

УДК 581.138.1

## ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ СРЕДЫ НА ГЕНЕРАЦИЮ ОКСИДА АЗОТА (NO) В КОРНЯХ ЭТИОЛИРОВАННЫХ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА

© 2012 г. А. К. Глянько, Н. Б. Митанова, А. В. Степанов

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, 664033

e-mail: akglyanko@sifibr.irk.ru

Поступила в редакцию 12.01.2011 г.

Изучен уровень оксида азота (NO) в корнях этиолированных проростков гороха посевного (*Pisum sativum* L.) с помощью флуоресцентного зонда ДАФ-2ДА и флуоресцентной микроскопии. Анализированы поперечные срезы корня толщиной 100–150 мкм (участок корня 10–15 мм от апекса). Показано, что уровень NO в корнях через 24 ч увеличивался более чем в 2 раза в вариантах с  $\text{NaNO}_2$  и нитропруссидом натрия. При подкормке проростков  $\text{KNO}_3$  пик в накоплении NO в корнях (увеличение в 2 раза) наблюдался через 30 мин. Подкормка проростков L-аргинином (2 мМ) увеличивала интенсивность флуоресценции срезов корней более чем в 2 раза. Инокуляция проростков клубеньковыми бактериями (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*) способствовала снижению содержания NO на фоне контроля ( $\text{H}_2\text{O}$ ), нитропруссиды натрия и азотных соединений. Ловушки (скавенджеры) NO (2-фенил-4,4,5,5-тетраметилимидазолин-1-оксид 3-оксид - ФТИО, гемоглобин) и ингибиторы нитратредуктазы и животной NO-синтазы (вольфрамат натрия, аминоксидин гидрохлорид) снижали уровень NO в корнях. Результаты обсуждаются в связи с ролью NO в растениях при действии биотических и абиотических факторов.

Оксид азота (NO) — газообразная молекула, свободный радикал, обладает широким спектром биологического действия. Физиологические эффекты NO сложны и многообразны. Эта молекула легко проходит через плазматические мембраны и действует как межклеточный переносчик сигналов и как вторичный посредник внутриклеточных сигнальных систем [1]. У млекопитающих NO вовлекается в регуляцию сосудистого гомеостаза, в нейрональную сигнализацию, в иммунный ответ организма на инфекцию, воспаление и другие физиологические процессы [1, 2]. В практической медицине широко используются NO-препараты для лечения сердечно-сосудистых и других заболеваний человека (нитроглицерин, изосорбит моно- и динитрат, нитропруссид и др.).

В растениях участие NO охватывает большой диапазон физиологических функций, связанных с защитой растения от неблагоприятных абиотических и биотических факторов, ростом, окислительным стрессом, программированной клеточной смертью, сигнальной трансдукцией и транскрипционными факторами [3–6].

Интерес к оксиду азота со стороны фитобиологов усилился после установления феномена выделения NO из растительных тканей [7, 8]. Было установлено, что эмиссия NO из тканей увеличивается при экстремальных условиях среды [9–11]. В больших концентрациях молекула NO токсична для бактерий, грибов, опухолевых клеток, вирусов, растений, животных [12]. Так, оксид азота в миллимолярных концентрациях индуцировал

активность каспаз, вызывал распад нуклеиновых кислот и уменьшал синтез АТФ, но микромолярная концентрация этого соединения в условиях окислительного стресса подавляла перекисное окисление липидов и фрагментацию ДНК в клетках табака [13].

Токсичность молекулы NO связана с ее высокой способностью реагировать с белками, содержащими металлы с переменной валентностью, и кислородом, а также образовывать продукты с аминами и тиолами [14]. В связи с этим в научную литературу введен термин “нитрозативный стресс” (nitrosative stress) аналогично “окислительному стрессу” (oxidative stress) [15, 16]. В то же время высокая химическая активность и полифункциональный характер действия NO затрудняет разработку модели о ее роли в сигнальных путях клетки [1, 17]. Тем не менее в настоящее время принято, что оксид азота образует одну из 8 сигнальных систем организмов — NO-синтазную сигнальную систему [18].

