

## ИНДУКЦИЯ КАЛЬЦИЕВОГО СИГНАЛА В ЦИТОПЛАЗМЕ КЛЕТОК КОРНЯ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ФОСФАТИДНОЙ КИСЛОТЫ

В. В. ДЕМИДЧИК<sup>1</sup>, Е. П. ТЮРКИНА<sup>1</sup>, В. С. МАЦКЕВИЧ<sup>1</sup>,  
В. В. САМОХИНА<sup>1</sup>, Д. В. КОЛБАНОВ<sup>2</sup>, А. И. СОКОЛИК<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет,  
пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь  
<sup>2</sup>Республиканское учебно-опытное унитарное предприятие БГУ «Щемяслица»,  
ул. Жуковского, 15-А, 223049, д. Щемяслица, Минская обл., Республика Беларусь

Отмечено, что фосфатидная кислота является компонентом биомембран и важным регулятором как у животных, так и растений. Ионы кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ ) активно связываются мембранными доменами, обогащенными фосфатидной кислотой, однако роль данного взаимодействия неясна. Поскольку  $\text{Ca}^{2+}$  – основной вторичный посредник в живых системах, то обнаружение кросс-тока между ним и фосфатидной кислотой представляет несомненный фундаментальный интерес. Выявлено изменение уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме клеток корня арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) под действием фосфатидной кислоты с использованием  $\text{Ca}^{2+}$ -экворинового люминометрии. Продемонстрировано, что фосфатидная кислота (1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфат), введенная в виде липосом в суспензию протопластов, выделенных из клеток корня арабидопсиса, вызывает значительное увеличение активности  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме вследствие активации переноса  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазму из наружной среды. Данный эффект характеризовался насыщением при уровнях фосфатидной кислоты в растворе выше 30 мкмоль/л. Впервые указано на прямое взаимодействие фосфатидной кислоты и  $\text{Ca}^{2+}$  на уровне интактной плазматической мембраны растительных клеток. Обнаруженный феномен может иметь большое значение как для фундаментальной физиологии растений, так и в связи с потенциальным практическим использованием препаратов на основе  $\text{Ca}^{2+}$  и фосфатидной кислоты в биотехнологии.

**Ключевые слова:** фосфатидная кислота (1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфат);  $\text{Ca}^{2+}$ -эквориновая люминометрия; корень; арабидопсис; кальциевый сигнал; цитоплазма.

### Образец цитирования:

Демидчик В. В., Тюркина Е. П., Мацкевич В. С., Самохина В. В., Колбанов Д. В., Соколик А. И. Индукция кальциевого сигнала в цитоплазме клеток корня высших растений под действием фосфатидной кислоты // Вестн. БГУ. Сер. 2, Химия. Биология. География. 2016. № 1. С. 41–45.

### For citation:

Demidchik V. V., Tyurkina E. P., Mackievic V. S., Samokhina V. V., Kolbanov D. V., Sokolik A. I. Calcium signal induction in cytoplasm of root cells of higher plants under phosphatidic acid influence. *Vestnik BGU. Ser. 2, Khimiya. Biol. Geogr.* 2016. No. 1. P. 41–45 (in Russ.).

### Авторы:

**Вадим Викторович Демидчик** – доктор биологических наук, доцент, заведующий кафедрой клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

**Екатерина Павловна Тюркина** – аспирант кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета. Научный руководитель – В. В. Демидчик.

**Вера Сергеевна Мацкевич** – аспирант кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета. Научный руководитель – В. В. Демидчик.

**Вероника Валерьевна Самохина** – аспирант кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета. Научный руководитель – А. И. Соколик.

**Дмитрий Викторович Колбанов** – заместитель директора.

**Анатолий Иосифович Соколик** – кандидат биологических наук, доцент кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

### Authors:

**Vadim Demidchik**, doctor habilitatus of biology, docent; head of the department of plant cell biology and bioengineering, school of biology.

*dzemidchik@bsu.by*

**Ekaterina Tyurkina**, postgraduate student at the department of plant cell biology and bioengineering, school of biology.

