

РОЛЬ ИОНОВ Ca В ИНДУЦИРОВАНИИ ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТИ КОЛЕОПТИЛЕЙ ПШЕНИЦЫ БРАССИНОСТЕРОИДАМИ

Ю. Е. КОЛУПАЕВ¹, А. А. ВАЙНЕР¹, Т. О. ЯСТРЕБ¹,
А. И. ОБОЗНЫЙ¹, В. А. ХРИПАЧ²

¹Харьковский национальный аграрный университет им. В. В. Докучаева, Украина;
e-mail: plant_biology@mail.ru;

²Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси;
e-mail: khrpach@iboch.bas-net.by

С использованием хелатора ионов кальция ЭГТА и ингибитора фосфатидилинозитолспецифичной фосфолипазы C – неомицина – исследовали участие Ca^{2+} в трансдукции сигналов экзогенных brassinosterоидов (БС) (24-эпибрасинолида – 24-ЭБЛ и 24-эпикастастерона – 24-ЭКС), вызывающих повышение теплоустойчивости клеток coleoptилей пшеницы (*Triticum aestivum* L.). 24-часовая обработка отрезков coleoptилей 24-ЭБЛ и 24-ЭКС в концентрации 10 нМ вызывала транзиторное усиление генерации супероксидного анион-радикала клеточной поверхностью и последующее повышение активности супероксиддисмутазы и каталазы. Предварительная обработка coleoptилей ЭГТА и неомицином в значительной степени угнетала эти эффекты и нивелировала, вызываемое БС повышение теплоустойчивости coleoptилей пшеницы. Обсуждаются возможные механизмы вовлечения кальциевого сигналинга в образование активных форм кислорода в растительных клетках и индуцирование теплоустойчивости растительных клеток при действии экзогенных БС.

Ключевые слова: brassinosterоиды, активные формы кислорода, кальций, антиоксидантные энзимы, *Triticum aestivum* L.

В последние полтора десятилетия интенсивно исследуются физиологические функции brassinosterоидов (БС) – отдельного класса растительных гормонов [1, 2]. Показана их роль в адаптации растений к действию неблагоприятных факторов различной природы, в т. ч. стрессовых температур. При обработке БС зарегистрировано как повышение выживания растений после потенциально летального действия гипертермии [3–6], так и сохранение способности к росту при сублетальных высокотемпературных воздействиях [7, 8].

В то же время роль сигнальных посредников, задействованных в реализации стресс-протекторных эффектов БС, остается недостаточно изученной. Установлено участие оксида азота, активных форм кислорода (АФК) и MAP-киназного (mitogen-activated protein kinase) каскада в индуцировании БС реакций, необходимых для развития устойчивости растений огурца к холоду и параквату [9, 10]. В экспериментах с использованием coleoptилей пшеницы выявля-

но, что экзогенные БС индуцировали транзиторное усиление генерации АФК и последующее развитие теплоустойчивости [11]. При этом протекторное действие БС угнеталось антиоксидантом ионолом и ингибитором NADPH-оксидазы – имидазолом. На участие NADPH-оксидазы в трансдукции сигналов экзогенных БС указывается и в исследованиях, выполненных на другом объекте – проростках огурца [9].

Известно, что ионы кальция играют особую роль в регуляции активности NADPH-оксидазы [12]. Показано усиление поступления Ca^{2+} в цитозоль растительных клеток через кальциевые каналы плазмалеммы под влиянием БС [13]. В то же время участие кальция в стресс-протекторных эффектах БС остается практически не исследованным.

Целью работы явилось выяснение роли ионов кальция в индуцируемом БС усилении генерации АФК coleoptилями пшеницы и развитии их теплоустойчивости.

Материалы и методы

Исследования проводили с использованием отрезков колеоптилей пшеницы (*Triticum aestivum* L.), которые, как было показано ранее [11], являются чувствительной моделью для изучения эффектов БС. Кроме того, на колеоптилях пшеницы удобно исследовать эффекты генерации АФК клеточной поверхностью без разрушения растительных тканей [14, 15].

