

УДК 581.1.036.2:577.15

## ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ КАЛЬЦИЕВОГО ГОМЕОСТАЗА НА СОДЕРЖАНИЕ ОКСИДА АЗОТА В КОРНЯХ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ И ИХ ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТЬ

Ю.В. КАРПЕЦ, Ю.Е. КОЛУПАЕВ

Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева  
62483 Харьков, п/о «Коммунист-1»  
e-mail: plant\_biology@mail.ru

Исследовали влияние экзогенного кальция ( $\text{CaCl}_2$ ) и кальциевого ионофора A23187 на содержание оксида азота (NO) в корнях этиолированных проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и их теплоустойчивость. Обработка проростков хлоридом кальция концентрациями 5 и 50 мМ, ионофором A23187 концентрацией 1 мкМ и особенно комбинацией 5 мМ  $\text{CaCl}_2$  с 1 мкМ A23187 вызывала транзиторное увеличение содержания NO в корнях с максимумом через 1–2 ч после начала обработки. Эти же воздействия индуцировали повышение устойчивости проростков к повреждающему прогреву. Эффекты усиления генерации NO, вызываемые экзогенным кальцием и кальциевым ионофором, в значительной степени угнетались ингибитором фермента, подобного NO-синтазе животных — L-NAME ( $\text{N}^G$ -nitro-L-arginine methyl ester). Обработка проростков L-NAME также препятствовала развитию их теплоустойчивости, вызываемому действием кальция и (или) ионофора A23187. Сделано заключение о роли оксида азота в развитии теплоустойчивости проростков пшеницы, индуцированном изменением их кальциевого гомеостаза.

*Ключевые слова:* *Triticum aestivum* L., кальций, оксид азота, теплоустойчивость.

Восприятие действия стрессоров и формирование реакций растений происходит с участием сигнальных посредников — ионов кальция, активных форм кислорода (АФК), оксида азота (NO), цАМФ и др. [12, 21]. Кальций признан универсальным посредником в клеточных реакциях растительных и животных организмов [12, 14], который может служить связующим звеном для многих сигнальных путей [11]. Оксид азота задействован в сигнальной трансдукции при формировании устойчивости растений к влиянию ряда абиотических и биотических стрессоров [19].

Между оксидом азота и кальцием, по-видимому, существуют тесные функциональные связи, особенно заметно проявляющиеся при действии на растения экстремальных факторов. Так, показано, что скавенжеры оксида азота снимали повышение содержания кальция в клетках растений, вызываемое осмотическим стрессом [5, 8]. В ответ на кратковременное действие гипотермии в растениях арабидопсиса быстро повышалось содержание NO с последующим возрастанием концентрации внутриклеточного кальция [1]. Авторы сделали вывод, что NO как сигнальный посредник при трансдукции сигналов температурных стрессов предшествует кальцию.

В то же время показано, что обработка клеток эпидермиса листьев арабидопсиса 10 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  вызывала быстрое повышение содержания оксида азота в клетках, задерживаемое в последующем закрытии устьиц [25]. В ответ на обработку растений табака озоном повышалось содержание оксида азота, которое угнеталось антагонистами кальция — рутениевым красным и хлоридом лантана [23]. На клетках табака показано усиление синтеза оксида азота патогенным элиситором криптогеином, которое в значительной степени подавлялось хелатором кальция ЭГТА [17]. ЭГТА угнетал также аргининзависимый синтез оксида азота в гипокотиле подсолнечника [6]. Имеются сведения, что фермент растений, подобный NO-синтазе животных, активируется кальцием и (или) кальмодулином [7]. В то же время повышение содержания оксида азота в клетках приводит к активации гуанилатциклазы, усилению образования цГМФ, что, в свою очередь, вызывает активацию АДФ-рибозилциклазы и накопление цАДФ-рибозы, открывающей внутриклеточные кальциевые каналы [20]. Также считается возможным прямое влияние оксида азота на состояние кальциевых каналов путем их S-нитрозилирования [15].

Известно, что устойчивость растений к абиотическим стрессорам индуцируется как экзогенными донорами оксида азота, так и солями кальция [9, 16]. Нитропруссид натрия (донор NO) и экзогенный кальций повышали солеустойчивость растений горчицы, индуцируя антиоксидантную систему и накопление осмотически активных веществ [13]. При совместной обработке растений донором NO и хлоридом кальция положительные эффекты суммировались.

