обробка епідермісу листків гороху путресцином і сперміном спричинювала зменшення розміру аперттури продихів (рис. 1, 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 аперттури 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. 1, а). 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

аперттури порівняно з величинами, які реєструвалися через 60 хв.

Вплив сперміну на стан продихів проявлявся динамічніше. Вірогідне зменшення аперттури спостерігалася через 60 хв за дії всіх досліджуваних концентрацій (рис. 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 аперттури у варіанті з 1 мМ сперміном. За дії двох інших його концентрацій істотних змін стану продихів у цей час не спостерігали.

Загалом динаміка впливу путресцину і сперміну на стан продихів в наших експериментах виявилася 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 аперттури продихів спостерігався через 150 хв від початку обробки епідермісу путресцином і сперміном в концентрації 1 мМ (рис. 1, 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.

Інкубація епідермісу листків у розчині неспецифічного блокатора кальцієвих каналів хлориду лантану не викликала змін аперттури продихів (рис. 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 С 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. 3). Обробка ЕГТА спричиняла тенденцію до змен-

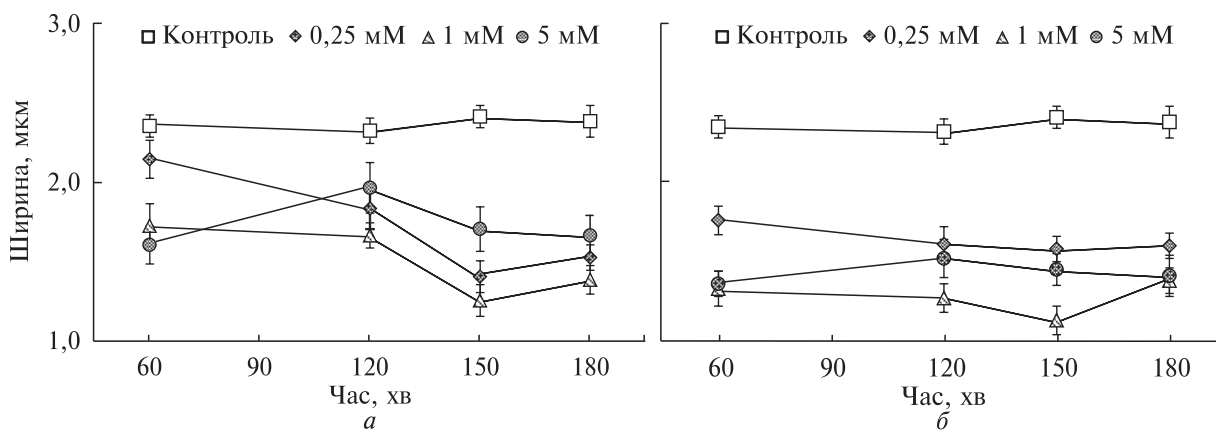


Рис. 1. Часова динаміка і концентраційна залежність впливу путресцину (а) і сперміну (б) на величину апертури продохів

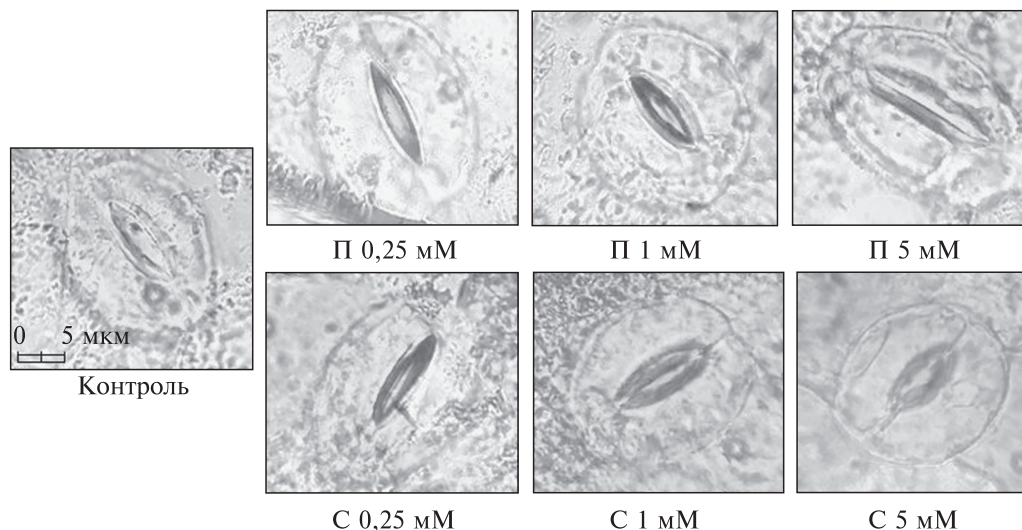


Рис. 2. Типовий стан продохів через 150 хв впливу путресцину (П) і сперміну (С) в різних концентраціях