Отрезки колеоптилей пшеницы сорта Элегия отделяли от 4-суточных этиолированных проростков, выращенных при температуре 20 °С. Колеоптилю инкубировали на простерилизованном 2%-ом растворе сахарозы с добавлением пенициллина (Na-соль, 100 000 ед.) (контроль). БС – 24-эпибрасинолид (24-ЭБЛ) и 24-эпикастастерон (24-ЭКС), синтезированные в лаборатории химии стероидов Института биорганической химии НАН Беларуси, предварительно растворяли в небольшом объеме этанола и вносили в среду инкубации колеоптилей соответствующих вариантов (конечная концентрация 10 нМ). Эффективные концентрации БС, максимально повышающие теплоустойчивость колеоптилей пшеницы, были установлены нами ранее [11]. В вариантах без БС в инкубационную среду добавляли эквивалентное количество этанола.

На растворах БС колеоптилю инкубировали в течение 24 ч. В случае предобработки ЭГТА и неомидином эти соединения в концентрациях 50 и 40 мкМ соответственно вносили в среду инкубации колеоптилей за 3 ч до добавления в нее БС, по истечении этого времени в среду добавляли БС и продолжали инкубацию колеоптилей в течение 24 ч. В отдельных вариантах оценивали влияние неомидина на исследуемые показатели при его внесении в среду инкубации колеоптилей через 3 ч после начала обработки БС (постобработка). В этом случае по истечении 21 ч инкубации колеоптилей на растворах, содержащих БС в смеси с неомидином, их переносили еще на 6 ч в среду инкубации с одним неомидином. Таким образом, время воздействия БС на колеоптилю во всех вариантах опыта составляло 24 ч, а неомидина – 27 ч. Концентрации ЭГТА и неомидина были выбраны на основании предварительных опытов.

После инкубации колеоптилей на растворах исследуемых соединений часть отрезков каждого варианта подвергали потенциально

летальному прогреву в водяном ультратермостате в стерильной дистиллированной воде при температуре $43 \pm 0,1$ °С в течение 10 мин. Затем отрезки помещали в чашки Петри с простерилизованным 2%-ым раствором сахарозы с добавлением пенициллина. Через двое суток после прогрева оценивали их повреждения по потере тургора и появлению специфического оттенка, обусловленного инфильтрацией тканей.

Генерацию супероксидных анион-радикалов интактными колеоптилями определяли по восстановлению нитросинего тетразолия (НСТ) по методике, подробно описанной ранее [16]. Для проверки специфичности генерации $O_2^{\cdot-}$ в специальных опытах в пробы добавляли супероксиддисмутазу (СОД) (50 ед./мл), которая ингибировала генерацию супероксидного анион-радикала не менее чем на 90%. При этом полагали, что количество восстановленного НСТ определяется генерацией $O_2^{\cdot-}$. Супероксидпродуцирующую активность оценивали как изменение светопоглощения реакционной смеси при 530 нм за 1 ч инкубации в расчете на один отрезок колеоптиля.

Для определения активности СОД (1.15.1.1) и каталазы (1.11.1.6) навеску растительного материала гомогенизировали при температуре 2–4 °С в 0,15 М K_2Na -фосфатном буфере (рН 7,6) с добавлением ЭДТА (0,1 мМ), дитиотреитола (1 мМ) и детергента Тритона X-100 (конечная концентрация 0,1%) [17]. Для анализа использовали супернатант после центрифугирования гомогената при 8000 g в течение 10 мин при 4 °С. Активность СОД определяли, используя метод, основанный на способности энзима конкурировать с НСТ за супероксидные анионы, образующиеся вследствие аэробного взаимодействия NADH и феназинметасульфата. Активность каталазы определяли при рН реакционной смеси 7,2 по количеству разложившегося пероксида водорода за единицу времени.