В целом имеющиеся сведения дают возможность констатировать, что оксид азота и ионы кальция как сигнальные посредники находятся в сложном взаимодействии, однако вопрос об их расположении в сигнальных цепях при формировании конкретных адаптивных реакций остается открытым. Большинство исследований функционального взаимодействия кальция и NO выполнены на зеленых растениях, значительно меньше сведений для этиолированных объектов. В исследованиях, проведенных нами ранее, показано повышение теплоустойчивости этиолированных проростков пшеницы экзогенными хлоридом кальция [16] и донором оксида азота [2].

Целью настоящей работы было изучение влияния изменений кальциевого гомеостаза на содержание оксида азота и выяснение возможного участия NO в развитии теплоустойчивости этиолированных проростков пшеницы, индуцируемом ионами  $\text{Ca}^{2+}$ .

## Методика

Исследовали этиолированные проростки пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Элегия. Семена после 30-минутного обеззараживания в 5 %-м растворе пероксида водорода проращивали в течение 4 сут на очищенной водопроводной воде при температуре 20 °С. После этого проростки опытных вариантов переносили на 1 сут на растворы хлорида кальция концентрациями 0,5; 5 или 50 мМ, кальциевого ионофора A23187 концентрацией 1 мкМ или на смесь 5 мМ  $\text{CaCl}_2$  и 1 мкМ A23187. В отдельной серии опытов исследовали влияние ингибитора фермента, подобного NO-синтазе животных — L-NAME ( $\text{N}^G$ -nitro-L-arginine methyl ester), на проявление физиологических эффектов экзогенного кальция и каль-

циевого ионофора. L-NAME концентрацией 2 мМ добавляли в среду за 2 ч до внесения в нее  $\text{CaCl}_2$  и (или) A23187. Концентрации указанных соединений выбраны на основании предварительных опытов.

Через определенное время после начала инкубации проростков на растворах исследуемых соединений в корнях, которые по сравнению с побегами более чувствительны к действию экзогенных веществ [16], определяли содержание оксида азота по методу, описанному в работе [26], с модификациями. Основой метода является превращение содержащегося в растениях NO в нитрит и определение концентрации последнего по реакции Грисса. Навеску свежесрезанного растительного материала гомогенизировали на льду в 50 мМ ацетатном буфере (pH 3,6) с добавлением 2 %-го ацетата цинка. Гомогенат центрифугировали при температуре не выше 4 °С при 8000 g в течение 15 мин, затем к 10 мл надосадочной жидкости добавляли 250 мг древесного угля. Смесь фильтровали сквозь бумажный фильтр, после чего смешивали 2 мл фильтрата с 1 мл 1 %-го реактива Грисса в 12 %-й уксусной кислоте. Через 30 мин определяли светопоглощение раствора при длине волны 530 нм. В качестве стандарта использовали растворы нитрита натрия.

Через 1 сут после инкубации проростков на растворах исследуемых соединений их подвергали потенциально летальному прогреву в водяном ультратермостате при температуре  $46,0 \pm 0,1$  °С в течение 10 мин. Через 4 сут после воздействия повреждающего прогрева оценивали относительное количество выживших проростков.

Опыты проводили в трехкратной биологической повторности, каждый эксперимент воспроизводили независимо по три раза. На рисунках приведены средние величины и их стандартные погрешности. Кроме специально оговоренных случаев обсуждены различия, достоверные при  $p \leq 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Изменение кальциевого гомеостаза растительных клеток может быть вызвано действием экзогенного кальция в относительно высоких концентрациях [25] либо обработкой растений или их органов кальциевыми ионофорами, способствующими поступлению кальция, депонированного в межклетниках и клеточных стенках, в цитозоль [18]. Мы использовали оба приема влияния на кальциевый гомеостаз.

Хлорид кальция в низкой концентрации (0,5 мМ) не оказывал существенного влияния на теплоустойчивость проростков пшеницы, в то время как под действием 5 и особенно 50 мМ  $\text{CaCl}_2$  выживаемость проростков после повреждающего прогрева заметно повышалась (рис. 1). Теплоустойчивость проростков возрастала и под влиянием кальциевого ионофора A23187. Наиболее существенный защитный эффект отмечался при комбинированном действии ионофора и экзогенного кальция.

