

<https://doi.org/10.15407/dopovidi2025.05.019>

УДК 547.9:547.83:547.85:577.12:577.115.3: 577.152.1:577.325.6:577.16:577.151

Я.С. Колесников, <https://orcid.org/0000-0002-0139-9936>

С.В. Кретинін, <https://orcid.org/0000-0002-5060-9362>

В.С. Кравець, <https://orcid.org/0000-0002-6195-1665>

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В.П. Кухаря НАН України, Київ, Україна

E-mail: kolesnikovyaroslav2017@gmail.com

Роль поліамінів у процесі формування стійкості рослин до дії сольового стресу та надлишку цинку у мутантів за генами фосфоліпаз D

Представлена членом-кореспондентом НАН України А.І. Вовком

Поліаміни, що виявляють гормональну активність, відіграють ключову роль у процесах росту, розвитку та стресових реакціях рослин. Взаємодія специфічних компонентів ліпідного сигналізу, зокрема фосфоліпази D (ФЛД), а також фосфатидної кислоти, з поліамінами у рослин вивчалася раніше. Водночас роль специфічних ізоферментів ФЛД у реакціях рослин на дію стресів, модульованих поліамінами, залишалася досі недостатньо дослідженою. З метою з'ясування ролі ізоферментів ФЛД у формуванні толерантності рослин до сольового стресу та надлишку цинку за дії поліамінів було виконано аналіз морфофізіологічних параметрів та біохімічних маркерів стресостійкості у рослин різниці Таля (*Arabidopsis thaliana*), мутованих за генами, що кодують різні ізоферменти ФЛД. Результати вказують на те, що специфічні ізоферменти ФЛД, зокрема ФЛД γ 1, ФЛД γ 3 та ФЛД δ , відіграють ключову роль у реалізації дії поліамінів у процесі формування стійкості рослин *Arabidopsis thaliana* до дії стресів. Про це свідчить відсутність відновлення морфофізіологічних параметрів рослин, модуляції стабільності мембран і балансу активних форм кисню у мутантів, нокаутованих за генами ФЛД γ 1, ФЛД γ 3, ФЛД δ , за дії поліамінів. Отже, ізоферменти ФЛД γ 1, ФЛД γ 3 і ФЛД δ беруть участь у реалізації механізмів дії поліамінів у процесі розвитку стійкості до дії сольового стресу та надлишку цинку.

Ключові слова: поліаміни, фосфоліпаза D, ізоферменти, фосфатидна кислота, сольовий стрес, надлишок цинку.

Цитування: Колесников Я.С., Кретинін С.В., Кравець В.С. Роль поліамінів у процесі формування стійкості рослин до дії сольового стресу та надлишку цинку у мутантів за генами фосфоліпаз D. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2025. № 5. С. 19—31. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2025.05.019>

© Видавець ВД «Академперіодика» НАН України, 2025. Стаття опублікована за умовами відкритого доступу за ліцензією CC BY-NC-ND (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Вступ. Поліаміни — це аліфатичні аміни з низькою молекулярною масою, які наявні в усіх живих організмах [1]. Поліаміни в рослинах представлені переважно такими сполуками, як путресцин (1,4-діамінобутан), спермідин (*N*-3-амінопропіл-1,4-діамінобутан) і спермін (біс(*N*-3-амінопропіл)-1,4-діамінобутан). Ці біологічно активні сполуки є ключовими модуляторами реакції рослин на дію стресів, зокрема сольового стресу [2] та надлишку важких металів [3]. Водночас детальні уявлення про молекулярні механізми дії поліамінів у регуляції метаболізму клітин в оптимальних і стресових умовах наразі мало досліджені.

Ферменти сигналіngu фосфоліпідів, зокрема фосфоліпази, відіграють важливу роль у регуляції метаболізму клітин у відповідь на вплив позаклітинних біологічно активних сполук (гормонів) та ряду стресорів (сольовий, холодний, осмотичний тощо). Серед цих ферментів особливе місце посідає фосфоліпаза D (ФЛД). ФЛД каталізує гідроліз структурних мембранних фосфоліпідів клітин з формуванням фосфатидної кислоти (ФК). У рослин ФЛД представлена низкою ізоферментів, кожному з яких притаманні унікальні біохімічні властивості, а також роль у процесах онтогенезу рослин і реакціях на дію стресорів довкілля. ФК є біологічно активним ліпідом, що функціонує як вторинний посередник сигнальних каскадів і, як наслідок, відіграє вирішальну роль у регуляції специфіки, динаміки та направленості метаболічних процесів, функціонування клітин та експресії генів через безпосередню взаємодію зі специфічними білками-мішенями [4].

Останніми роками приділено увагу дослідженню впливу поліамінів на активність сигнальних ферментів метаболізму фосфоліпідів у рослин, зокрема ФЛД [5, 6]. Отримані результати вказують на можливість участі окремих ізоферментів ФЛД та ФК на етапі трансдукції сигналів поліамінів у клітинах рослин. Зокрема, у культурах клітин кави поліаміни спермідин і, особливо, путресцин швидко і короточасно активують ФЛД [5]. Більш того, путресцин демонструє швидку активацію ізоферменту ФЛД α 1 *in vitro* у *Arabidopsis thaliana* без впливу на зміни рівня білка ФЛД α 1. Вказана активація ФЛД поліамінами була ідентифікована як компонент регуляторних процесів, що беруть участь у акумулюванні пероксиду водню і подальшому замиканні продихів, зумовленому дією фітогормону абсцизової кислоти [7]. Поліаміни також індукують швидке підвищення рівня фосфатидної кислоти *in vivo* в клітинах коренів *Arabidopsis thaliana*. У відповідь на дію сперміну як референтного поліаміну акумулювання ФК як вторинного посередника та експорт іонів калію опосередковані участю ізоферменту AtФЛД δ [6]. З іншого боку, тривалий вплив поліамінів також зумовлює активацію ФЛД, зокрема, у проростках кукурудзи. Згідно із запропонованим механізмом, осмотичний стрес зумовлює підвищення ендогенного рівня поліамінів у рослинних тканинах, що спричинює активацію ФЛД [8].

Нами проаналізовано участь окремих ізоферментів ФЛД у модуляції поліамінами стійкості рослин до дії стресорів різної природи на основі аналізу морфофізіологічних параметрів та маркерів стійкості рослин. У дослідженнях було використано мутанти за генами тих ізоферментів ФЛД, які раніше не досліджувалися щодо їх участі у реалізації дії поліамінів за участі ФК [6, 7], а також, зокрема, за дії стресів — сольового та надлишку важких металів. Через широкомасштабну війну в Україні вміст важких металів, зокрема цинку, в ґрунті збільшився на великій території, а збитки, завдані довкіллю, набули катастрофічного характеру. Їх поєднання з іншими видами антропогенної діяльності зумовлює синергічний ефект, який може призвести до значних негативних економічних та екологічних наслідків [9, 10]. Підтверджувалася також роль ізоферменту ФЛД δ , відомого за його

участю в реалізації дії поліамінів [6], у формуванні реакцій клітин на дію поліамінів за нормальних та стресових умов.