Биологическая роль NO в растениях изучена недостаточно по сравнению с животными организмами [19]. Одной из причин этого может быть вопрос о путях синтеза NO в растениях. Если для животных организмов этот вопрос решен, то для растений обсуждаются, по крайней мере, два пути синтеза NO: образование при ферментативном восстановлении нитратов, нитритов и L-аргининзависимый синтез, катализируемый ферментом, подобным животной NO-синтазе [19]. Возможны и другие пути генерации NO в растениях:

с участием полиаминов [20] и при неэнзиматическом восстановлении нитратов [21]. В связи с этим логично предположить, что неодинаковые по природе внешние факторы будут вызывать в растительных клетках активацию различных путей синтеза NO.

С этой точки зрения представляет интерес изучение влияния ризобияльной инфекции и азотных солей на генерацию корнями бобового растения оксида азота. Тем более, что роль NO в бобово-ризобияльном симбиозе изучена недостаточно, особенно на начальных стадиях инфицирования и формирования симбиотических структур [22]. По данным литературы, экзогенный NO в виде донора оксида азота – нитропруссид натрия, отрицательно влиял на размножение клубеньковых бактерий *in vitro* и на рост бобового растения. При этом степень токсического действия NO (нитропруссид натрия) на организмы была дозозависимой [23].

Цель работы – изучение содержания эндогенного оксида азота в корнях этиолированных проростков гороха в зависимости от действия на растения биотического (инокуляция корней *Rhizobium*) и абиотического (высокие дозы азотных солей) факторов, оценка влияния нитропруссид натрия, L-аргинина, ловушек NO (2-фенил-4,4,5,5-тетраметилимидазолин-1-оксил-3-оксид – ФТИО, гемоглобин) и ингибиторов нитратредуктазы (вольфрамат натрия) и животной NO-синтазы (аминогуанидин гидрохлорид) на уровень оксида азота в корнях проростков гороха.

## МЕТОДИКА

Объект исследований – этиолированные проростки гороха посевного (*Pisum sativum* L.), сорт Ямальский (селекция ЗАО “НПФ Сибирская аграрная компания”, Россия). Семена, промытые теплой водой с мылом и поверхностно стерилизованные в течение 15 мин 3%-ным раствором пероксида водорода, проращивали в кюветах на влажной фильтровальной бумаге при 22°C в течение 2 сут, считая с момента замачивания. Для исследований отбирали однородный материал. Критерием однородности служила длина корней (включая эпикотиль) 25–30 мм.

Для дальнейшего роста проростки помещали в кюветы на фильтровальную бумагу, смоченную дистиллированной водой или растворами испытываемых соединений. Для ризобияльной инокуляции использовали штамм клубеньковых бактерий *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* – CIAM 1026, полученный из коллекции Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии РАСХН (г. Пушкин, Россия). Инокуляцию отрезков корней (участок 10–15 мм от апекса) проводили суспензией кле-

ток ризобий в концентрации  $2 \times 10^4$  кл./мкл на 200 мкл среды.

Для окрашивания срезов использовали флуоресцентный зонд 4,5-диаминофлуоресцеин диацетат (ДАФ-2ДА). Это соединение проникает через клеточную мембрану и деацетилюет с помощью внутриклеточных эстераз в 4,5-диаминофлуоресцеин (ДАФ-2), который образует с NO флуоресцирующее соединение – диаминотриазолфлуоресцеин триазол (ДАФ-2Т) [24, 25]. Для получения окрашенного соединения (ДАФ-2Т) отрезки корней инкубировали с 10 мкМ ДАФ-2ДА в 10 мМ Трис-НСl (рН 7.4) в течение 30 мин при 26°C.