*tyurkina.k@gmail.com*

**Vera Mackievic**, postgraduate student at the department of plant cell biology and bioengineering, school of biology.

*v.mackievic@gmail.com*

**Veronika Samokhina**, postgraduate student at the department of plant cell biology and bioengineering, school of biology.

*veronika.bukhovets@gmail.com*

**Dmitrii Kolbanov**, deputy director.

*dmitry-kolbanov@tut.by*

**Anatolii Sokolik**, doctor of biology; associate professor at the department of plant cell biology and bioengineering, school of biology.

*sokolik@bsu.by*

## CALCIUM SIGNAL INDUCTION IN CYTOPLASM OF ROOT CELLS OF HIGHER PLANTS UNDER PHOSPHATIDIC ACID INFLUENCE

V. V. DEMIDCHIK<sup>a</sup>, E. P. TYURKINA<sup>a</sup>, V. S. MACKIEVIC<sup>a</sup>,  
V. V. SAMOKHINA<sup>a</sup>, D. V. KOLBANOV<sup>b</sup>, A. I. SOKOLIK<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Belarusian State University, Nezavisimosti avenue, 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus

<sup>b</sup>Teaching and research centre «Schemislitsa» of Belarusian State University,  
Zhukovskogo street, 15-A, 223049, Schomislitsa, Minskaya obl., Republic of Belarus

Phosphatidic acid is a component of biological membranes and key regulator in both animals and plants. Calcium ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ) can bind to membrane domains enriched by phosphatidic acid, although the role of this interaction is still unclear.  $\text{Ca}^{2+}$  is a major second messenger in plant cells therefore examination of potential interaction between  $\text{Ca}^{2+}$  and the phosphatidic acid signalling pathways is of fundamental significance for plant biology. The aim of this study was to identify the phosphatidic acid-induced changes in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  level of root cells of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. using  $\text{Ca}^{2+}$ -aequorin luminometry. It was shown that the phosphatidic acid (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphate), added as liposomes to root protoplasts isolated from aequorin-transformed arabidopsis, induced transient increase in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  activity. This effect was related to  $\text{Ca}^{2+}$  influx from the external stores and saturated at phosphatidic acid levels above 30  $\mu\text{mol/L}$ . Overall, the obtained data demonstrated the direct interaction of phosphatidic acid and  $\text{Ca}^{2+}$  in the plasma membrane of plant cells. This phenomenon was previously unknown and can be of great importance for both fundamental plant biology and biotechnology.

**Key words:** phosphatidic acid (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphate);  $\text{Ca}^{2+}$ -aequorin luminometry; root; arabidopsis; calcium signal; cytoplasm.

Фосфатидная кислота входит в состав биологических мембран и играет важную роль в физиологических процессах как у животных, так и растений. В растительном организме она участвует в регуляции полярного роста, устьичной активности и защитных реакциях, направленных на адаптацию и противодействие повреждающим факторам, таким как атака патогенов, ранение, засуха, солевой и окислительный стресс [1]. Широкое разнообразие функций фосфатидной кислоты определяется ее прямым вовлечением в фундаментальные клеточные явления – биосинтез липидов, перераспределение мембранного материала и сигналинг. Фосфатидная кислота является предшественником всех фосфолипидов [1]. Ее сигнальная функция схожа по значимости с другими важнейшими вторичными посредниками и контролирует ответы клетки на свет, уровень гормонов и другие ключевые физиологические стимулы [2]. В мембранах фосфатидная кислота оказывает влияние на механические изменения, в частности на изгибание, сжатие, растяжение и набухание [3]. Известно, что она способна воспринимать изменения pH и активности поливалентных катионов [4]. Ионы кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ ) активно связываются мембранными доменами, обогащенными фосфатидной кислотой, однако роль данного взаимодействия неясна [5]. Гипотетически фосфатидная кислота может служить ионофором для  $\text{Ca}^{2+}$  [6]. Однако прямого доказательства того, что уровень  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме может увеличиваться под действием фосфатидной кислоты, пока не получено. Поскольку  $\text{Ca}^{2+}$  является основным вторичным посредником в живых системах, то обнаружение кросс-тока между ним и фосфатидной кислотой представляет несомненный фундаментальный интерес. Под контролем этих вторичных посредников находятся практически все физиологические процессы клетки, включая стрессоустойчивость, рост, синтез полимеров и набор биомассы, что в конечном счете определяет качество и количество урожая.