Мета дослідження — проаналізувати участь окремих ізоферментів ФЛД у модуляції поліамінами стійкості рослин до дії стресорів різної природи на основі аналізу морфофізіологічних параметрів та маркерів стійкості рослин.

Матеріали та методи досліджень. Для дослідження ролі ФЛД у реалізації дії поліамінів як модельні об'єкти було використано немутовані рослини *Arabidopsis thaliana* L., а також мутанти за втратою функцій *Arabidopsis thaliana* L. (нокаут) внаслідок інсерції Т-ДНК до генів специфічних ізоферментів ФЛД. Мутанти: ФЛД α 2 (*pld α 2*, SALK_053957), ФЛД β 1 (*pld β 1*, SALK_079133), ФЛД β 2 (*pld β 2*, SALK_113607), ФЛД γ 1 (*pldy1.1*, SALK_066687C; *pldy1.2*, GK-264A03), ФЛД γ 2 (*pldy2*, SALK_078226), ФЛД γ 3 (*pldy3*, SALK_084335) та ФЛД δ (*pld δ* , SALK_023247). Подвійний мутант (*pld β 1* $\times$ *pld β 2*) було отримано шляхом схрещування відповідних одинарних мутантів.

Насіння стратифікували за температури 4 °С впродовж 2 діб. Рослини вирощували в термостатованих умовах за температури 21 °С та фотоперіоду 16/8 год темрява/світло методом гідропоніки впродовж 1 тижня на мінеральній ваті на 0,5 живильного розчину Хогланда—Арнона. У подальшому розчин був замінений на 0,5 розчину Хогланда—Арнона без додаткових компонентів (контроль) або зі сперміном (60 мкМ), 125 мМ NaCl (сольовий стрес), 300 мкМ ZnSO₄ · 7H₂O (надлишок цинку) чи з комбінованою сумішшю сольового стресу/надлишку цинку разом зі сперміном. Надалі рослини вирощували впродовж трьох тижнів. Вибірка становила 50 рослин. Морфофізіологічні показники фіксували за допомогою фотокамери “Canon PC1200”.

Вміст супероксиду вимірювали гістохімічно [11]. Ізольовані листки *Arabidopsis thaliana* обробляли сперміном (60 мкМ) протягом 5 год, а потім сперміном (60 мкМ) із сольовим/Zn стресом ще протягом 24 год у 6-сантиметрових чашках Петрі. Надалі листки інкубували в натрій-фосфатному буфері (рН 7,1) (контроль) або в буфері, що містив спермін (60 мкМ). Листя інфільтрували у вакуумі 0,05 % (50 мг/100 мл) розчином NBT (нітроголубий тетразолій) разом із стресором. З метою покращення змочування листків зазначеними розчинами до всіх зразків додавали по 50 мкл твіну-20. Оброблені листки інкубували в чашки Петрі разом з розчином NBT (контроль), NBT + NaCl/Zn впродовж 1,5 год. Листки рослин, зафарбовані формазаном, фотографували, площу забарвлення формазаном вимірювали у програмі “ImageJ”.

Пероксид водню виявляли гістохімічно за стандартною методикою. 15 ізольованих листків 4-тижневих рослин *Arabidopsis thaliana* (у розрахунку на 1 пробу) інкубували протягом 2 год зі сперміном (60 мкМ) або стресом NaCl/Zn у 6-сантиметрових чашках Петрі. Для моделювання комбінованого стресу листки обробляли сперміном протягом 1 год, а надалі — сперміном разом зі стресами. Ізольовані 15 листків інкубували у 10 мл розчину 3,3'-діамінобензидину (DAB) у 15 мл ємностях. Безхлорофільні листки фотографували через 30 хв [12]. Забарвлену площу листків вимірювали в програмі “ImageJ”.

Вміст малонового діальдегіду (МДА) оцінювали за накопиченням його продукту з тіобарбітуровою кислотою методом [13]. 100 мг листків 4-тижневих рослин *Arabidopsis thaliana* обробляли сперміном (60 мкМ) впродовж 5 год, а надалі сперміном (60 мкМ) в умовах сольового/Zn стресу додатково впродовж 24 год. Оптичну густину вимірювали спектрофотометрично за довжини хвилі 532 нм, а також 600 нм для корекції неспецифічного поглинання [14].

Рівень відновленого глутатіону вимірювали відповідно до [15] з використанням 5,5-дитіо-біс-(2-нітробензойної кислоти). 14-добові проростки рослин *Arabidopsis thaliana* інкубували зі сперміном впродовж 3 год або дистильованою водою (контроль), а надалі обробляли сольовим/Zn стресом або індукторами стресу разом зі сперміном ще додатково 1,5 год. Оптичну густину отриманого розчину вимірювали спектрофотометрично за довжини хвилі 412 нм.

Аналіз стабільності мембран проводили за рівнем витоку іонів з рослинних клітин [16]. Ізольовані листки 4-тижневих рослин *Arabidopsis thaliana* обробляли розчином сперміну (60 мкМ) протягом 5 год, надалі — сперміном (60 мкМ) із сольовим/Zn стресом протягом 24 год. Листки поміщали в колби і промивали деіонізованою водою, перемішуючи колби в шейкері за кімнатної температури. Електропровідність вимірювали за допомогою кондуктометра.

Експерименти повторювали тричі, кожен з яких мав три технічні повтори, стандартні помилки середнього значення відображають довірчий інтервал на рівні значущості 0,05. На рисунках дані представлені як середнє значення $\pm$ довірчий інтервал, літерами a—d на гістограмах позначено істотні відмінності. Дані аналізували за допомогою одностороннього дисперсійного аналізу ANOVA з подальшим тестом найменшої значущої різниці (LSD) у програмі “XL Toolbox NG”.

Результати та їх обговорення. З метою первинної оцінки ролі специфічних ізоферментів ФЛД у реалізації дії поліамінів досліджували чутливість рослин з мутованими ізоферментами ФЛД до дії стресів за рівнем витоку іонів з клітин — параметра, що свідчить про стабільність плазматичної мембрани і оцінюється за допомогою кондуктометрії. Виявлено, що поліаміни зменшують витік іонів з клітин листків *Arabidopsis thaliana*, індукований дією стресів. Рослини з нокаутом генів ізоферментів ФЛД δ та ФЛД γ 1-3 (*pldd*, *pldy1-3*) втрачали чутливість до дії поліаміну сперміну в індукції часткового зменшення витоку іонів, попередньо індукованого дією сольового стресу. З іншого боку, динаміка витоку іонів у мутанта *pldy2* за дії надлишку цинку та поліамінів мала достовірний зворотний характер (рис. 1). Про відсутність участі ізоферментів ФЛД β 1 та ФЛД β 2 у цих процесах свідчить збережена здатність поліамінів зменшувати витік іонів за умов дії стресів у рослин, мутованих за генами вказаних ізоферментів ФЛД (див. рис. 1).