шення прояву впливу путресцину на стан продохів і слабо впливала на відповідний ефект сперміну. Водночас неоміцин майже повністю нівелював закривання продохів, спричинюване обома поліамінами (рис. 3).

Інгібітор залежного від фосфоліпази D утворення фосфатидної кислоти *n*-бутанол сам по собі спричиняв тенденцію до збільшення апертури продохів (ефект вірогідний за $P \leq 0,1$). При цьому його неактивний ізомер бутанол-2 на стан продохів не впливав (рис. 4).

За обробки *n*-бутанолом вплив путресцину і сперміну на величину продохової щілини не виявлявся. Більше того, її розміри у варіантах

з комбінованою дією *n*-бутанолу та поліамінів були навіть більшими від контролю (рис. 4). Натомість у присутності бутанолу-2 ефекти закривання продохів, спричинювані путресцином і сперміном, проявлялися повною мірою.

Отже, отримані результати свідчать про залучення іонів кальцію і компонентів ліпідного сигналіну в реалізацію впливу поліамінів на стан продохів епідермісу листків гороху. Як уже відзначалося, даних стосовно ролі кальцію у прояві впливу поліамінів на стан продохів дуже мало. У роботі An і співавт. (2008) з використанням флуоресцентного барвника fluo-3 AM зафіксоване транзиторне зростання вмісту

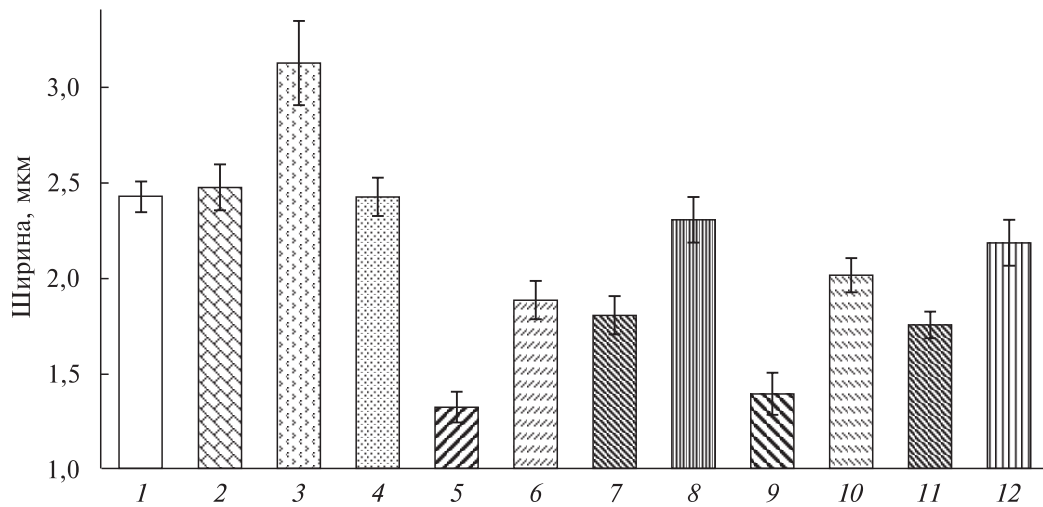


Рис. 3. Вплив антагоністів кальцію на прояв продихових ефектів поліамінів. 1 – контроль; 2 – LaCl_3 (1 мМ); 3 – ЕГТА (1 мМ); 4 – неоміцин (1 мМ); 5 – путресцин (1 мМ); 6 – путресцин (1 мМ) + LaCl_3 (1 мМ); 7 – путресцин (1 мМ) + ЕГТА (1 мМ); 8 – путресцин (1 мМ) + неоміцин (1 мМ); 9 – спермін (1 мМ);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