В связи с вышесказанным представлялось актуальным протестировать влияние фосфатидной кислоты на цитоплазматическую активность  $\text{Ca}^{2+}$ . Цель настоящей работы – выявление количественных изменений уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме клеток корня *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. под действием фосфатидной кислоты с использованием  $\text{Ca}^{2+}$ -эквиориновой люминометрии.

### Материалы и методы исследования

В работе использовались корни 7–10-дневных растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Col-0, экспрессирующих  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающий фотобелок экворин в цитоплазме. Растения были получены из Национального центра образцов арабидопсиса (г. Ноттингем, Великобритания). Асептическая культура целых растений была выращена из семян, которые поверхностно стерилизовались в течение 15 мин раствором, содержащим 20 % Доместоса (коммерческий отбеливатель, РФ), 0,01 % тритона X-100, а затем высевались на поверхность гелевой среды в чашках Петри и культивировались вертикально. Среда содержала полную базовую смесь солей Мурашиге и Скуга (M5524, Sigma, США; pH 6), 1 % сахарозы и 0,35 % фитогеля (P8169, Sigma, США).

Измерения осуществлялись с помощью компьютеризированного люминометра Berthold Lumat LB 9501, управляемого программным пакетом Berthold WinTerm (Berthold, Германия). Данные обрабатывались с использованием программы SigmaPlot 10.0.1 (Systat Software, США). Применялись стандартные экспериментальные подходы определения  $[Ca^{2+}]_{цит}$ , основанные на регистрации и анализе экворин-люминесценции [7, 8]. Для получения протопластов применялись стандартные подходы, освоенные и усовершенствованные ранее в нашей лаборатории [9]. Корни измельчались, к ним добавлялся ферментативный раствор, содержащий 1,5 % целлюлазы Onozuka RS (Yakult Honsha, Япония), 1 % целлюлозы (CalBiochem, Великобритания), 0,1 % пектолиазы Y-23 (Yakult Honsha, Япония), 0,1 % альбумина (Sigma, США), 10 ммоль/л KCl, 10 ммоль/л CaCl<sub>2</sub>, 2 ммоль/л MgCl<sub>2</sub>, pH 6 (трис/мес),  $\pi_0 = 300$  мосмоль/л (D-сорбитол). Измельченные корни помещались в ротационный инкубатор на 50 мин (28 °C, 1 об/мин). После инкубации протопласты отфильтровывались через нейлоновое сито ( $d = 30$  мкм). Суспензия протопластов сохранялась на льду в растворе, содержащем: 5 ммоль/л KCl, 1 ммоль/л CaCl<sub>2</sub>, 1 ммоль/л MgCl<sub>2</sub>, 10 ммоль/л сахарозы, 10 ммоль/л глюкозы, pH 6 (трис/мес),  $\pi_0 = 300$  мосмоль/л (D-сорбитол). Опыты проводились в изоосмотических растворах, содержащих различные уровни Ca<sup>2+</sup>.

При исследовании были использованы липосомы, приготовленные из фосфатидной кислоты (натриевая соль 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфата, выделенная из лецитина яичного желтка (Sigma, США)) согласно стандартным протоколам [6]. 1,2-Диолеил-sn-глицеро-3-фосфат растворялся в смеси хлороформ/метанол (2 : 1). Растворитель в дальнейшем был выпарен, а сухая пленка ресуспендирована в деионизованной воде типа I ультразвуком (20 кГц) в течение 30 мин при комнатной температуре до получения прозрачной эмульсии липосом. Свежеприготовленные липосомы вводились в кювету к протопластам для регистрации Ca<sup>2+</sup>-экворинового сигнала. Конечная концентрация липида составляла 1–50 мкмоль/л.