Аналіз морфологічних параметрів у досліджених рослин *Arabidopsis thaliana* вказує на те, що мутанти *pldy1*, *pldy3* та *pldd* були нечутливими до дії сперміну в процесі формування стійкості росту та розвитку рослин за умов, зокрема, дії надлишку іонів цинку. Так, нечутливість до дії сперміну є найбільш вираженою у мутанта *pldy3* (рис. 2).

Активні форми кисню (АФК) інтенсивно формуються у відповідь на дію широкого спектра стресових факторів довкілля у рослин. Різноманітні біологічно активні речовини відіграють ключову роль як регулятори метаболізму АФК, тим самим сприяючи розвитку стійкості рослин до дії стресів. Встановлено, що спермін за низьких концентрацій активно пригнічує акумулювання супероксидних радикалів і пероксиду водню в листках *Arabidopsis thaliana* за умов дії сольового стресу та надлишку цинку (рис. 3—6). Вказаний ефект сперміну порушувався у мутантів *pldd* і *pldy1* і *pldy3*, тоді як у мутантів *pldy2* цього не зареєстровано за умов надлишку цинку (див. рис. 3, 4). Щодо пероксиду водню, спермін не пригнічував акумулювання вказаної АФК у мутантів *pldd* і *pldy1*—3 за дії надлишку цинку. В оброблених сперміном зразках мутанта *pldy2* спостерігалось послаблення акумулювання H_2O_2 за умов дії надлишку цинку, що свідчить проти участі інтактного ізоферменту в реалізації дії поліамінів у процесі формування стійкості до важких металів (див. рис. 5, 6).

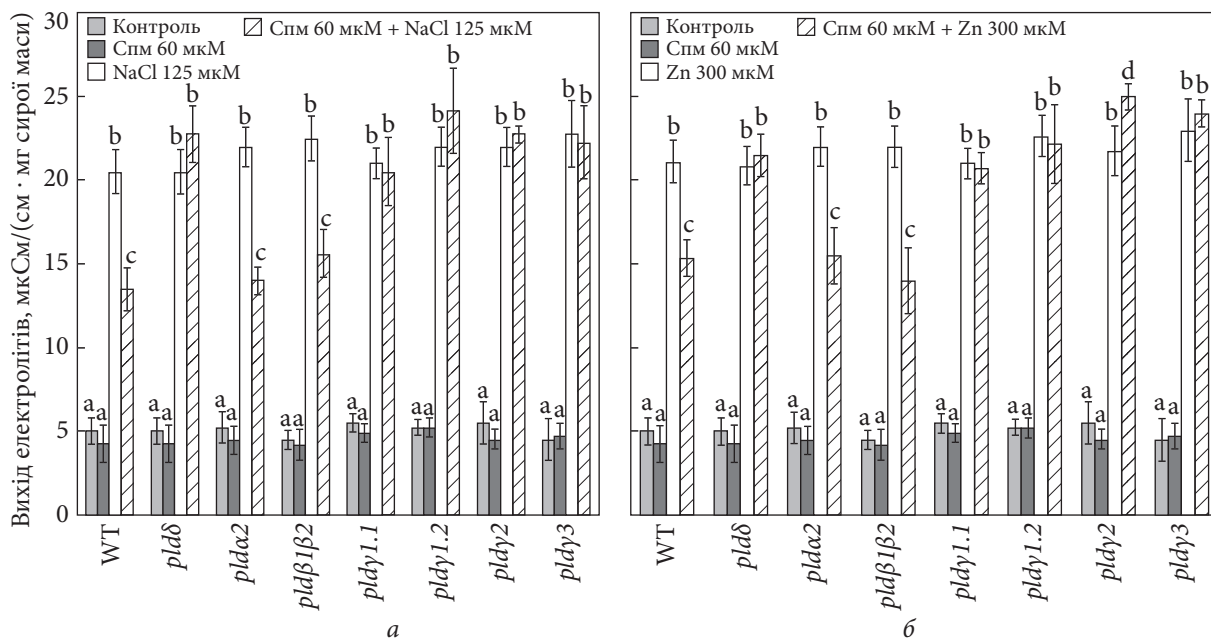


Рис. 1. Аналіз стабільності мембран за рівнем витоку електролітів у листках у відповідь на дію сперміну (СПМ, 60 мкМ) у рослин дикого типу та ФЛД-матованих рослин за дії NaCl (а) або надлишку Zn (б) у рослин *Arabidopsis thaliana*



Рис. 2. Аналіз росту рослин *Arabidopsis thaliana*, матованих за геном ФЛДγ3. Рослини (нематовані та мутант *pldy3*) вирощували на розчині Хогланда—Арнона (контроль) та на розчині Хогланда—Арнона, що містив надлишок цинку, спермін, спермін + Zn-стрес