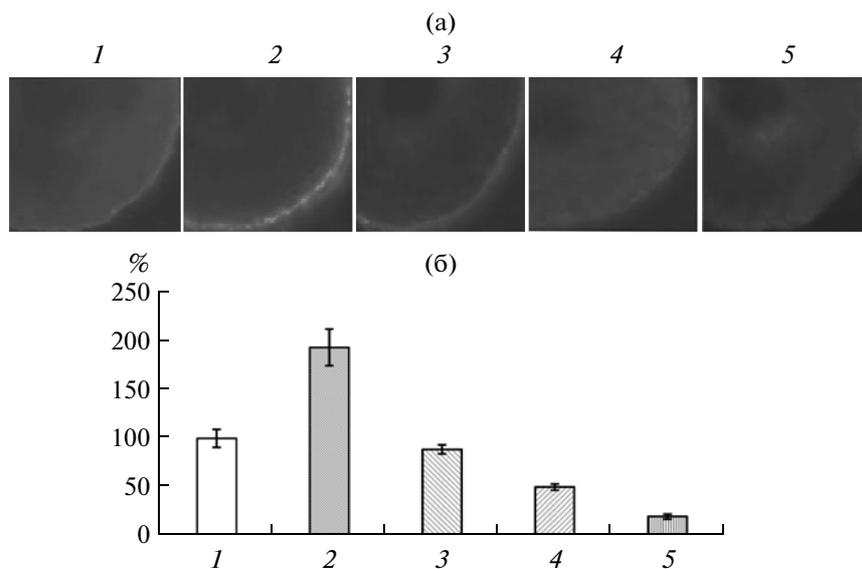
Из этих отрезков корней получали поперечные срезы толщиной 100–150 мкм и анализировали их на флуоресцентном микроскопе Axio Observer Z1 (“Karl Zeiss”, Германия) с цифровой монохромной камерой Axio Cam MRm3 и пакетом программного обеспечения для захвата и анализа изображений Axio Vision Rel.4.6 (“Karl Zeiss”, Германия) с использованием блока фильтров № 10 с длиной волны возбуждения 450–490 нм, эмиссией 515–565 нм.

Применяли реактивы: гемоглобин из эритроцитов лошади (“MP Biomedicals”, США); ДАФ-2ДА (DAF-2DA, “Calbiochem”, Германия); нитропруссид натрия (“MP Biomedicals”, США), фтио (РТИО, 2-фенил-4,4,5,5-тетраметилимидазолин-1-оксил 3-оксид) (“Sigma”, США), аминогуанидин гидрохлорид (“Sigma”, США), L-аргинин, KNO<sub>3</sub> и NaNO<sub>2</sub> (“Реахим”, Россия).

Результаты исследований представлены в виде микрофотографий и графиков, отображающих зеленое свечение и его интенсивность в клетках, как средние арифметические из 3 независимых экспериментов, проведенных в трехкратной биологической повторности. Количество анализируемых срезов не менее 20 в каждой повторности. Достоверность различий средних значений оценивали по критерию Стьюдента. Статистическая обработка данных проведена с помощью пакета программ Microsoft Excel.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Влияние абиотических факторов на уровень NO в корнях проростков гороха.** Влияние нитропруссид натрия (НП-Na), KNO<sub>3</sub> (нитрат), NaNO<sub>2</sub> (нитрит) и L-аргинина на уровень NO в клетках корней оценивали по интенсивности флуоресценции в тканях. Результаты опытов представлены на рис. 1–5. Следует отметить, что свечение в наших опытах наблюдалось в поверхностных – эпидермальных клетках корня (рис. 1). Это свидетельствует о локализации синтеза NO в этих клетках. У животных организмов синтез NO обнаружен в эпителиальных клетках аорты [24]. Эпидермальные клетки листьев табака содержали NO в цитозоле, плазма-



**Рис. 1.** Влияние НП-Na (4 мМ), гемоглобина (ГГ, 4мкМ), ризобияльной инокуляции (РИ) и ФТИО (100 мкМ) на флуоресценцию в клетках корней гороха.

а – микрофотографии, б – интенсивность, % от контроля.