### Результаты исследований и их обсуждение

Добавление к суспензии протопластов липосом, состоящих из 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфата (50 мкмоль/л), приводило к повышению активности Ca<sup>2+</sup> в цитоплазме (рис. 1). Рост  $[Ca^{2+}]_{цит}$  происходил быстро, что свойственно процессам, затрагивающим перенос Ca<sup>2+</sup> из внешнего депо. Продолжительность Ca<sup>2+</sup>-сигнала составляла около 10 мин. Он характеризовался плавной формой без дополнительных пиков, что свидетельствует о гомогенности мишеней фосфатидной кислоты в клетке. Схожие характеристики были зарегистрированы ранее для пурин-, глутамат- и активируемых Ca<sup>2+</sup>-сигналов [9, 10]. Более значительные изменения цитоплазматической активности Ca<sup>2+</sup> наблюдались при воздействии некоторых активных форм кислорода, хотя они были также схожими по форме [8]. Ранее Ca<sup>2+</sup>-сигналы, вызываемые встраиванием экзогенных агентов, были показаны для некоторых липидов [11], а также аннексинов [12]. В обоих случаях характер изменений Ca<sup>2+</sup> был схож с полученными в настоящей работе данными. Снижение уровня Ca<sup>2+</sup> во внешнем растворе с 2,0 до 0,01 ммоль/л приводило к ингибированию эффекта фосфатидной кислоты, что указывает на вход Ca<sup>2+</sup> извне (см. рис. 1, б).

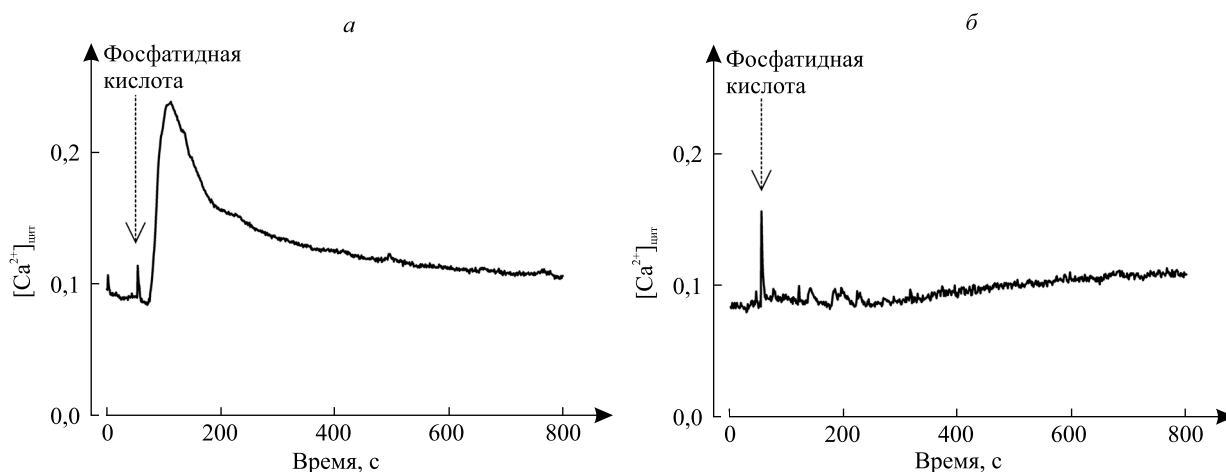


Рис. 1. Воздействие добавления липосом, состоящих из фосфатидной кислоты (натриевая соль 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфата; 50 мкмоль/л), на изменение уровня цитоплазматической активности Ca<sup>2+</sup> ( $[Ca^{2+}]_{цит}$ ) в протопластах, изолированных из клеток корня арабидопсиса, конститутивно экспрессирующих Ca<sup>2+</sup>-связывающий фотобелок экворин:

а – на фоне 2 ммоль/л Ca<sup>2+</sup> в наружном растворе; б – на фоне 0,01 ммоль/л Ca<sup>2+</sup> в наружном растворе.