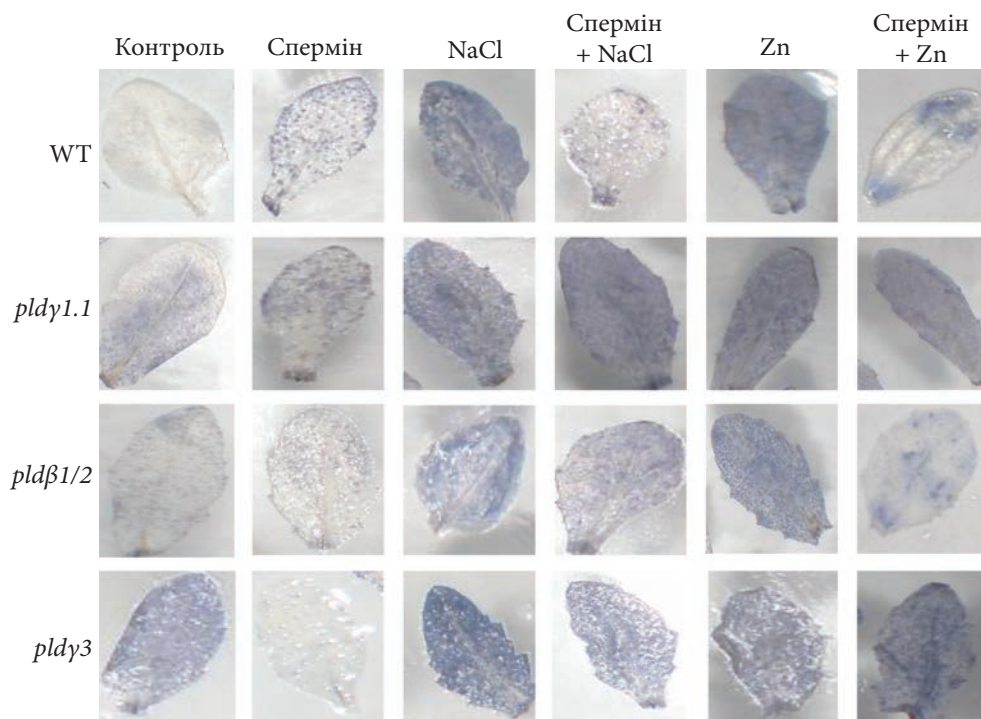


Рис. 3. Гістохімічне визначення супероксидних радикалів у мутантів ФЛД рослин *Arabidopsis thaliana* за осадженням формазану в листках у відповідь на дію сперміну та сольового/Zn стресів

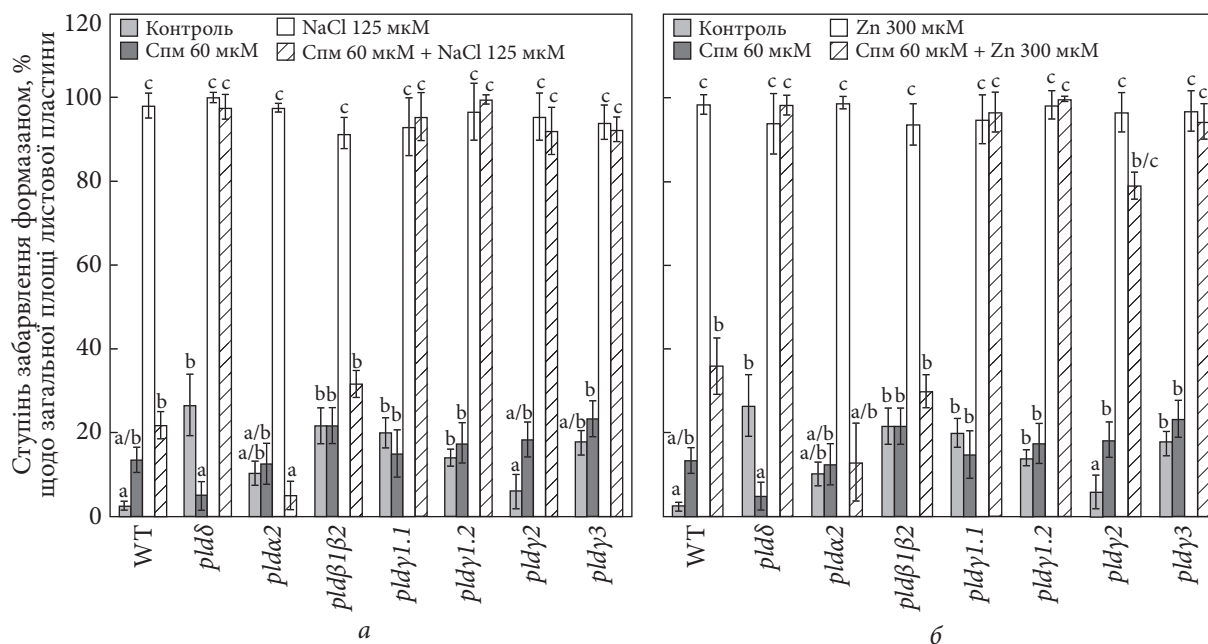


Рис. 4. Рівень супероксидних радикалів у листках *Arabidopsis thaliana*, оброблених сперміном (60 мкМ), у немутуваних рослин (дикого типу, WT) та ФЛД-мутуваних рослин *Arabidopsis thaliana* за умов дії стресів NaCl (а) або надлишку Zn (б)

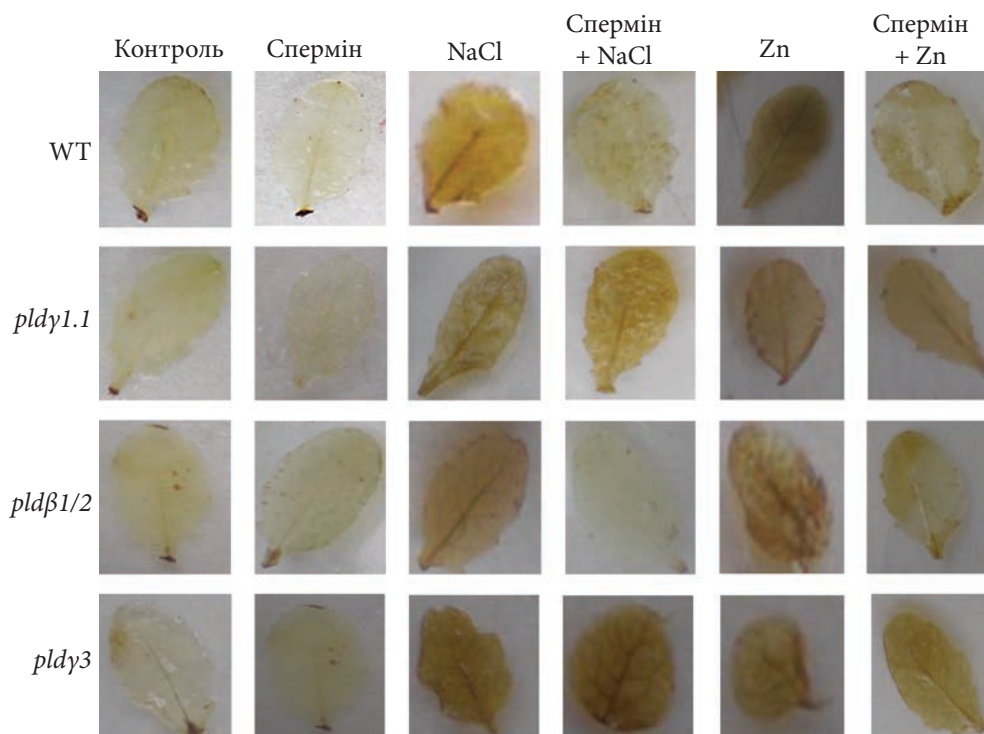


Рис. 5. Гістохімічне визначення H_2O_2 у мутантів ФЛД рослин *Arabidopsis thaliana* в листках у відповідь на дію сперміну та сольового/Zn стресів

