

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 продишного 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 С 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

грунтом за оптимальних умов. Для досягнення ефекту відкриття 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 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 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 рістінгібуючий 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 проростків 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. І.**, 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. Е., **Кокорев, О. И.** (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., Колупаєв, 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. И.**, Швиденко, М. В., Колупаєв, Ю. Е. (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.