Содержание протеина устанавливали методом Бредфорда, используя в качестве стандарта БСА [18].

Эксперименты воспроизводили независимо три раза при трехкратной повторности в пределах каждого отдельного опыта. На рисунках приведены средние значения и их стандартные ошибки. Достоверность различий между вариантами оценивали по *t*-критерию Стьюдента. Обсуждаются эффекты, достоверные при $P \leq 0,05$.

В опытах использовали неомидин и нитро-синий тетразолий производства Sigma (США), NADH – Oriental yeast (Япония), ЭГТА и Тритон X-100 – AppliChem GmbH (Германия), остальные реактивы – квалификации хч или чда отечественного производства.

Результаты и обсуждение

Как было установлено ранее, обработка колеоптилей пшеницы БС вызывала транзитное усиление генерации супероксидного анион-радикала, максимальный эффект наблюдался через 2–5 ч после начала воздействия БС [11]. В связи с этим в настоящей работе генерацию $O_2^{\cdot-}$ регистрировали через 2 и 5 ч после начала обработки колеоптилей БС либо через 5 и 8 ч после начала воздействия ЭГТА или неомидина.

Хелатор «внешнего» кальция ЭГТА сам по себе достоверно не влиял на образование $O_2^{\cdot-}$ колеоптилями пшеницы (рис. 1). В то же время он в значительной степени уменьшал эффект усиления генерации супероксидного анион-радикала, вызываемый 24-ЭБЛ и 24-ЭКС.

В качестве другого антагониста кальция мы использовали неомидин, который, связывая фосфатидилинозитолбифосфаты, может ингибировать фосфатидилинозитолспецифичную фосфолипазу С (ФИ-ФЛ С) [19] и тем самым препятствовать накоплению продукта реакции – инозитол-1,4,5-фосфата (IP_3), который влияет на поступление кальция в цитозоль из внутриклеточных компартментов и активирует многие кальцийзависимые процессы [20]. В наших экспериментах неомидин не оказывал существенного влияния на генерацию супероксидного анион-радикала колеоптилями пшеницы (рис. 1). В то же время предобработка колеоптилей этим соединением снимала усиление образования $O_2^{\cdot-}$, вызываемое двумя исследуемыми БС.

Однозначно интерпретировать наблюдаемый нами эффект нивелирования неомидином, вызываемого 24-ЭБЛ и 24-ЭКС усиления генерации АФК клетками колеоптилей, сложно. Феноменологическое сходство эффектов неомидина с действием ЭГТА косвенно указывает на возможность его влияния на кальциевый гомеостаз. Как известно, в клетках животных ФИ-ФЛ С, катализируя процесс образования IP_3 и диацилглицерола (DAG), стимулирует поступление кальция в цитозоль. Это связано с открыванием под влиянием IP_3 внутриклеточных кальциевых каналов,