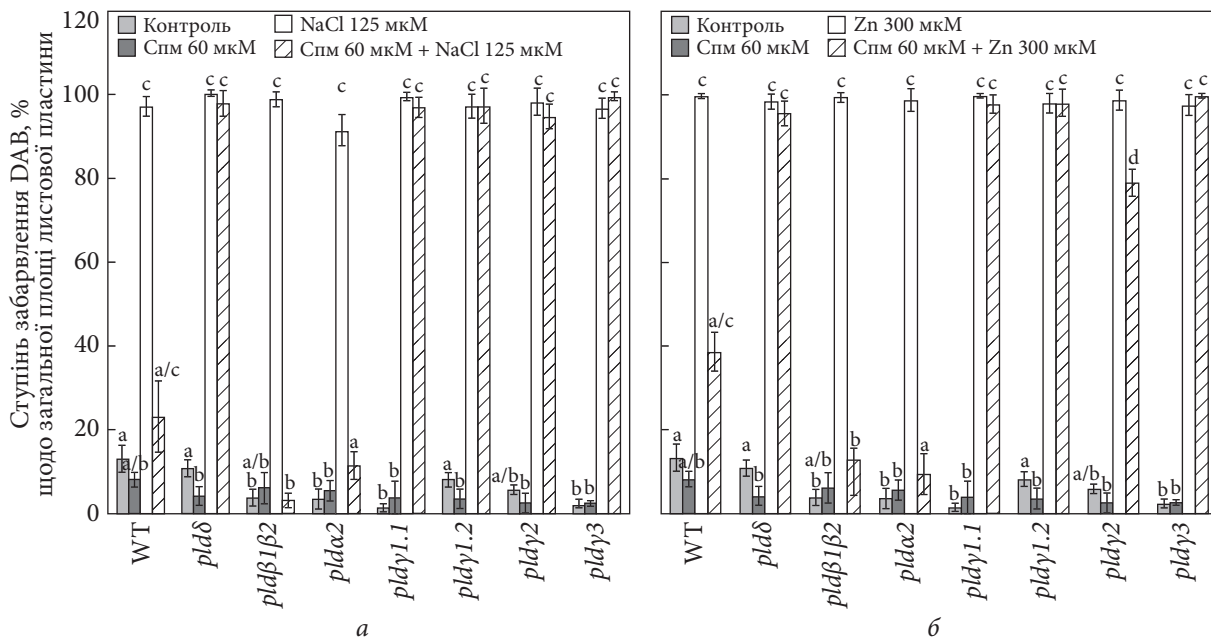


Рис. 6. Рівень H_2O_2 у листках *Arabidopsis thaliana*, оброблених сперміном у немутуваних рослин (дикого типу, WT) та мутантів ФЛД за стресових умов — NaCl (а) і Zn (б)

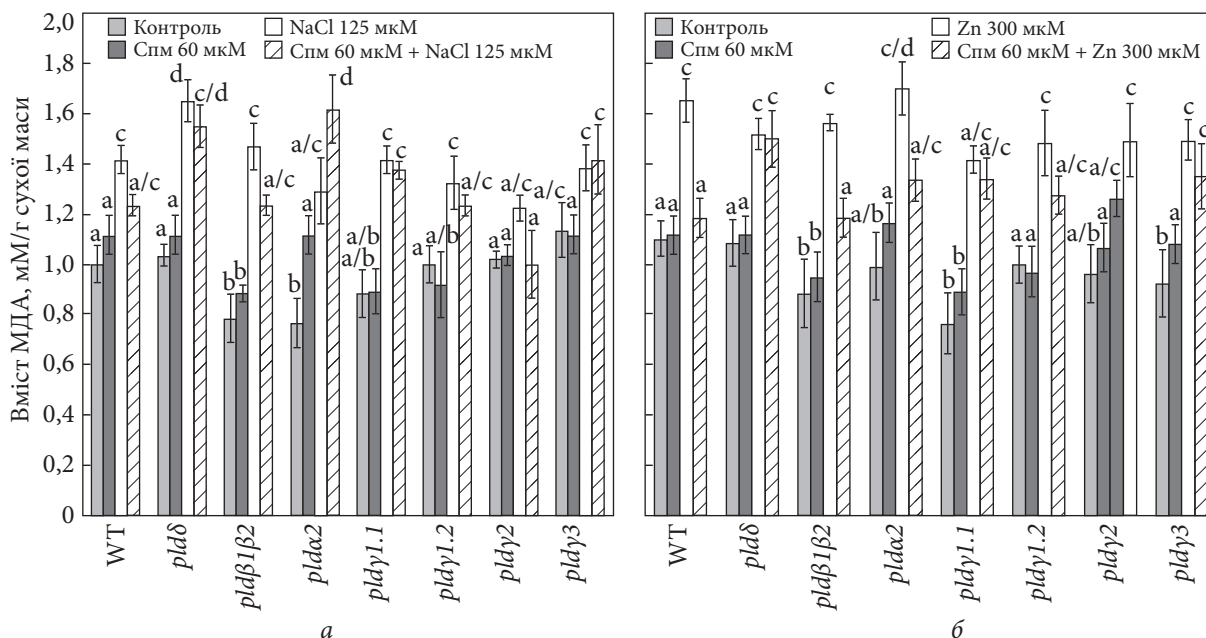


Рис. 7. Вміст МДА в листках *Arabidopsis thaliana* за дії сперміну (60 мкМ) та сольового (а) / Zn (б) стресу у немутуваних рослин (дикого типу, WT) та мутантів ФЛД (*pld*)

Окиснені молекули ліпідів утворюються як побічні продукти метаболізму в умовах стресу через пряму атаку АФК на молекули ліпідів мембран клітин. Низькі фізіологічні концентрації екзогенного сперміну ефективно та частково пригнічують стрес-індуковане акумулювання малонового діальдегіду (МДА), маркера пероксидного окиснення ліпідів, у немутуваних рослинах (рис. 7).

Водночас вказані концентрації поліамінів статистично не пригнічують акумулювання МДА у мутантів *pldδ*, *pldγ1* і *pldγ3* за умов дії обох стресів і лише помірно послаблюють цю реакцію клітин у мутантів *pldγ2* за дії надлишку солей. Більш того, наявні дані також вказують на можливу негативну роль ізоферменту ФЛД α 2 за дії поліамінів у формуванні стійкості до дії надлишку цинку (див. рис. 7).