Под влиянием соли кальция концентрацией 0,5 мМ фиксировалась лишь тенденция к незначительному повышению содержания NO в корнях в течение первого часа наблюдений (рис. 2). Обработка корней проростков пшеницы хлоридом кальция в более высоких концентрациях вызывала транзиторное увеличение количества оксида азота в корнях с максимумом через 1–2 ч после начала обработки. Таким же был и характер влияния кальциевого ионофора. Наиболее значительное повышение содержания оксида азота наблюдалось при сочетании A23187 и 5 мМ

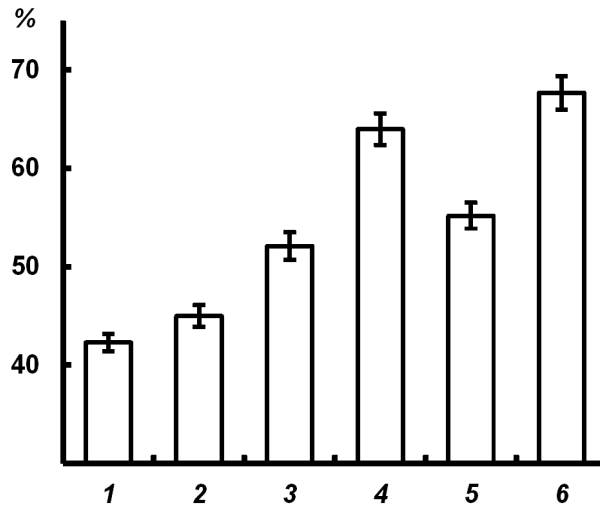


Рис. 1. Выживаемость (%) проростков пшеницы после повреждающего прогрева (10 мин при температуре 46 °С). Здесь и на рис. 2:

1 – контроль; 2 – CaCl<sub>2</sub> (0,5 mM); 3 – CaCl<sub>2</sub> (5 mM); 4 – CaCl<sub>2</sub> (50 mM); 5 – A23187 (1 мкМ); 6 – CaCl<sub>2</sub> (5 mM) + A23187 (1 мкМ)

NO-синтазе животных [20]. Для оценки его вклада в генерацию оксида азота, индуцируемую экзогенным кальцием, использовали ингибиторный анализ. Ингибитор фермента, подобного NO-синтазе животных (L-NAME), сам по себе несколько снижал содержание оксида азота в тканях корней и в значительной степени угнетал повышение количества NO, вызываемое 50 мМ хлоридом кальция или комбинацией 5 мМ CaCl<sub>2</sub> с 1 мкМ кальциевым ионофором A23187 (рис. 3). Часть пула оксида азо-

хлорида кальция. Во всех случаях через 6–24 ч после начала обработки проростков экзогенным кальцием и (или) кальциевым ионофором содержание NO несколько снижалось, хотя абсолютные значения превышали контрольные показатели.

Одним из основных источников образования NO в растительных клетках считается реакция окислительно-восстановительного превращения аргинина с участием НАДФН и молекулярного кислорода, катализируемая ферментом, подобным