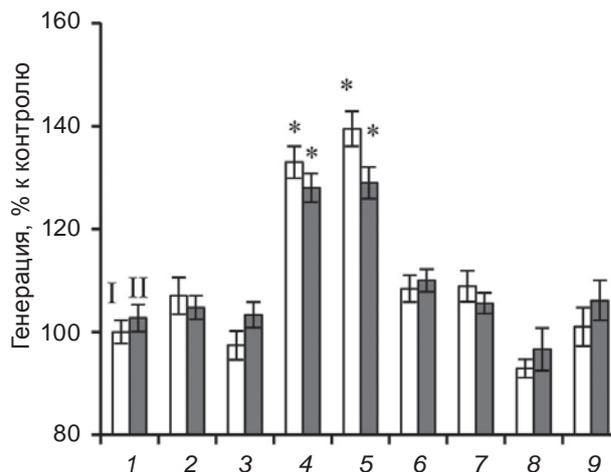


Рис. 1. Генерация супероксидных анион-радикалов колеоптилями пшеницы (% к контролю в начале эксперимента). I, II – соответственно через 2 или 5 ч после начала инкубации на растворах БС или через 5 и 8 ч на растворе неомидина. 1 – контроль; 2 – ЭГТА (50 мкМ); 3 – неомидин (40 мкМ); 4 – 24-эпибрассинолид (10 нМ); 5 – 24-эпикастастерон (10 нМ); 6 – 24-эпибрассинолид (10 нМ) + ЭГТА (50 мкМ); 7 – эпикастастерон (10 нМ) + ЭГТА (50 мкМ); 8 – 24-эпибрассинолид (10 нМ) + неомидин (40 мкМ, предобработка); 9 – 24-эпикастастерон (10 нМ) + неомидин (40 мкМ, предобработка). Подробно условия обработки колеоптилей исследуемыми соединениями см. в разделе «Материалы и методы». * $P \leq 0,05$

а также с активацией DAG протекиназы С, участвующей в регуляции потенциалзависимых кальциевых каналов плазмалеммы. Несмотря на то, что в растениях до сих пор не обнаружены гомологи мишеней IP_3 , известно, что неомидин может уменьшать поступление кальция в цитозоль растительных клеток. Например, это соединение снимало эффект повышения концентрации кальция в клетках табака, вызываемый действием элиситора криптогеина [21]. Следует отметить, что другой посредник, образующийся с участием ФИ-ФЛ С – DAG в растительных клетках в настоящее время рассматривается как предшественник фосфатидной кислоты [22], которая наряду с кальцием может связываться с NADPH-оксидазой и тем самым участвовать в усилении генерации АФК [23]. Кроме того, фосфатидилинозитолбифосфат, который связывается неомидином, является кофактором фосфолипазы D. Известно, что неомидин может влиять

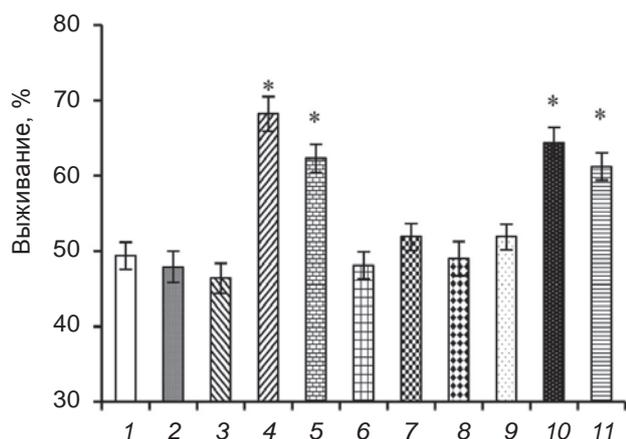


Рис. 2. Выживание coleoptилей пшеницы (%) после повреждающего прогрева. Тут и на рис. 3: 1 – контроль; 2 – ЭГТА (50 мкМ); 3 – неомицин (40 мкМ); 4 – 24-эпибрассинолид (10 нМ); 5 – 24-эпикастастерон (10 нМ); 6 – 24-эпибрассинолид (10 нМ) + ЭГТА (50 мкМ); 7 – эпикастастерон (10 нМ) + ЭГТА (50 мкМ); 8 – 24-эпибрассинолид (10 нМ) + неомицин (40 мкМ, предобработка); 9 – 24-эпикастастерон (10 нМ) + неомицин (40 мкМ, предобработка); 10 – 24-эпибрассинолид (10 нМ) + неомицин (40 мкМ, постобработка); 11 – 24-эпикастастерон (10 нМ) + неомицин (40 мкМ, постобработка). Подробно условия обработки coleoptилей исследуемыми соединениями см. в разделе «Материалы и методы». * $P \leq 0,05$

и на образование фосфатидной кислоты, зависящее от фосфолипазы D [24].