Состав рабочего раствора: 2 ммоль/л трис/4 ммоль/л мес (pH 6), 0,1 ммоль/л KCl, 330 ммоль/л D-сорбитола

Анализ кривой дозовой зависимости пиковых значений изменений  $[Ca^{2+}]_{цит}$  продемонстрировал, что  $[Ca^{2+}]_{цит}$  имеет тенденцию к насыщению при уровне фосфатидной кислоты 30 мкмоль/л (рис. 2). Схожий характер изменений был ранее обнаружен для искусственных мембран при добавлении пальмитиновой кислоты [11]. Природный уровень фосфатидной кислоты в обогащенных ею мембранных доменах может быть достаточно высоким [1], поэтому обнаруженный феномен транспорта  $Ca^{2+}$ , вероятно, имеет место в интактных биомембранах, таких как плазматическая мембрана, которая выполняет основную функцию в минеральном питании растений и первичной рецепции стрессовых сигналов.

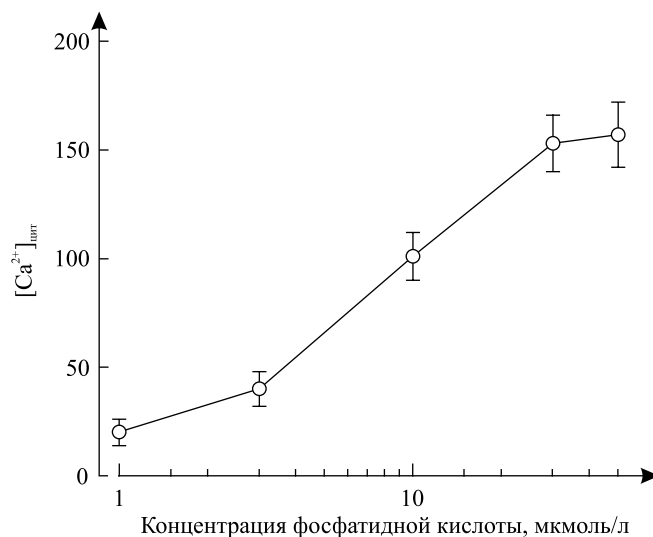


Рис. 2. Зависимость пиковых значений увеличения  $[Ca^{2+}]_{цит}$  под действием различных концентраций фосфатидной кислоты (липосомы 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфата), добавленной экзогенно.

Приведены средние значения для пяти независимых опытов ( $\bar{X} \pm Sx$ ).

Состав рабочего раствора: 2 ммоль/л трис/4 ммоль/л мес (pH 6), 0,1 ммоль/л KCl и 330 ммоль/л D-сорбитола

Исследования последних лет показали, что уровень фосфатидной кислоты может претерпевать быстрые и значительные изменения в ходе ответов растения на внешние стимулы, особенно гормональной природы [13]. С одной стороны, быстрое накопление фосфатидной кислоты часто опосредуется увеличением активности фосфолипазы D, гидролизующей мембранные липиды, такие как фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин и фосфатидилинозитол. Важным источником также потенциально могут выступать неферментативные реакции фрагментации, катализируемые гидроксильными радикалами, пероксинитритом и синглетным кислородом при стрессе [14]. С другой стороны, сигнал фосфатидной кислоты может быть быстро модифицирован или остановлен в результате работы фосфолипазы A2, специфических фосфатаз и киназ [1]. Взаимосвязь данных процессов с путями  $Ca^{2+}$ -сигнализации может приводить к неожиданным новым путям регуляции в клетке. Так, многие фосфатазы и киназы представляют собой  $Ca^{2+}$ -зависимые ферменты, т. е. в определенных физиологических условиях  $Ca^{2+}$  может выступать в роли ингибитора сигнала фосфатидной кислоты. Одновременно  $Ca^{2+}$  является ключевым активатором большинства фосфолипаз D у высших растений [15], что может выражаться в усиленной продукции фосфатидной кислоты при увеличении активности  $Ca^{2+}$  в цитоплазме. Таким образом, можно предположить, что взаимодействие  $Ca^{2+}$  и фосфатидной кислоты тонко регулируется клеткой, а взаимное усиление их сигналов может быть использовано при рецепции программ стрессовых ответов и развития.

На основании полученных результатов исследования можно сделать следующие выводы:

- фосфатидная кислота, введенная в виде липосом в суспензию протопластов, выделенных из клеток корня арабидопсиса, вызывает вход  $Ca^{2+}$  в цитоплазму из наружной среды;
- вызываемый фосфатидной кислотой вход  $Ca^{2+}$  в цитоплазму характеризуется насыщением при уровнях фосфатидной кислоты в растворе выше 30 мкмоль/л.