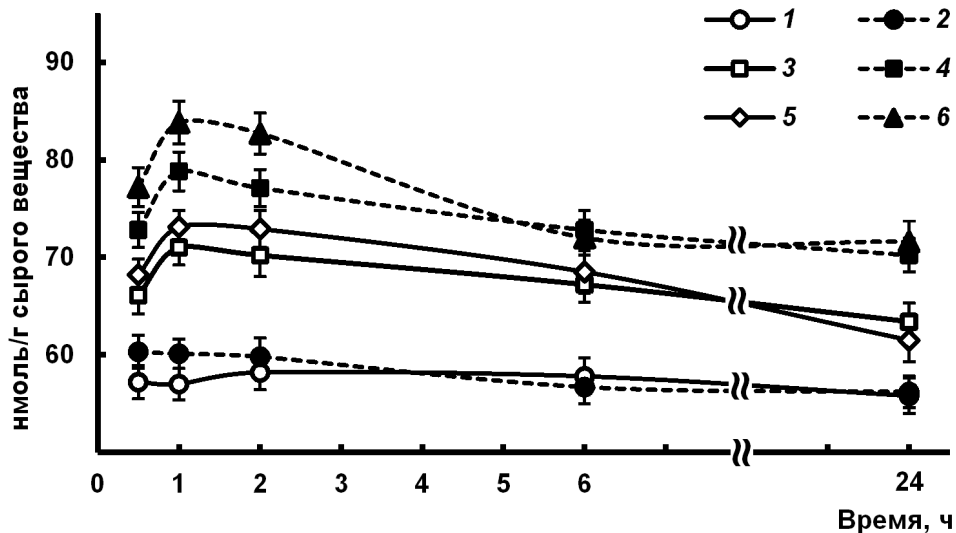


Рис. 2. Динамика содержания оксида азота (нмоль/г сырого вещества) в корнях проростков пшеницы при действии экзогенного кальция и кальциевого ионофора

та в растительных клетках может образовываться за счет активности нитратредуктазы [22]. Однако в наших экспериментах проростки выращивали в отсутствие специального азотного питания, а нитратредуктаза, как известно, относится к ферментам, синтез которых индуцируется субстратом. Ранее с использованием ингибитора нитратредуктазы вольфрамата натрия нами было показано, что вклад этого фермента в синтез оксида азота в корнях проростков пшеницы при их выращивании на воде сравнительно небольшой [3].

Если оксид азота является посредником в трансдукции сигнала, вызываемого экзогенным кальцием или кальциевым ионофором и активирующего защитные реакции клеток проростков, то их обработка ингибитором синтеза NO L-NAME должна препятствовать развитию теплоустойчивости. И действительно, в наших экспериментах предобработка корней интактных проростков ингибитором L-NAME в значительной степени препятствовала развитию их теплоустойчивости, вызываемому обработкой экзогенным кальцием и (или) кальциевым ионофором (рис. 4). О роли оксида азота в индуцировании теплоустойчивости растительных клеток также свидетельствует положительное влияние на

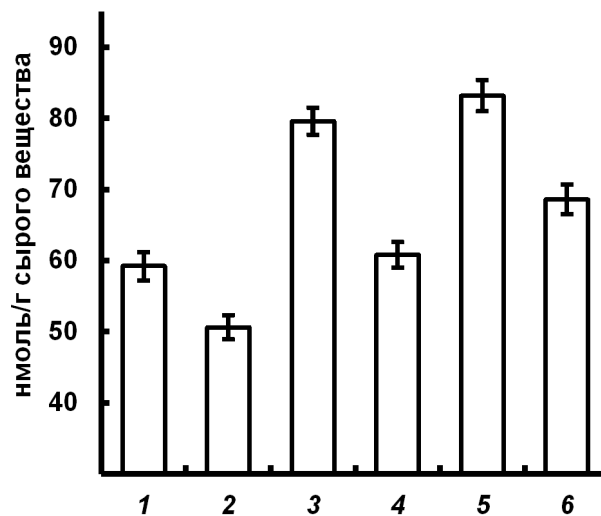


Рис. 3. Влияние экзогенного кальция, кальциевого ионофора и ингибитора фермента, подобного NO-синтазе животных (L-NAME), на содержание оксида азота в корнях проростков пшеницы (нмоль/г сырого вещества). Здесь и на рис. 4:

1 — контроль; 2 — L-NAME (2 мМ); 3 — CaCl<sub>2</sub> (50 мМ); 4 — CaCl<sub>2</sub> (50 мМ) + L-NAME (2 мМ); 5 — CaCl<sub>2</sub> (5 мМ) + A23187 (1 мкМ); 6 — CaCl<sub>2</sub> (5 мМ) + A23187 (1 мкМ) + L-NAME (2 мМ). П р и м е ч а н и е. Содержание NO определяли через 1 ч после начала инкубации на растворах CaCl<sub>2</sub> и A23187. В вариантах с комбинированной обработкой L-NAME добавляли за 2 ч до внесения CaCl<sub>2</sub> и A23187