Обработка coleoptилей обоими БС вызывала повышение их выживания после повреждающего прогрева (рис. 2). При этом эффект 24-ЭБЛ

был несколько выше по сравнению с эффектом 24-ЭКС, хотя эти различия не были достоверны при $P \leq 0,05$. Под влиянием ЭГТА и неомицина теплоустойчивость coleoptилей пшеницы достоверно не изменялась. Однако предварительная обработка coleoptилей как ЭГТА, так и неомицином практически полностью нивелировала положительное влияние БС на их теплоустойчивость (рис. 2).

Одной из защитных систем клеток, индуцируемых БС, является антиоксидантная [25, 26]. В наших экспериментах отмечалось повышение активности СОД и каталазы под влиянием 24-ЭБЛ и 24-ЭКС (рис. 3). Обработка ЭГТА сама по себе не сказывалась на активности СОД и каталазы. Под влиянием неомицина происходило незначительное увеличение активности СОД, а активность каталазы не изменялась. В то же время предобработка coleoptилей ЭГТА снимала повышение активности СОД и каталазы, вызываемое БС. Под влиянием неомицина отмечалось частичное нивелирование повышения активности СОД и каталазы, вызываемого БС.

Для того чтобы выяснить, насколько специфичны эффекты неомицина на передачу сигнала БС, индуцирующего антиоксидантные энзимы и развитие теплоустойчивости coleoptилей, мы также исследовали влияние ингибитора ФИ-ФЛ С на эти показатели при его введении в среду инкубации coleoptилей через 3 ч после начала их обработки БС. В этом случае неомицин почти не влиял на вызываемый БС эффект индуцирования теплоустойчивости coleoptилей пшеницы (рис. 2) и повышения в них активности СОД и каталазы (рис. 3). Эти данные позволяют говорить о действии неомицина преимуще-

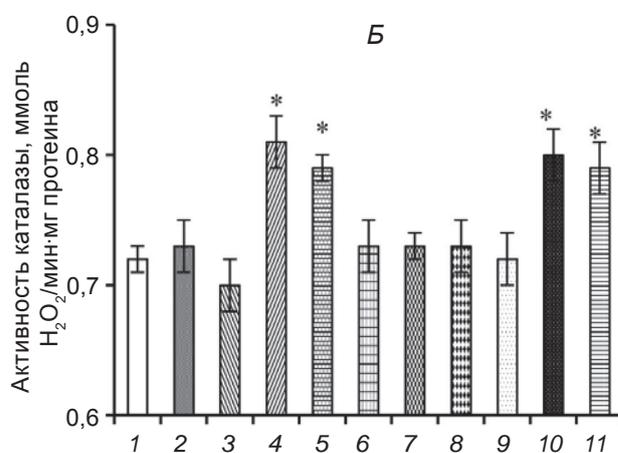
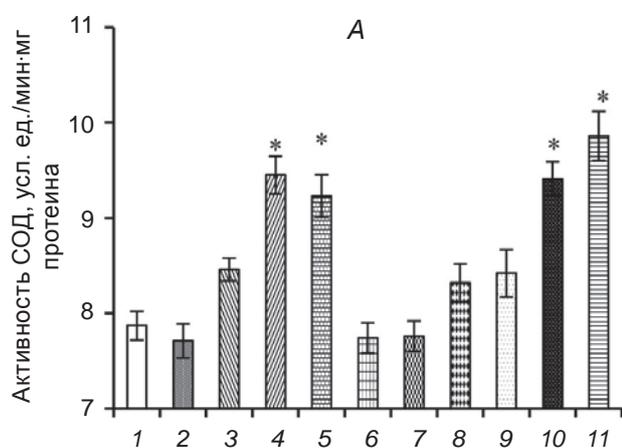


Рис. 3. Активность СОД (усл. ед./мин·мг протеина) (А) и каталазы (ммоль H_2O_2 /мин·мг протеина) (Б)

ственно на трансдукцию сигнала БС. Побочные его эффекты на активность антиоксидантных энзимов и теплоустойчивость колеоптилей в условиях наших экспериментов, по-видимому, не столь значительны.