1 – контроль (вода); 2 – НП-Na (24 ч); 3 – НП-Na (24 ч) + ГГ (30 мин);

4 – НП-Na (24 ч) + РИ (30 мин); 5 – НП-Na (24 ч) + ФТИО (30 мин).

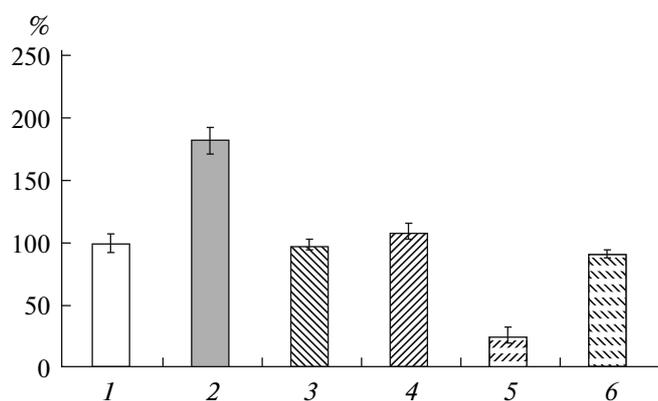
тической мембране, хлоропластах, пероксисомах, ядре [26].

При экспозиции двухсуточных неинокулированных ризобиями проростках гороха на указанных веществах в течение 24 ч выявлено следующее. НП-Na (экзогенный донор NO) в концентрации 4 мМ увеличивал флуоресценцию в клетках корня почти в 2.0 раза по сравнению с контролем (вода). Увеличение уровня NO под влиянием НП-Na ингибировалось гемоглобином

(4 мкМ), ризобияльной инокуляцией и флуоресценция в этом варианте почти полностью подавлялась 100 мкМ ФТИО (рис. 1).

В варианте с  $KNO_3$  (20 мМ) уровень NO в корне не изменялся через 24 ч по сравнению с контролем (рис. 2). Действие  $NaNO_2$  (2 мМ) через 24 ч способствовало увеличению уровня NO в корне в 2.3 раза, т.е. было аналогично действию НП-Na (рис. 3).

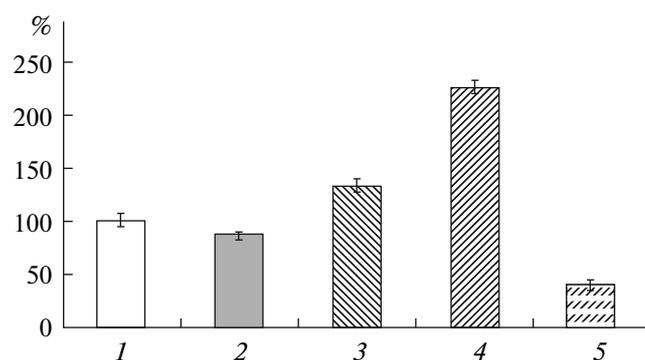
В краткосрочных опытах (30 и 60 мин) влияние нитратной и нитритной солей на уровень NO но-



**Рис. 2.** Влияние нитрата калия (20 мМ), ризобияльной инокуляции (РИ), ингибитора нитратредуктазы вольфрамата натрия (150 мкМ) на интенсивность флуоресценции в клетках корней гороха (% от контроля).

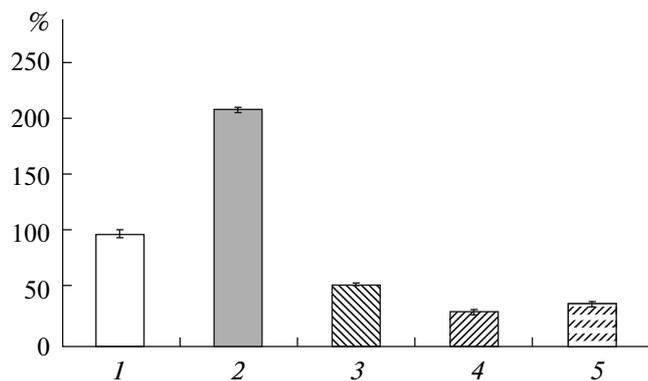
1 – контроль (вода); 2 – нитрат (30 мин); 3 – нитрат (60 мин); 4 – нитрат (24 ч); 5 – нитрат + РИ (30 мин);

6 – нитрат (30 мин) + вольфраMAT натрия (30 мин).