Рослинам притаманні специфічні системи захисту від надлишку формування АФК. Однією з таких систем є аскорбат-глутатіоновий цикл. Окиснення відновленої форми трипептиду глутатіону за умов перетворення дегідроаскорбату в аскорбат за наявності АФК зумовлює накопичення окисненого глутатіону [17]. Екзогенна аплікація низьких концентрацій сперміну сприяла частковому відновленню рівня відновленого глутатіону в інтактних рослин, попередньо пригніченого дією сольового стресу та надлишком іонів цинку (рис. 8). Водночас у мутантів *pldδ*, *pldγ1.2* та *pldγ3* за дії сперміну не відбувалося відновлення зміни ендогенного рівня глутатіону за стресових умов. Навпаки, у мутантів *pldβ1β2* та *pldα2* дія сперміну за умов впливу стресів спричиняла часткове відновлення рівня формування відновленої форми глутатіону. У мутантів *pldγ2* поліаміни слабо відновлювали рівень глутатіону за дії надлишку солей і водночас додатково знижували вказаний параметр за надлишку цинку, що, можливо, свідчить про роль цього ізоферменту як модулятора окремих стресових реакцій клітин. Слід зазначити, що у мутантів *pldγ1.1* рівень глутатіону підвищувався за дії стресів (див. рис. 8).

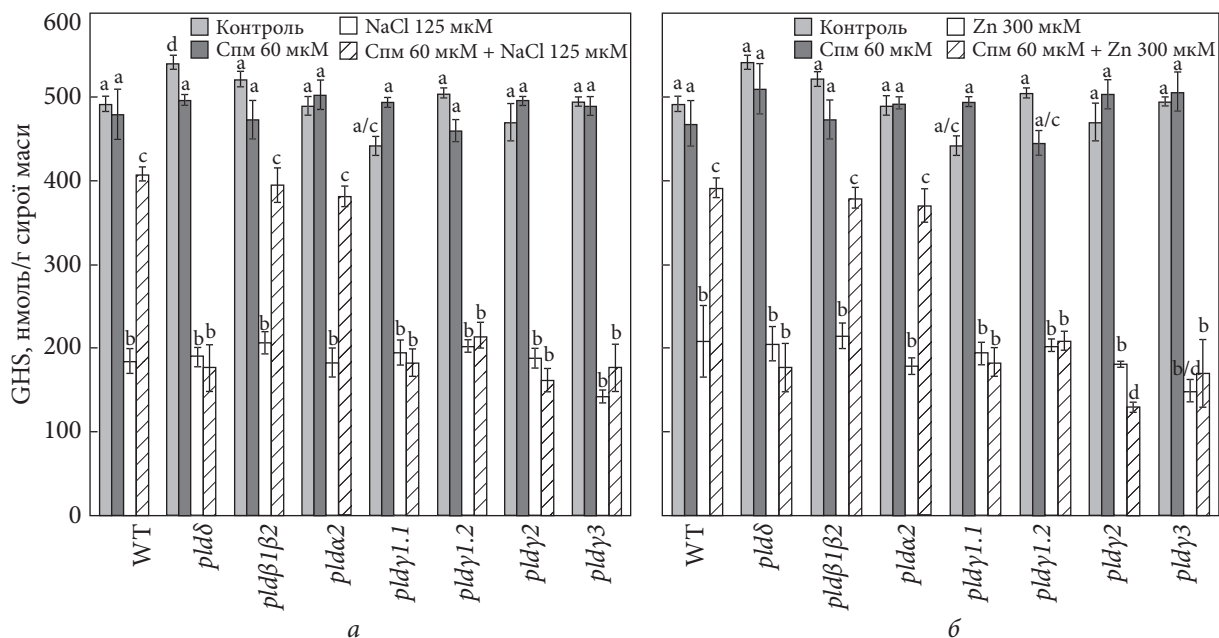


Рис. 8. Рівень відновленого глутатіону в листках *Arabidopsis thaliana* у відповідь на дію сперміну у немутованих рослин (дикого типу, WT) та ФЛД мутантів (*pld*) за наявності стресорів NaCl (а) та Zn (б)

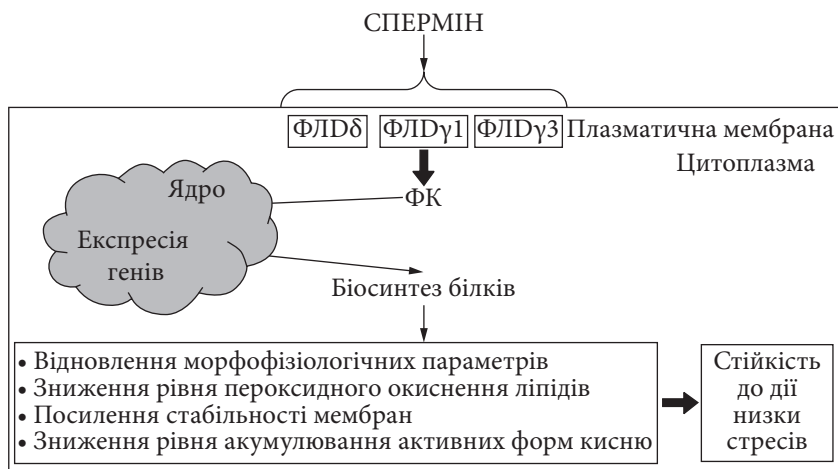


Рис. 9. Модель, що ілюструє роль ФЛД у регуляції стресостійкості рослин, обумовленої дією поліамінів. Схему створено у програмі “CorelDraw”

Проблема ідентифікації типу ізоферментів ФЛД, залучених до дії фітогормонів, залишається надзвичайно актуальною в сучасній біохімії, молекулярній біології та біоорганічній хімії. Відбір специфічних ізоферментів, контрольованих фітогормонами, необхідний, зокрема, для їх подальшого використання в біотехнології як інструментів, здатних регулювати чітко визначені реакції метаболізму клітин, спрямовані на формування стійкості рослин до дії стресів, а також впливати на інтенсивність метаболічних шляхів.

Щодо поліамінів, у реалізації їх дії було встановлено роль лише двох ізоферментів ФЛД: ФЛД α 1 — у регуляції путресцином динаміки клітин прорихів [7]; ФЛД δ — у реалізації дії сперміну в процесі регуляції транспорту іонів з клітин коренів [6]. Слід зазначити, що роль

ФЛД у швидкому формуванні ФК, продукту ФЛД, що бере участь у трансдукції сигналів у клітинах, було встановлено лише для ізоферменту ФЛД δ [6], хоча роль інших ізоферментів ФЛД у цих процесах не проаналізовано. Роль ізоферментів ФЛД γ у реалізації дії поліамінів під час розвитку толерантності до впливу низки стресів, як свідчать отримані результати, полягає в модуляції балансу АФК, забезпеченні стабільності мембран та відновленні ростових параметрів. Роль ФЛД δ у реалізації дії поліамінів полягає в регуляції транспорту іонів [6] та стресостійкості (див. рис. 1—8). Участь ФЛД γ 2, що рідше реєструвалася в процесі дії поліамінів лише за надлишку солей, може вказувати на допоміжну активність цього ізоферменту у формуванні стійкості до дії стресів. За результатами дослідження побудовано модель, що ілюструє роль ФЛД у регуляції стресостійкості рослин, обумовленої дією поліамінів (рис. 9). Сигнальну роль ФК, сформованої за дії поліамінів, наразі не з'ясовано. Відомо лише, що ФК безпосередньо зв'язується з аргіназою AtARGAN2, ферментом біосинтезу поліамінів, і підвищує активність вказаного ферменту, впливаючи на його зв'язування з субстратом [18]. Це свідчить про можливість прямої взаємодії сигналіngu фосфоліпідів з первинними шляхами біосинтезу поліамінів.