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. 3), що вказує на роль надходження кальцію в цитозоль у реалізації продихових ефектів як діаміну путресцину, так і тетрааміну сперміну. Водночас хелатор зовнішньоклітинного кальцію ЕГТА спричиняв лише тенденцію до зменшення прояву впливу путресцину на стан продихів і майже не впливав на ефекти сперміну (рис. 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 PI-PL C синтез інозитол-1,4,5-фосфату (IP_3), і може там самим перешкоджати відкриванню внутрішньоклітинних кальцієвих каналів, чутливих до IP_3 , практично повністю усував прояви впливу обох поліамінів на стан продихів (рис. 3). Зауважимо, що у роботі Echevarria-Ma-

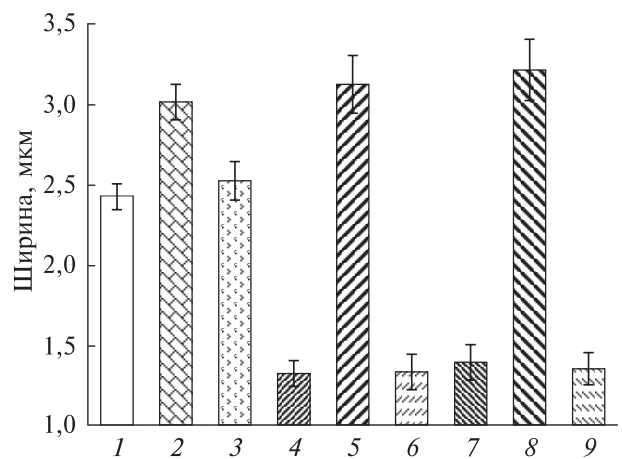


Рис. 4. Вплив н-бутанолу і бутанолу-2 на прояв продихових ефектів поліамінів. 1 – контроль; 2 – н-бутанол (0,1 %); 3 – бутанол-2 (0,1 %); 4 – путресцин (1 мМ); 5 – путресцин (1 мМ) + н-бутанол (0,1 %); 6 – путресцин (1 мМ) + бутанол-2 (0,1 %); 7 – спермін (1 мМ); 8 – спермін (1 мМ) + н-бутанол (0,1 %);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

chado і співавт. (2002) показано, що спермін здатний підвищувати активність PI-PL C і вміст IP_3 у коренях рослин *Catharanthus roseus*.

Однак питання про наявність мішеней IP_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 $ІФ_3$. 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 елісатора кріптогеїну (Lescouëgue et al, 2002). Нівелювання неоміцином закривання продохів, індукованого АБК, також пов'язують з порушенням надходження кальцію в цитозоль, залежного від вмісту $ІФ_3$ і активності ФІ-ФЛ С (Iakovenko et al, 2008a). Але не виключено, що зміна кількості $ІФ_3$ не єдиний шлях впливу неоміцину як інгібітору фосфоліпази С на сигнальні процеси, що можуть бути задіяні у регуляції стану продохів. Так, інший посередник, який утворюється за участю активності ФІ-ФЛ С – 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 (Parra et al, 1997). Отже, інгібування ФІ-ФЛ С може призводити до зменшення синтезу фосфатидної кислоти.

Є відомості, що фосфатидна кислота здатна безпосередньо викликати ефект закривання продохів, 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 інтермедиату, необхідного для реалізації впливу АБК і саліцилової кислоти на стан продохів, 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 продохів узгоджується з виявленим нами феноменом повного усунення спричинюваного поліамінами закривання продохів за дії н-бутанолу – інгібітору залежного від фосфоліпази D утворення фосфатидної кислоти (рис. 4).

На приростках 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 поліетиленгліколю. На рослинах арабідопсису показано, що путресцин викликав закривання продохів 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 продохів. Проте не можна виключити і вплив фосфатидної кислоти на кальцієвий гомеостаз. На модельних системах – везикулах плазмалеми 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 продоховими ефектами у літературі відсутні, проте недавно встановлено, що він може індукувати утворення фосфатидної кислоти в коренях арабідопсису (Zarza et al, 2019).