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК (REFERENCES)

1. Testerink C., Munnik T. Molecular, cellular, and physiological responses to phosphatidic acid formation in plants // J. Exp. Bot. 2011. Vol. 62. P. 2349–2361 [Testerink C., Munnik T. Molecular, cellular, and physiological responses to phosphatidic acid formation in plants. J. Exp. Bot. 2011. Vol. 62. P. 2349–2361 (in Engl.)].



2. Wang X., Chapman K. D. Lipid signaling in plants // *Front. Plant Sci.* 2013. Vol. 4. P. 216 [Wang X., Chapman K. D. Lipid signaling in plants. *Front Plant Sci.* 2013. Vol. 4. P. 216 (in Engl.)].
3. Kooijman E. E., Tieleman D. P., Testerink C., Munnik T., Rijkers D. T., Burger K. N., de Kruijff B. An electrostatic/hydrogen bond switch as the basis for the specific interaction of phosphatidic acid with proteins // *J. Biol. Chem.* 2007. Vol. 282. P. 11356–11364 [Kooijman E. E., Tieleman D. P., Testerink C., Munnik T., Rijkers D. T., Burger K. N., de Kruijff B. An electrostatic/hydrogen bond switch as the basis for the specific interaction of phosphatidic acid with proteins. *J. Biol. Chem.* 2007. Vol. 282. P. 11356–11364 (in Engl.)].
4. Wang W., Anderson N. A., Travesset A., Vaknin D. Regulation of the electric charge in phosphatidic acid domains // *J. Phys. Chem. B.* 2012. Vol. 116. P. 7213–7220 [Wang W., Anderson N. A., Travesset A., Vaknin D. Regulation of the electric charge in phosphatidic acid domains. *J. Phys. Chem. B.* 2012. Vol. 116. P. 7213–7220 (in Engl.)].
5. Faraudo J., Travesset A. Phosphatidic acid domains in membranes: effect of divalent counterions // *Biophys. J.* 2007. Vol. 92. P. 2806–2818 [Faraudo J., Travesset A. Phosphatidic acid domains in membranes: effect of divalent counterions. *Biophys. J.* 2007. Vol. 92. P. 2806–2818 (in Engl.)].
6. Medvedev S. S., Tankelyun O. V., Batov A. Y., Voronina O. V., Martinec J., Machkov I. Ionophorous functions of phosphatidic acid in the plant cell // *Russ. J. Plant Physiol.* 2006. Vol. 53. P. 39–47 [Medvedev S. S., Tankelyun O. V., Batov A. Y., Voronina O. V., Martinec J., Machkov I. Ionophorous functions of phosphatidic acid in the plant cell. *Russ. J. Plant Physiol.* 2006. Vol. 53. P. 39–47 (in Engl.)].
7. Fricker M. D. Fluorescent and luminescent techniques to probe ion activities in living plant cells // *Fluoresc. Lumin. Probes. Boil. Activity : a practical guide to technology for quantitative real-time analysis.* San Diego, 1999. P. 569–596 [Fricker M. D. Fluorescent and luminescent techniques to probe ion activities in living plant cells. *Fluoresc. Lumin. Probes. Boil. Activity : a practical guide to technology for quantitative real-time analysis.* San Diego, 1999. P. 569–596 (in Engl.)].
8. Demidchik V., Shabala S. N., Coutts K. B., Tester M. A., Davies J. M. Free oxygen radicals regulate plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ - and  $\text{K}^{+}$ -permeable channels in plant root cells // *J. Cell Sci.* 2003. Vol. 116, № 1. P. 81–88 [Demidchik V., Shabala S. N., Coutts K. B., Tester M. A., Davies J. M. Free oxygen radicals regulate plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ - and  $\text{K}^{+}$ -permeable channels in plant root cells. *J. Cell Sci.* 2003. Vol. 116, No. 1. P. 81–88 (in Engl.)].
9. Demidchik V. V. Glutamate activates sodium and calcium currents in the plasma membrane of Arabidopsis root cells // *Planta.* 2004. Vol. 219, № 1. P. 167–175 [Demidchik V. V. Glutamate activates sodium and calcium currents in the plasma membrane of Arabidopsis root cells. *Planta.* 2004. Vol. 219, No. 1. P. 167–175 (in Engl.)].