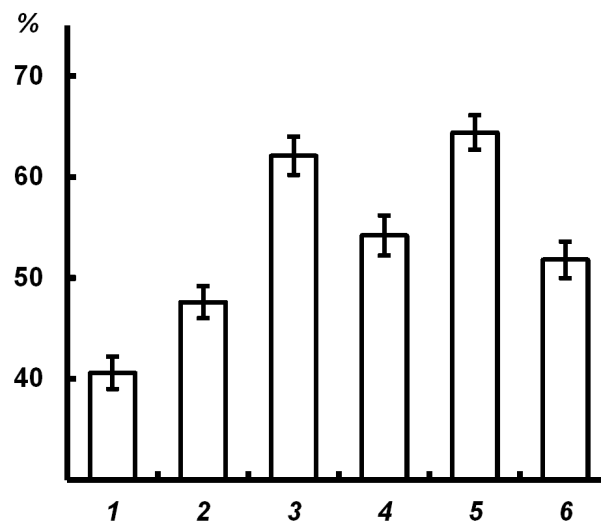


Рис. 4. Влияние экзогенного кальция, кальциевого ионофора и ингибитора фермента, подобного NO-синтазе животных (L-NAME), на выживание (%) проростков пшеницы после повреждающего прогрева (10 мин при температуре 46 °C)

теплоустойчивость проростков пшеницы донора оксида азота нитропруссид натрия, показанное ранее [2].

Однако следует отметить, что в наших экспериментах L-NAME, снижая при сочетании с действием кальция и (или) кальциевого ионофора их положительный эффект, сам по себе немного, но достоверно ( $p \leq 0,05$ ) повышал теплоустойчивость проростков пшеницы (см. рис. 4). Этот эффект ингибитора фермента, подобного NO-синтазе животных, объяснить без специальных исследований сложно. Возможно, что исключение из сигнальной сети такого посредника, как NO, само по себе является стресс-фактором, активирующим некоторые защитные системы растения, в частности антиоксидантную [24].

Итак, есть основания полагать, что оксид азота как сигнальный посредник задействован в процессах развития теплоустойчивости, индуцированных изменением кальциевого гомеостаза. При этом одним из ключевых энзимов, обеспечивающих стимулированное кальцием образование оксида азота, по-видимому, является фермент, подобный NO-синтазе животных.

Отмечая роль оксида азота как посредника, задействованного в повышении теплоустойчивости проростков, вызываемом экзогенным кальцием и (или) кальциевым ионофором, следует подчеркнуть, что эффекты NO как компонента сигнальной цепи также могут реализоваться с участием кальция. Ранее нами было показано, что повышение теплоустойчивости отрезков колеоптилей пшеницы, вызываемое донором NO, в значительной степени нивелировалось блокатором кальциевых каналов разных типов — хлоридом лантана и антагонистом кальмодулина хлорпромазином [4]. Как уже отмечалось, оксид азота, активируя ферменты, катализирующие образование цГМФ и цАДФ-рибозы, может способствовать открыванию внутриклеточных кальциевых каналов и формированию определенных кальциевых сигналов [10, 20]. Таким образом, можно предположить, что кальций как сигнальный посредник может находиться сразу на разных участках сигнальных цепей, задействованных в процессах индуцирования устойчивости растений к абиотическим стрессорам. Не исключено, что и другие сигнальные посредники, в частности NO, также могут одновременно действовать на разных участках сигнальной сети. Высказанные предположения выходят за рамки полученного экспериментального материала и могут быть предметом специальных исследований.

1. Бакакина Ю.С., Колеснева Е.В., Дубовская Л.В., Вологовский И.Д. Участие оксида азота и циклического гуанозинмонофосфата в регуляции концентрации ионов  $Ca^{2+}$  в цитозоле клеток *Arabidopsis thaliana* при температурном стрессе // Весці Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. — 2011. — № 1. — С. 50–56.
2. Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е., Вайнер А.А. Функциональное взаимодействие оксида азота и пероксида водорода при формировании индуцированной теплоустойчивости проростков пшеницы // Физиология растений. — 2015. — 62, № 1. — С. 72–78.
3. Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е., Швиденко Н.В., Луговая А.А. Участие оксида азота в развитии теплоустойчивости проростков пшеницы, индуцированной кратковременным прогревом // Вісн. Харків. аграр. ун-ту. Сер. Біологія. — 2014. — Вип. 1 (31). — С. 47–54.
4. Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О. Влияние нитропруссид натрия на теплоустойчивость колеоптилей пшеницы: связь эффектов с образованием и обезвреживанием активных форм кислорода // Физиология растений. — 2011. — 58, № 6. — С. 883–890.
5. Astier J., Besson-Bard A., Wawer I. et al. Nitric oxide signalling in plants: cross-talk with  $Ca^{2+}$ , protein kinases and reactive oxygen species // Annu. Plant Reviews. — 2010. — 42. — P. 147–170.