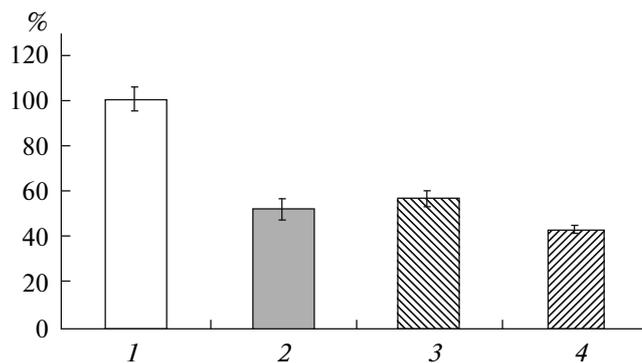


**Рис. 3.** Влияние нитрита натрия (2 мМ) и гемоглобина (ГГ, 4 мкМ) на интенсивность флуоресценции в клетках корней гороха (% от контроля).

1 – контроль (вода); 2 – нитрит (30 мин); 3 – нитрит (60 мин); 4 – нитрит (24 ч); 5 – нитрит (24 ч) + ГГ (30 мин).



**Рис. 4.** Влияние аргинина (2 мМ), аминокуанидина (АГ, 1 мМ); ФТИО (100 мкМ) на интенсивность флуоресценции в клетках корней гороха (% от контроля). 1 – контроль (вода); 2 – аргинин (30 мин); 3 – аргинин (30 мин) + АГ (30 мин); 4 – аргинин (30 мин) + ФТИО (30 мин); 5 – ФТИО (30 мин).



**Рис. 5.** Влияние гемоглобина (ГГ, 4 мкМ), ризобияльной инокуляции (РИ) и ФТИО (100 мкМ) на интенсивность флуоресценции в клетках корней гороха (% от контроля). 1 – контроль (вода); 2 – ГГ (30 мин); 3 – РИ (30 мин); 4 – ФТИО (30 мин).

сило другой характер по сравнению с экспозицией 24 ч. Так, при экспозиции 30 мин в варианте с  $\text{KNO}_3$  (20 мМ) наблюдалось увеличение уровня  $\text{NO}$  в корне в 1.8 раза, а через 60 мин – снижение до уровня контроля (рис. 2). Противоположная картина отмечалась в варианте с  $\text{NaNO}_2$ : через 30 мин происходило небольшое снижение уровня  $\text{NO}$  в корне по сравнению с контролем, через 60 мин – достоверное повышение (на 30%), а через 24 ч более чем двукратное увеличение  $\text{NO}$  (рис. 3).

Полученные результаты свидетельствуют о преходящем, временном характере регуляции уровня  $\text{NO}$  в корнях проростков гороха под влиянием азотных соединений. Причем эндогенный уровень  $\text{NO}$ , оцениваемый по интенсивности флуоресценции, зависел от вида экзогенного фактора. Так, если содержание эндогенного  $\text{NO}$  в корнях при воздействии на растения экзогенного НП-На определялось, очевидно, скоростью освобождения оксида азота из этого соединения в клетках, то в вариантах с нитратом и нитритом эндогенный уровень  $\text{NO}$  зависел, по-видимому, от скорости восстановления  $\text{NO}_3^-$  и  $\text{NO}_2^-$  или от их влияния на сигнальные пути, инициирующие синтез оксида азота с помощью других механизмов, например путем активации фермента, подобного  $\text{NO}$ -синтазе животных клеток.