Таким образом, сходные эффекты ЭГТА и неомидина на проявление влияния БС на генерацию АФК колеоптилями пшеницы, их теплоустойчивость и активность антиоксидантных энзимов указывают на вовлечение кальция в трансдукцию сигналов БС. При этом данные об угнетении эффектов БС неомидином однозначно интерпретировать не представляется возможным. Оно может быть связано как с влиянием неомидина на кальциевый гомеостаз, так и на содержание фосфатидной кислоты. Как уже отмечалось, последняя, наряду с кальцием, может активировать NADPH-оксидазу [23] и тем самым влиять на формирование АФК-сигнала.

Следует отметить, что в последние годы получены сведения о способности БС активировать фосфатидилхолинспецифичные фосфолипазы С [27], что также вызывает повышение содержания DAG, который может превращаться в фосфатидную кислоту [22]. Как ионы кальция, так и фосфатидная кислота, задействованы в активации NADPH-оксидазы и формировании АФК-сигналов [23]. Таким образом, в реализации эффектов БС, по-видимому, участвуют ионы кальция, АФК и ряд компонентов липидного сигналинга, находящихся в сложном функциональном взаимодействии. Вполне естественно, что для выяснения вклада этих посредников и процессов их взаимодействия в формирование индуцируемых БС конкретных адаптивных реакций растений необходимы специальные исследования.

РОЛЬ ИОНІВ Ca В ІНДУКУВАННІ ТЕПЛОСТІЙКОСТІ КОЛЕОПТИЛІВ ПШЕНИЦІ БРАСИНОСТЕРОЇДАМИ

Ю. Є. Колупаєв¹, А. О. Вайнер¹,
Т. О. Ястреб¹, О. І. Обозний¹, В. О. Хрипач²

¹Харківський національний аграрний
університет ім. В. В. Докучаєва, Україна;
e-mail: plant_biology@mail.ru;

²Інститут біоорганічної хімії НАН Білорусі;
e-mail: khripach@iboch.bas-net.by

Із використанням хелатору іонів кальцію ЕГТА та інгібітора фосфатидилінозитолспецифічної фосфоліпази С – неоміцину – досліджували участь Ca^{2+} в трансдукції сигналів екзогенних брасиностероїдів (БС) (24-епібрасиноліду – 24-ЕБЛ і 24-епікастастерону – 24-ЕКС), що спричинюють підвищення теплостійкості клітин колеоптилів пшениці (*Triticum aestivum* L.). 24-годинна обробка відрізків колеоптилів 24-ЕБЛ і 24-ЕКС в концентрації 10 нМ спричинювала транзиторне посилення генерації супероксидного аніонрадикала клітинною поверхнею та подальше підвищення активності супероксиддисмутази і каталази. Попередня обробка колеоптилів ЕГТА і неоміцином значною мірою пригнічувала ці ефекти та нівелювала спричинюване БС підвищення теплостійкості колеоптилів пшениці. Обговорюються можливі механізми залучення кальцієвого сигналіngu в утворення активних форм кисню в рослинних клітинах й індукування теплостійкості рослинних клітин за дії екзогенних БС.

Ключові слова: брасиностероїди, кальцій, активні форми кисню, антиоксидантні ензими, *Triticum aestivum* L.