6. *Corpas F.J., Leterrier M., Valderrama R. et al.* Nitric oxide imbalance provokes a nitrosative response in plants under abiotic stress // *Plant Sci.* — 2011. — **181**. — P. 604–611.
7. *Courtois C., Besson A., Dehan J. et al.* Nitric oxide signalling in plants: interplays with Ca<sup>2+</sup> and protein kinases // *J. Exp. Bot.* — 2008. — **59**. — P. 155–163.
8. *Gould K.S., Lamotte O., Klinguer A. et al.* Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response? // *Plant Cell Environ.* — 2003. — **26**. — P. 1851–1862.
9. *Hasanuzzaman M., Nahar K., Alam M.M., Fujita M.* Exogenous nitric oxide alleviates high temperature induced oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings by modulating the antioxidant defense and glyoxalase system // *Aust. J. Crop. Sci.* — 2012. — **6**. — P. 1314–1323.
10. *Jeandroz S., Lamotte O., Astier J. et al.* There's more to the picture than meets the eye: nitric oxide cross talk with Ca<sup>2+</sup> signaling // *Plant Physiol.* — 2013. — **163**. — P. 459–470.
11. *Johnson J.M., Reichelt M., Vadassery J. et al.* An Arabidopsis mutant impaired in intracellular calcium elevation is sensitive to biotic and abiotic stress // *BMC Plant Biol.* — 2014. — **14**. — P. 162.
12. *Kaur N., Gupta A.K.* Signal transduction pathway under abiotic stresses in plant // *Curr. Sci.* — 2005. — **88**. — P. 1771–1780.
13. *Khana M.N., Siddiquic M.H., Mohammad F., Naeem M.* Interactive role of nitric oxide and calcium chloride in enhancing tolerance to salt stress // *Nitric Oxide.* — 2012. — **27**. — P. 210–218.
14. *Kim M.C., Chung W.S., Yun D., Cho M.J.* Calcium and calmodulin-mediated regulation of gene expression in plants // *Mol. Plant.* — 2009. — **2**. — P. 13–21.
15. *Klausner R.D., Rouault T.A., Harford J.B.* Regulating the fate of mRNA: the control of cellular iron metabolism // *Cell.* — 1993. — **72**. — P. 19–28.
16. *Kolupaev Yu.Ye., Karpets Yu.V., Kosakivska I.V.* The importance of reactive oxygen species in the induction of plant resistance to heat stress // *Gen. Appl. Plant Physiol.* — 2008. — **34**, N 3–4. — P. 251–266.
17. *Lamotte O., Guold K., Lecourieux D. et al.* Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein // *Plant Physiol.* — 2004. — **135**. — P. 516–529.
18. *Minibayeva F., Polygalova O., Alyabyev A., Gordon L.* Structural and functional changes in root cells induced by calcium ionophore A23187 // *Plant Soil.* — 2000. — **219**. — P. 169–175.
19. *Mur L.A.J., Mandon J., Persijn S. et al.* Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge // *AoB Plants.* — 2012. — **5**. — pls052; doi:10.1093/aobpla/pls052.
20. *Neill S., Bright J., Desikan R. et al.* Nitric oxide evolution and perception // *J. Exp. Bot.* — 2008. — **59**. — P. 25–35.
21. *Neill S.J., Desikan R., Clarke A. et al.* Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants // *Ibid.* — 2002. — **53**. — P. 1237–1247.
22. *Neill S.J., Desikan R., Hancock J.T.* Nitric oxide signaling in plants // *New Phytol.* — 2003. — **159**. — P. 11–35.
23. *Pasqualini S., Reale L., Calderini O. et al.* Involvement of protein kinases and calcium in the NO-signalling cascade for defence-gene induction in ozonated tobacco plants // *J. Exp. Bot.* — 2012. — **63**. — P. 4485–4496.
24. *Vital S.A., Fowler R.W., Virgen A. et al.* Opposing roles for superoxide and nitric oxide in the NaCl stress-induced upregulation of antioxidant enzyme activity in cotton callus tissue // *Environ. Exp. Bot.* — 2008. — **62**. — P. 60–68.
25. *Wang W.H., Yi X.Q., Han A.D. et al.* Calcium-sensing receptor regulates stomatal closure through hydrogen peroxide and nitric oxide in response to extracellular calcium in *Arabidopsis* // *J. Exp. Bot.* — 2012. — **63**. — P. 177–190.
26. *Zhou B., Guo Z., Xing J., Huang B.* Nitric oxide is involved in abscisic acid-induced antioxidant activities in *Stylosanthes guianensis* // *Ibid.* — 2005. — **56**. — P. 3223–3228.