Висновки. Проаналізовано морфофізіологічні параметри та маркери стресостійкості рослин *Arabidopsis thaliana* під впливом поліамінів та стресорів різної природи. Побудовано модель, що ілюструє механізм дії поліамінів за участю ФЛД у клітинах рослин. Спермін у рослинах діє через специфічні ізоферменти ФЛД, а саме ФЛД γ 1, ФЛД γ 3 та ФЛД δ , що надалі сприяє відновленню морфологічних і фізіологічних параметрів рослин шляхом підвищення стабільності клітинних мембран, зниження пероксидного окиснення ліпідів і зниження рівня акумулювання активних форм кисню. Зміни цих параметрів, індуковані сперміном, за участю ФЛД, відіграють ключову роль у формуванні стійкості рослин до дії стресів. Це є істотно важливим у процесах формування специфічних і направлених адаптивних реакцій рослини, що значною мірою сприяє формуванню у рослин стійкості до дії сольового стресу та надлишку важких металів у зонах ризикованого землеробства.

Автори щиро вдячні доктору Еріку Рюеланду (*Sorbonne Universités, Génie Enzymatique et Cellulaire, UMR CNRS 7025, Université de Technologie de Compiègne, Франція*) за надані мутанти рослин *Arabidopsis thaliana*.

Дослідження підтримано грантом Національної академії наук України (№ 2.1.10.32-25-29).

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Serafini-Fracassini D., Del Duca S. Programmed cell death reversal: polyamines, effectors of the U-turn from the program of death in *Helianthus tuberosus* L. *Int. J. Mol. Sci.* 2024. **25**, № 10. 5386. <https://doi.org/10.3390/ijms25105386>
2. Hossain M.M., Kordrostami M., Goto F., Rahimi M. Spermine treatment improves salinity tolerance in *Plantago major* by altering growth parameters, biochemical profiles and gene expression. *Sci. Rep.* 2025. **15**, № 1. 25762. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-11903-0>
3. Pramanick P., Chakraborty A., Raychaudhuri S.S. Partial alleviation of zinc induced oxidative stress by polyamines in *Plantago ovata* Forsk. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2022. **148**, № 3. P. 573—583. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02209-w>
4. Kolesnikov Y.S., Kretynin S.V., Kravets V.S., Bukhonska Y.K. Phosphatidic acid formation and signaling in plant cells. *Ukr. Biochem. J.* 2024. **96**, № 1. P. 3—21. <https://doi.org/10.15407/ubj96.01.005>
5. Echevarría-Machado I., Ramos-Díaz A., Brito-Argáez L., Racagni-Di Palma G., Loyola-Vargas V.M., Hernández-Sotomayor S.M.T. Polyamines modify the components of phospholipids-based signal transduction pathway in *Coffea arabica* L. cells. *Plant Physiol. Biochem.* 2005. **43**, № 9. P. 874—881. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.08.013>
6. Zarza X., Shabala L., Fujita M., Shabala S., Haring M.A., Tiburcio A.F., Munnik T. Extracellular spermine triggers a rapid intracellular phosphatidic acid response in Arabidopsis, involving PLD δ activation and stimulating ion flux. *Front Plant Sci.* 2019. **10**. 601. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00601>
7. Qu Y., An Z., Zhuang B., Jing W., Zhang Q., Zhang W. Copper amine oxidase and phospholipase D act independently in abscisic acid (ABA)-induced stomatal closure in *Vicia faba* and Arabidopsis. *J. Plant Res.* 2014. **127**, № 4. P. 533—544. <https://doi.org/10.1007/s10265-014-0633-3>
8. An Z.F., Li C.Y., Zhang L.X., Alva A.K. Role of polyamines and phospholipase D in maize (*Zea mays* L.) response to drought stress. *South. Afric. J. Bot.* 2012. **83**. P. 145—150. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2012.08.009>
9. Дідух Я.П. Екосистемний підхід до оцінки збитків, завданих воєнними діями. *Вісн. НАН України*. 2022. № 6. С. 17—26. <https://doi.org/10.15407/visn2022.06.016>
10. Дідух Я.П. Про наукові засади розроблення методики оцінювання збитків, завданих воєнними діями природним екосистемам: За матеріалами доповіді на засіданні Президії НАН України 18 жовтня 2023 року. *Вісн. НАН України*. 2023. № 12. С. 87—96. <https://doi.org/10.15407/visn2023.12.087>
11. Juszczak I., Baier M. Quantification of superoxide and hydrogen peroxide in leaves. *Plant Cold Acclimation: Hincha D., Zuther E. (Eds.). Methods in Molecular Biology*, vol. 1166. New York, NY: Humana Press, 2014. P. 217—224. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0844-8_16
12. Daudi A., O'Brien J.A. Detection of hydrogen peroxide by DAB staining in *Arabidopsis* leaves. *Bio Protoc.* 2012. **2**, № 18. e263. PMID: PMC4932902
13. Kumar G.N.M., Knowles N.R. Changes in lipid peroxidation and lipolytic and free-radical scavenging enzyme activities during aging and sprouting of potato (*Solanum tuberosum*) seed-tubers. *Plant Physiol.* 1993. **102**, № 1. P. 115—124. <https://doi.org/10.1104/pp.102.1.115>
14. Hodges D.M., DeLong, J.M., Forney C.F., Prange R.K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*. 1999. **207**. P. 604—611. <https://doi.org/10.1007/s004250050524>
15. Ding H., Wang G., Lou L., Lv J. Physiological responses and tolerance of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) exposed to chromium. *Ecotox. Environ. Safety.* 2016. **133**. P. 509—518. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.08.007>
16. Wu W., Zhang Q., Ervin E.H., Yang Z., Zhang X. Physiological mechanism of enhancing salt stress tolerance of perennial ryegrass by 24-epibrassinolide. *Front. Plant Sci.* 2017. **8**. 1017. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01017>
17. Zechmann B. Subcellular roles of glutathione in mediating plant defense during biotic stress. *Plants*. 2020. **9**, № 9. 1067. <https://doi.org/10.3390/plants9091067>
18. Pandit S., Goel R., Mishra G. Phosphatidic acid binds to and stimulates the activity of ARGH2 from *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Biochem.* 2022. **185**. P. 344—355. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.06.018>