ROLE OF Ca IONS IN THE INDUCTION OF HEAT-RESISTANCE OF WHEAT COLEOPTILES BY BRASSINOSTEROIDS

Yu. E. Kolupaev¹, A. A. Vayner¹, T. O. Yastreb¹, A. I. Oboznyi¹, V. A. Khripach²

¹V. V. Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University, Ukraine; e-mail: plant_biology@mail.ru;

²Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus; e-mail: khripach@iboch.bas-net.by

The involvement of Ca²⁺ into the signal transduction of exogenous brassinosteroids (BS) (24-epibrassinolide – 24-EBL and 24-epicastasterone – 24-ECS) causing the increase of heat resistance of the cells of wheat (*Triticum aestivum* L.) coleoptiles was investigated using calcium chelator EGTA and inhibitor of phosphatidylinositol-specific phospholipase C – neomycin. Twenty-four-hour treatment of coleoptile segments with 10 nM solutions of 24-EBL and 24-ECS led to a transient increase in the generation of superoxide anion radical by cell surface and the subsequent activation of superoxide dismutase and catalase. Pretreatment of coleoptiles with EGTA and neomycin depressed to a considerable extent these effects and leveled the increase in heat resistance of wheat coleoptiles that were caused by BS. Possible mechanisms of involvement of calcium signaling into the formation of reactive oxygen species in plant cells and induction of heat resistance of plant cells by the action of exogenous BS have been discussed.

Key words: brassinosteroids, phospholipase C, reactive oxygen species, calcium, antioxidant enzymes, *Triticum aestivum* L.

References

1. Khripach V., Zhabinskii V., De Groot A. Twenty years of brassinosteroids: Steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century. *Ann. Bot.* 2000;86:441-447.
2. Bajguz A., Hayat S. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiol. Biochem.* 2009;47:1-8.
3. Dhaubhadel S., Chaudhary S., Dobinson K. F., Krishna P. Treatment with 24-epibrassinolide, a brassinosteroid, increases the basic thermotolerance of *Brassica napus* and tomato seedlings. *Plant Mol. Biol.* 1999;40:333-342.
4. Singh I., Shono M. Physiological and molecular effects of 24-epibrassinolide, a brassinosteroid on thermotolerance of tomato. *Plant Growth Regul.* 2005;47:111-119.
5. Divi U. K., Rahman T., Krishna P. Brassinosteroid-mediated stress tolerance in Arabidopsis shows interactions with abscisic acid, ethylene and salicylic acid pathways. *BMC Plant Biology.* 2010;10:151-164.
6. Mazorra L. M., Holton N., Bishop G. J., Núñez M. Heat shock response in tomato brassinosteroid mutants indicates that thermotolerance is independent of brassinosteroid homeostasis. *Plant Physiol. Biochem.* 2011;49:1420-1428.
7. Ogwen J. O., Song X. S., Shi K., Hu W. H., Mao W. H., Zhou Y. H. Yu J. Q., Nogues S. Brassinosteroids alleviate heat-induced inhibition of photosynthesis by increasing carboxylation efficiency and enhancing antioxidant systems in *Lycopersicon esculentum*. *J. Plant Growth Regul.* 2008;27:49-57.
8. Hayat S., Hasan S.A., Yusuf M., Hayat Q., Ahmad A. Effect of 28-homobrassinolide on photosynthesis, fluorescence and antioxidant system in the presence or absence of salinity and temperature in *Vigna radiata*. *Environ. Exp. Bot.* 2010;69:105-112.
9. Xia X. J., Wang Y. J., Zhou Y. H., Tao Y., Mao W. H., Shi K., Asami T., Chen Z., Yu J. Q. Reactive oxygen species are involved in brassinosteroid-induced stress tolerance in cucumber. *Plant Physiol.* 2009;150:801-814.
10. Cui J. X., Zhou Y. H., Ding J. G., Xia X. J., Shi K., Chen S. C., Asami T., Chen Z., Yu J. Q. Role of nitric oxide in hydrogen peroxide-dependent induction of abiotic stress tolerance by brassinosteroids in cucumber pce. *Plant Cell Environ.* 2011;34:347-58.
11. Vayner A. A., Kolupaev Yu. E., Yastreb T. O., Khripach V. A. The participation of reactive oxygen species in the induction of thermotolerance of wheat coleoptiles caused by exogenous brassinosteroids. *Bull. Kharkiv Nat. Agr. Univ. Ser. Biol.* 2013;(Is. 3(30)):39-45. (In Russian).
12. Ogasawara Y., Kaya H., Hiraoka G., Yumoto F., Kimura S., Kadota Y., Hishinuma H., Senzaki E., Yamagoe S., Nagata K., Nara M., Suzuki K.,