Таким чином, отримані нами результати вказують на ймовірне залучення компонентів ліпідного сигналіну – фосфатидної кислоти та $ІФ_3$ – у реалізацію впливу поліамінів на стан продохів. Також дані інгібіторного аналізу можуть свідчити про роль надходження кальцію в цитозоль у процесі закривання продохів, 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 продохові ефекти поліамінів. Роль функціональних зв'язків між сигнальними інтермедиатами, що утворюються за участю фосфоліпаз С і D, та кальцієвим гомеостазом за дії поліамінів на продоховий апарат потребує спеціальних досліджень із залученням методів безпосереднього визначення вмісту іонів Ca^{2+} та інших посередників у зами-

каючих клітинах. Також необхідно відзначити, що поліаміни поки що не вважаються «самостійними» регуляторами продихового апарату, але розглядаються як посередники у реалізації впливу АБК на стан продихів (An et al, 2012). Іони кальцію, АФК, а також продукти перетворень фосфоліпідів, які здатні впливати на їх гомеостаз, розглядаються як ключові компоненти в продихових реакціях, спричинюваних чинниками різної природи (Kalachova et al, 2013; Raghavendra, Murata, 2017). Зважаючи на це, зв'язок поліамінів з АФК і ліпідним сигналігом, а також їх ймовірний вплив на кальцієвий гомеостаз дає підстави говорити про можливість залучення цих сполук в регуляцію стану продихів.

Відповідність етичним стандартам. Ця стаття не містить будь-яких досліджень з використанням людей і тварин як об'єктів.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Це дослідження не отримувало будь-якого конкретного гранту від фінансуючих установ у державному, комерційному або некомерційному секторах.

REALIZATION OF POLYAMINES' EFFECT ON STATE OF PEA STOMATA WITH INVOLVEMENT OF CALCIUM AND COMPONENTS OF LIPID SIGNALING

A.I. Kokorev, Yu.E. Kolupaev, T.O. Yastreba, E.I. Horielova, A.P. Dmitriev

Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University, p/o Dokuchaevske-2, Kharkiv, 62483 Ukraine
Karazin Kharkiv National University, 4, Svobody sq., Kharkiv, 61022, Ukraine

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of NAS of Ukraine, 148, Akademika Zabolotnoho Str., Kyiv, 03143, Ukraine

E-mail: plant_biology@ukr.net, dmitriev.ap@gmail.com

Polyamines are stress plant metabolites with a wide range of physiological effects. Their effect on the functioning of the respiratory system of plants remains poorly understood. The aim of the study was to use the inhibitory analysis to investigate possible participation of different pools of calcium and lipid signaling components in the implementation of the effect of putrescine and spermine on the aperture value of the stomata of pea leaves (*Pisum sativum* L.). It was shown that the epidermis incubation in the presence of both polyamines

within the concentration range of 0.25–5 mM caused a decrease in the stomatal aperture. This effect was observed within 1 h after the start of incubation and was most pronounced after 2.5 h exposure in a medium containing 1 mM putrescine or spermine. In the presence of the calcium channel blocker LaCl₃, the effect of polyamines on the state of stomata was weak, partially neutralized by the extracellular calcium chelator EGTA, however, they were completely eliminated by the phospholipase C inhibitor neomycin. The effect of putrescine and spermine on stomatal aperture was not detected in the presence of n-butanol, an inhibitor of phospholipase D-dependent phosphatidic acid formation, but not with its inactive isomer butanol-2. The obtained results point to the possible role of calcium entry into cytosol from intracellular compartments, and the importance of signaling intermediates formed with the participation of phospholipases C and D in the implementation of the stomatal effects of polyamines.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Agurla S, Gayatri G, Raghavendra AS (2017) Signal transduction components in guard cells during stomatal closure by plant hormones and microbial elicitors. Mechanism of Plant Hormone Signaling under Stress (Ed. Pandey G., vol 2, pp. 355–387. doi: org/10.1002/9781118889022.ch30
- Agurla S, Gayatri G, Raghavendra AS (2018) Polyamines increase nitric oxide and reactive oxygen species in guard cells of *Arabidopsis thaliana* during stomatal closure. Protoplasma 255(1):153–162. doi: 10.1007/s00709-017-1139-3
- An Z, Jing W, Liu Y, Zhang W (2008) Hydrogen peroxide generated by copper amine oxidase is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. J Exp Bot 59(4):815–825. doi:10.1093/jxb/erm370
- An ZF, Li CY, Zhang LX, Alva AK (2012) Role of polyamines and phospholipase D in maize (*Zea mays* L.) response to drought stress. South African Journal of Botany 83:145–150. doi: 10.1016/j.sajb.2012.08.009
- Andronis EA, Moschou PN, Toumi I, Roubelakis-Angelakis KA (2014) Roubelakis-angelakis, peroxisomal polyamine oxidase and NADPH-oxidase cross-talk for ROS homeostasis which affects respiration rate in *Arabidopsis thaliana*. Front Plant Sci 5:132. doi: 10.3389/fpls.2014.00132
- Arisz SA, Wijk R, Roels W, Zhu JK, Haring MA, 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
- Bose J, Pottosin II, Shabala SS, Palmgren MG, Shabala