Получено 24.12.2014

#### ВПЛИВ ЗМІН КАЛЬЦІЄВОГО ГОМЕОСТАЗУ НА ВМІСТ ОКСИДУ АЗОТУ В КОРЕНЯХ ПРОРОСТКІВ ПШЕНИЦІ ТА ЇХ ТЕПЛОСТІЙКІСТЬ

Ю.В. Карпець, Ю.Є. Колупаєв

Харківський національний аграрний університет ім. В.В. Докучаєва

Досліджували вплив екзогенного кальцію (CaCl<sub>2</sub>) і кальцієвого іонофору A23187 на вміст оксиду азоту (NO) в коренях етіюльованих проростків пшениці (*Triticum aestivum* L.) та їх

теплостійкість. Обробка проростків хлоридом кальцію концентраціями 5 і 50 мМ, іонофором А23187 концентрацією 1 мкМ й особливо комбінацією 5 мМ CaCl<sub>2</sub> з 1 мкМ А23187 спричинювала транзиторне збільшення вмісту NO в коренях із максимумом через 1–2 год після початку обробки. Ці самі впливи індукували підвищення стійкості проростків до ушкоджувального прогрівання. Ефекти посилення генерування NO, спричинювані екзогенним кальцієм і кальцієвим іонофором, значною мірою пригнічувались інгібітором ферменту, подібного до NO-синтази тварин — L-NAME (N<sup>G</sup>-nitro-*L*-arginine methyl ester). Обробка проростків L-NAME також перешкоджала розвитку їх теплостійкості, спричинюваному дією кальцію та (або) іонофору А23187. Зроблено висновок про роль оксиду азоту в розвитку теплостійкості проростків пшениці, індукованому зміною їх кальцієвого гомеостазу.

#### INFLUENCE OF CHANGES OF CALCIUM HOMEOSTASIS ON NITRIC OXIDE CONTENT IN ROOTS OF WHEAT SEEDLINGS AND THEIR HEAT RESISTANCE

*Yu.V. Karpets, Yu.E. Kolupaev*

V.V. Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University  
р/о «Коммунист-1», Kharkiv, 62483, Ukraine

The influence of exogenous calcium (CaCl<sub>2</sub>) and calcium ionophore A23187 on the nitric oxide (NO) content in roots of etiolated seedlings of wheat (*Triticum aestivum* L.) and their heat resistance have been investigated. Treatment of seedlings with the calcium chloride in concentration of 5 and 50 mM, ionophore A23187 in concentration of 1 μM, and especially with the combination of 5 mM CaCl<sub>2</sub> and 1 μM A23187 invoked the transitional increase of NO content in roots with the maximum within 1–2 hours after the treatment beginning. The same influences induced the rising of resistance of seedlings to the damaging heating. The effects of intensifying of NO generation, invoked by the exogenous calcium and calcium ionophore, were substantially suppressed with L-NAME (N<sup>G</sup>-nitro-*L*-arginine methyl ester; the inhibitor of enzyme, similar to animals NO-synthase). Treatment of seedlings with L-NAME also prevented the development of their heat resistance, caused by the influence of calcium and (or) ionophore A23187. The conclusion about the nitric oxide role in development of heat resistance of wheat seedlings, induced by the change of their calcium homeostasis was made.

*Key words:* *Triticum aestivum* L., calcium, nitric oxide, heat resistance.