Надійшла до редакції 18.09.2025

REFERENCES

1. Serafini-Fracassini, D. & Del Duca, S. (2024). Programmed cell death reversal: polyamines, effectors of the U-turn from the program of death in *Helianthus tuberosus* L. Int. J. Mol. Sci., 25, No. 10, 5386. <https://doi.org/10.3390/ijms25105386>
2. Hossain, M. M., Kordrostami, M., Goto, F. & Rahimi, M. (2025). Spermine treatment improves salinity tolerance in *Plantago major* by altering growth parameters, biochemical profiles and gene expression. Sci. Rep., 15, No. 1, 25762. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-11903-0>
3. Pramanick, P., Chakraborty, A. & Raychaudhuri, S. S. (2022). Partial alleviation of zinc induced oxidative stress by polyamines in *Plantago ovata* Forsk. Plant Cell Tissue Organ Cult., 148, No. 3, pp. 573-583. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02209-w>
4. Kolesnikov, Y. S., Kretynin, S. V., Kravets, V. S. & Bukhonska, Y. K. (2024). Phosphatidic acid formation and signaling in plant cells. Ukr. Biochem. J., 96, No. 1, pp. 3-21. <https://doi.org/10.15407/ubj96.01.005>
5. Echevarría-Machado, I., Ramos-Díaz, A., Brito-Argáez, L., Racagni-Di Palma, G., Loyola-Vargas, V. M. & Hernández-Sotomayor, S. M. T. (2005). Polyamines modify the components of phospholipids-based signal transduction pathway in *Coffea arabica* L. cells. Plant Physiol. Biochem., 43, No. 9, pp. 874-881. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.08.013>
6. Zarza, X., Shabala, L., Fujita, M., Shabala, S., Haring, M. A., Tiburcio, A. F. & 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., 10, 601. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00601>
7. 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, No. 4, pp. 533-544. <https://doi.org/10.1007/s10265-014-0633-3>
8. An, Z. F., Li, C. Y., Zhang, L. X. & Alva, A. K. (2012). Role of polyamines and phospholipase D in maize (*Zea mays* L.) response to drought stress. South. Afric. J. Bot., 83, pp. 145-150. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2012.08.009>
9. Didukh, Y. P. (2022). Ecosystem approach to assessing the impact of threats and losses caused by military actions. Visn. Nac. Acad. Nauk Ukr., No. 6, pp. 17-26 (in Ukrainian). <https://doi.org/10.15407/visn2022.06.016>
10. Didukh, Y. P. (2023). On the scientific principles of developing a methodology for assessing damage caused by military actions to natural ecosystems. Visn. Nac. Acad. Nauk Ukr., No. 12, pp. 87-96 (in Ukrainian). <https://doi.org/10.15407/visn2023.12.087>
11. Juszczak, I. & Baier, M. (2014). Quantification of superoxide and hydrogen peroxide in leaves. In: Hinch, D. & Zuther, E. (Eds.). Plant Cold Acclimation. Methods in Molecular Biology, vol. 1166 (pp. 217-224). New York, NY: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0844-8_16
12. Daudi, A. & O'Brien, J. A. (2012). Detection of hydrogen peroxide by DAB staining in *Arabidopsis* leaves. Bio Protoc., 2, No. 18, e263. PMID: PMC4932902
13. Kumar, G. N. M. & Knowles, N. R. (1993). Changes in lipid peroxidation and lipolytic and free-radical scavenging enzyme activities during aging and sprouting of potato (*Solanum tuberosum*) seed-tubers. Plant Physiol., 102, No. 1, pp. 115-124. <https://doi.org/10.1104/pp.102.1.115>
14. Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F. & Prange, R. K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. Planta, 207, pp. 604-611. <https://doi.org/10.1007/s004250050524>
15. Ding, H., Wang, G., Lou, L. & Lv, J. (2016). Physiological responses and tolerance of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) exposed to chromium. Ecotox. Environ. Safety, 133, pp. 509-518. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.08.007>
16. Wu, W., Zhang, Q., Ervin, E. H., Yang, Z. & Zhang, X. (2017). Physiological mechanism of enhancing salt stress tolerance of perennial ryegrass by 24-epibrassinolide. Front. Plant Sci., 8, 1017. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01017>
17. Zechmann, B. (2020). Subcellular roles of glutathione in mediating plant defense during biotic stress. Plants, 9, No. 9, 1067. <https://doi.org/10.3390/plants9091067>
18. Pandit, S., Goel, R. & Mishra, G. (2022). Phosphatidic acid binds to and stimulates the activity of ARGAS2 from *Arabidopsis*. Plant Physiol. Biochem., 185, pp. 344-355. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.06.018>

Received 18.09.2025

Ya.S. Kolesnikov, <https://orcid.org/0000-0002-0139-9936>

S.V. Kretynin, <https://orcid.org/0000-0002-5060-9362>

V.S. Kravets, <https://orcid.org/0000-0002-6195-1665>

V.P. Kukhar Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry of the NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

E-mail: kolesnikovyaroslav2017@gmail.com

ROLE OF POLYAMINES IN FORMATION OF PLANT RESISTANCE TO SALT STRESS AND ZINC EXCESS IN MUTANTS OF PHOSPHOLIPASE D GENES

Polyamines, which exhibit hormonal activity, play a key role in plant growth, development and stress response. The interaction of specific components of lipid signaling, in particular phospholipase D (PLD) and phosphatidic acid (PA), with polyamines in plants was investigated earlier. At the same time, the role of specific PLD isoenzymes in plant responses to stress modulated by polyamines has remained unexplored. In order to clarify the role of PLD isoenzymes in the formation of plant tolerance to salt stress and zinc excess by polyamines, an analysis of morpho-physiological parameters and biochemical markers of stress resistance was carried out in *Arabidopsis thaliana* plants mutated in genes encoding various PLD isoenzymes. The results indicate that specific PLD isoforms, in particular PLD γ 1, PLD γ 3 and PLD δ , play a key role in the action of polyamines in the formation of the resistance of *Arabidopsis thaliana* plants to stresses. This is evidenced by the absence of the restoration of morphological and physiological parameters of plants, modulation of membrane stability and balance of active oxygen species in PLD γ 1, PLD γ 3, and PLD δ knockout mutants in response to polyamine action. Therefore, the isoenzymes PLD γ 1, PLD γ 3, and PLD δ play a role in the action of polyamines in the development of resistance to salt stress and zinc excess.

Keywords: polyamines, phospholipase D, isoenzymes, phosphatidic acid, salt stress, zinc excess.