- S (2011) Calcium efflux systems in stress signaling and adaptation in plants. *Front Plant Sci* 2:85. doi: 10.3389/fpls.2011.00085
- Distéfano AM, García-Mata C, Lamattina L, Laxalt M (2008) Nitric oxide-induced phosphatidic acid accumulation: a role for phospholipases C and D in stomatal closure. *Plant Cell Environ* 31:187–194. doi: 10.1111/j.1365-3040.2007.01756.x
- Echevarria-Machado I, Munoz-Sánchez A, Loyola-Vargas VM, Hernandez-Sotomayor SMT (2002) Spermine stimulation of phospholipase C from *Catharanthus roseus* transformed roots. *J Plant Physiol* 159(11):1179–1188. doi: 10.1078/0176-1617-00893
- Echevarria-Machado I, Ku-Gonzalez A, Loyola-Vargas VM, Hernandez-Sotomayor SMT (2004) Interaction of spermine with a signal transduction pathway involving phospholipase C, during the growth of *Catharanthus roseus* transformed roots. *Physiol Plant* 120(1):140–151. doi: 10.1111/j.0031-9317.2004.0212.x
- Honda K., Yamada N., Yoshida R., Ihara H., Sawa T., Akaike T, Iwai S (2015) 8-Mercapto-Cyclic GMP mediates hydrogen sulfide-induced stomatal closure in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 56(8):1481–1489. doi: 10.1093/pcp/pcv069
- Iakovenko OM, Kretynin SV, Kabachevskaya EM, Lyakhnovich GV, Volotovskii DI, Kravets VS (2008a) Role of phospholipase C in ABA regulation of stomata function. *Ukr Bot J* 65(4):605–613
- Iakovenko OM, Kretynin SV, Kravets VS (2008b) Molecular basis of phosphoinositide-specific phospholipase C signaling pathways in plant cells. *Biopolym Cell* 24(6):441–452. doi: 10.7124/bc.0007BC
- Jin ZP, Pei YX (2015) Physiological implications of hydrogen sulfide in plants: Pleasant exploration behind its unpleasant odour. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Hindawi Publishing Corporation. Article ID 397502. doi: 10.1155/2015/397502
- Kalachova T, Iakovenko O, Kretynin S, 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
- Kolupaev YuE, Kokorov AI, Yastreb TO, Horielova EI (2019) Hydrogen peroxide as a signal mediator at inducing heat resistance in wheat seedlings by putrescine. *Ukr Biochem J* 91(6):103–111. doi: 10.15407/ubj91.06.103
- Kravets VS, Kolesnikov YaS, Kretynin SV, Kabachevskaya EM, Liahnovitch GV, Bondarenko OM, Volotovskiy ID, Kukhar VP (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
- Kuznetsov VIV, Shevyakova NI (2011) Polyamines and plant adaptation to saline environment. In: Ramawat KB (ed), *Desert Plants. Biology and Biotechnology*. Springer, Berlin, Heidelberg, p 261–297. doi: 10.1007/978-3-642-02550-1_13
- Kwak JM, Nguyen V, Schroeder JI (2006) The role of reactive oxygen species in hormonal responses. *Plant Physiol* 141(2):323–329. doi: 10.1104/pp.106.079004
- Lecourieux D, Mazars C, Pauly N, Ranjeva R, 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
- 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. doi: 10.1104/pp.124.3.1315
- Liu J, Hou ZH, Liu GH, Hou LX, 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
- Medvedev S, Voronina O, Tankelyun O, Bilova T, Suslov D, Bankin M, Mackievic V, Makavitskaya M, Shishova M, Martinec J, Smolikova G, Sharova E, 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
- Miura K, Okamoto H, Okuma E, Shiba H, Kamada H, Hasegawa PM, 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(1):91–104. doi: 10.1111/tpj.12014
- Munemasa S, Mori IC, Murata Y (2011) Methyl jasmonate signaling and signal crosstalk between methyl jasmonate and abscisic acid in guard cells. *Plant Signal Behav.* 6(7):939–941. doi: 10.4161/psb.6.7.15439
- Neill SJ, Burnett EC (1999) Regulation of gene expression during water deficit stress. *Plant Growth Regul* 29:23–33. doi: 10.1023/A:1006251631570
- Neill S, Bright J, Desikan R, Hancock J, Harrison J, Wilson I (2008) Nitric oxide evolution and perception. *J Exp Bot* 59(1):25–35. doi:10.1093/jxb/erm218
- Pal M, Szalai G, Janda T (2015) Speculation: Polyamines are important in abiotic stress signaling. *Plant Sci* 237:16–23. doi: 10.1016/j.plantsci.2015.05.003
- Pang Q, Zhang T, Zhang A, Lin C, Kong W, Chen S (2020) Proteomics and phosphoproteomics revealed molecular networks of stomatal immune responses. *Planta* 252:66. doi: 10.1007/s00425-020-03474-3