- Tanokura M., Kuchitsu K. Synergistic activation of the Arabidopsis NADPH oxidase AtrbohD by Ca^{2+} and phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 2008;283:8885-8892.
13. Ilkovets I. M., Sokolovskii S. G., Nait M. R., Volotovskii I. D. Phytohormonal control of the concentration of ionized Ca^{2+} in the cytoplasm of plant cell. *Vesti NAN Belarusi. Ser. Biol. Navuk.* 1999;(3):58-62. (In Russian).
 14. Shorning B. Yu., Yaguzhinsky L. S., Vanyushin B. F., Smirnova E. G. Necessity of superoxide production for development of etiolated wheat seedlings. *Biochemistry (Moscow)*. 2000;65:1357-1361.
 15. Karpets Yu. V., Kolupaev Yu. Ye., Shvidenko M. V. Retardation of cell death process in segments of wheat coleoptiles incubated on sucrose solution. *Fiziologiya i Biokhimiya Kulturnykh Rastenii.* 2011;43(6):513-519. (In Russian).
 16. Kolupaev Yu. Ye., Yastreb T. O., Shvidenko M. V., Karpets Yu. V. Influence of salicylic and succinic acids on formation of active oxygen forms in wheat coleoptiles. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2011;83(5):82-88. (In Ukrainian).
 17. Kolupaev Yu. E., Oboznyi A. I., Shvidenko N. V. Role of hydrogen peroxide in generation of a signal inducing heat tolerance of wheat seedlings. *Rus. J. Plant Physiol.* 2013;60:227-234.
 18. Bradford M. M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976;72:248-254.
 19. 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. *J. Plant Physiol.* 2006;163:405-416.
 20. Lee Y., Lee Y. Roles of phosphoinositides in regulation of stomatal movements. *Plant Signal. Behav.* 2008;3:211-213.
 21. Lecourieux D., Mazars C., Pauly N., Ranjeva R., Pugin A. Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana glauca* cells. *Plant Cell.* 2002;14:2627-2641.
 22. Arisz S. A., van Wijk R., Roels W., Zhu J. K., Haring M. A., Munnik T. Rapid phosphatidic acid accumulation in response to low temperature stress in Arabidopsis is generated through diacylglycerol kinase. *Front. Plant Sci.* 2013;4. doi: 10.3389/fpls.2013.00001.
 23. Marino D., Dunand C., Puppo A., Pauly N. A burst of plant NADPH oxidases. *Trends Plant Sci.* 2012;17:9-15.
 24. Pappan K., Zheng S., Wang X. Identification and characterization of a novel plant phospholipase D that requires polyphosphoinositides and submicromolar calcium for activity in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* 1997;272:7048-7054.
 25. Fariduddin Q., Khalil R. R. A. E., Mir B. A., Yusuf M., Ahmad A. 24-Epibrassinolide regulates photosynthesis, antioxidant enzyme activities and proline content of *Cucumis sativus* under salt and/or copper stress. *Environ. Monit. Assess.* 2013;185:7845-7856.
 26. Talaat N. B., Shawky B. T. 24-Epibrassinolide alleviates salt-induced inhibition of productivity by increasing nutrients and compatible solutes accumulation and enhancing antioxidant system in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Acta Physiol. Plant.* 2013;35:729-740.
 27. Pokotylo I. V., Kretynin S. V., Khripach V. A., Ruelland E., Blume Ya. B., Kravets V. S. Influence of 24-epibrassinolide on lipid signalling and metabolism in *Brassica napus*. *Plant Growth Regul.* 2014;73:9-17.

Получено 06.10.2014