10. Demidchik V., Shang Z., Shin R., Thompson E., Rubio L., Chivasa S., Slabas A. R., Glover B. J., Schachtman D. P., Shabala S. N., Davies J. M. Plant extracellular ATP signaling by plasma membrane NADPH oxidase and  $\text{Ca}^{2+}$  channels // *Plant J.* 2009. Vol. 58, № 6. P. 903–913 [Demidchik V., Shang Z., Shin R., Thompson E., Rubio L., Chivasa S., Slabas A. R., Glover B. J., Schachtman D. P., Shabala S. N., Davies J. M. Plant extracellular ATP signaling by plasma membrane NADPH oxidase and  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Plant J.* 2009. Vol. 58, No. 6. P. 903–913 (in Engl.)].
11. Agafonov A., Gritsenko E., Belosludtsev K., Kovalev A., Gateau-Roesch O., Saris N. E., Mironova G. D. A permeability transition in liposomes induced by the formation of  $\text{Ca}^{2+}$ /palmitic acid complexes // *Biochim. Biophys. Acta.* 2003. Vol. 1609. P. 153–160 [Agafonov A., Gritsenko E., Belosludtsev K., Kovalev A., Gateau-Roesch O., Saris N. E., Mironova G. D. A permeability transition in liposomes induced by the formation of  $\text{Ca}^{2+}$ /palmitic acid complexes. *Biochim. Biophys. Acta.* 2003. Vol. 1609. P. 153–160 (in Engl.)].
12. Laohavisit A., Mortimer J. C., Demidchik V., Coxon K. M., Stancombe M. A., Macpherson N., Brownlee C., Hofmann A., Webb A. A. R., Miedema H., Battey N. H., Davies J. M. Zea mays annexins modulate cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$ , form a  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable conductance and have peroxidase activity // *Plant Cell.* 2009. Vol. 21, № 2. P. 479–493 [Laohavisit A., Mortimer J. C., Demidchik V., Coxon K. M., Stancombe M. A., Macpherson N., Brownlee C., Hofmann A., Webb A. A. R., Miedema H., Battey N. H., Davies J. M. Zea mays annexins modulate cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$ , form a  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable conductance and have peroxidase activity. *Plant Cell.* 2009. Vol. 21, No. 2. P. 479–493 (in Engl.)].
13. Villasuso A. L., Di Palma M. A., Aveladaco M., Pasquare P. J., Racagni G., Giusto N. M., Machado E. E. Differences in phosphatidic acid signalling and metabolism between ABA and GA treatments of barley aleurone cells // *Plant Physiol. Biochem.* 2013. Vol. 65. P. 1–8 [Villasuso A. L., Di Palma M. A., Aveladaco M., Pasquare P. J., Racagni G., Giusto N. M., Machado E. E. Differences in phosphatidic acid signalling and metabolism between ABA and GA treatments of barley aleurone cells. *Plant Physiol. Biochem.* 2013. Vol. 65. P. 1–8 (in Engl.)].
14. Demidchik V. V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology // *Environ. Exp. Bot.* 2015. Vol. 109. P. 212–228 [Demidchik V. V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environ. Exp. Bot.* 2015. Vol. 109. P. 212–228 (in Engl.)].
15. Wang X. The Arabidopsis phospholipase D family. Characterization of a calcium-independent and phosphatidylcholine-selective PLD zeta 1 with distinct regulatory domains Qin C1 // *Plant Physiol.* 2002. Vol. 128, № 3. P. 57–68 [Wang X. The Arabidopsis phospholipase D family. Characterization of a calcium-independent and phosphatidylcholine-selective PLD zeta 1 with distinct regulatory domains Qin C1. *Plant Physiol.* 2002. Vol. 128, No. 3. P. 57–68 (in Engl.)].