- Pappan K., Zheng S, 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
- Pottosin I, Shabala S (2014) Polyamines control of cation transport across plant membranes: implications for ion homeostasis and abiotic stress signaling. *Front Plant Sci* 5:154. doi: 10.3389/fpls.2014.00154
- Qu Y, An Z, Zhuang B, Jing W, Zhang Q, 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.
- Raghavendra A, Murata Y (2017) Editorial: Signal transduction in stomatal guard cells. *Front Plant Sci* 8:114. doi: 10.3389/fpls.2017.00114
- Ramirez V, Coego A, Lypez A, Agorio A, Flors V, Vera P (2009) Drought tolerance in *Arabidopsis* is controlled by the OCP3 disease resistance regulator. *Plant J* 58(4):578–591. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.03804.x
- Scuffi D, Nietzel T, Di Fino LM., Meyer AJ., Lamattina L, Schwarzländer M, Laxalt AM, García-Mata C (2018) Hydrogen sulfide increases production of NADPH oxidase-dependent hydrogen peroxide and phospholipase D-derived phosphatidic acid in guard cell signaling. *Plant Physiol* 176:2532–2542. doi: 10.1104/pp.17.01636
- She XP, Song XG (2008) Carbon monoxide-induced stomatal closure involves generation of hydrogen peroxide in *Vicia faba* guard cells. *J Integr Plant Biol* 50(12):1539–1548. doi: 10.1111/j.1744-7909.2008.00716.x
- Suhita D, Raghavendra AS, Kwak JM, Vavasseur A (2004) Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate- and abscisic acid-induced stomatal closure. *Plant Physiol* 134(4):1536–1545. doi: 10.1104/pp.103.032250
- Uraji M, Katagiri T, Okuma E, Ye W, Hossain MA, Masuda C, Miura A, Nakamura Y, Mori IC, Shinzaki K, 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
- Wimalasekera R, Villar C, Begum T, Scherer GF (2011) COPPER AMINE OXIDASE1 (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. doi: 10.1093/mp/ssr023
- 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
- Yastrebov TO, Kolupaev YuE, Lugovaya AA, Dmitriev AP (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. doi: 10.3103/S0095452717050115
- Yastrebov TO, Kolupaev YuE, Kokorev AI, Horielova EI, Dmitriev AP (2018) Methyl jasmonate and nitric oxide in regulation of the stomatal apparatus of *Arabidopsis thaliana*. *Cytol Genet* 52(6):400–405. doi:org/10.3103/S0095452718060129
- Yastrebov TO, Kolupaev YuE, Havva EN, Shkliarevskiy MA, Dmitriev AP (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. https://doi.org/10.3103/S0095452719020099
- Zarza X, Shabala L, Fujita M, Shabala S, Haring MA, Tiburcio AF, 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

Надійшла в редакцію 20.08.20
Після доопрацювання 23.09.20
Прийнята до друку 18.03.21