В опытах с азотными солями ( $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NaNO}_2$ ) мы исходили из того, что минеральный азот в высоких дозах нарушает формирование и функционирование бобово-ризобияльного симбиоза. Одной из возможных причин этого может быть образование в клетках растения-хозяина  $\text{NO}$  за счет восстановления нитратов и нитритов с помощью нитрат- и нитритредуктаз [27]. Необходимо заметить, что нитратредуктаза, по-видимому, вовлекается в генерацию  $\text{NO}$  в корнях растений [28]. Об

этом свидетельствуют и наши данные о существенном уменьшении уровня  $\text{NO}$  (более чем в 2 раза) в корнях гороха под влиянием ингибитора нитратредуктазы – вольфрамата натрия (150 мкМ) (рис. 2). Но в то же время экспозиция двухсуточных проростков на 2 мМ растворе L-аргинина, являющегося субстратом животной  $\text{NO}$ -синтазы, увеличивала интенсивность флуоресценции в клетках более чем в 2 раза (рис. 4). Ингибитор животной  $\text{NO}$ -синтазы – аминокуанидин (1 мМ) снижал интенсивность свечения в этом варианте почти в 4 раза (рис. 4). Положительное действие аргинина на уровень  $\text{NO}$  не проявлялось на фоне ФТИО (рис. 4). Эти данные, очевидно, свидетельствуют о том, что этиолированные проростки гороха используют для генерации  $\text{NO}$  нитраты, нитриты и L-аргинин как субстраты ферментативных или других реакций.

**Влияние ризобияльной инокуляции на уровень  $\text{NO}$  в корнях.** Проростки гороха в варианте с водой (контроль), также имели свечение в клетках корня. Это говорит о том, что этиолированные проростки гороха синтезируют  $\text{NO}$  в эпидермальных клетках корня, создавая постоянное “ $\text{NO}$ -поле”, и оксид азота является нормальным продуктом метаболизма у растений, концентрация которого, как известно, может существенно увеличиваться при стрессовых воздействиях. Синтез  $\text{NO}$  в эпидермальных клетках табака наблюдали Фойсснер с соавт. [26] и уровень  $\text{NO}$  в их опытах увеличивался при действии на растения грибного элиситора. Однако возникает вопрос о механизме генерации  $\text{NO}$  в этом случае. По нашим данным, содержание свободного аргинина в корнях двухсуточных этиолированных проростков гороха высокое:  $109.2 \pm 16.1$  мкг/г сырого вещества ( $n = 5$ ). Поэтому можно предположить, что синтез оксида азота в этом случае происходит за счет использо-

вания L-аргинина как субстрата в NO-синтазной реакции. Это подтверждается результатами наших опытов с применением ингибитора животной NO-синтазы – аминогуанидина, который ингибировал реакцию образования NO (рис. 5). Подобные результаты были получены и другими авторами [29].

Инокуляция отрезков корней двухсуточных проростков суспензией клубеньковых бактерий снижала интенсивность свечения в контрольном варианте (H<sub>2</sub>O) в 1.9 раза (рис. 5). Такое же действие ризобиальной инокуляции проявилось и в вариантах с НП-Na и KNO<sub>3</sub>, где интенсивность свечения под влиянием инокуляции уменьшилась приблизительно в 4 раза (рис. 1, 2).

Следует отметить, что ингибирование синтеза активных форм кислорода (АФК), уменьшение содержания салициловой кислоты и снижение активности НАДФН-оксидазы растения-хозяина с помощью ризобиальной инокуляции или очищенного ризобиального Nod-фактора было установлено и в других работах [30–32]. Таким образом, инокуляция проростков ризобиями частично блокирует синтез NO, а также, вероятно, и других активных метаболитов в клетках корня, что может создать благоприятные физиологические условия для формирования бобово-ризобиального симбиоза, в том числе и за счет подавления защитных систем растения-хозяина. Однако механизмы, с помощью которых ризобии модулируют обмен веществ растения-хозяина, неизвестны. Предполагается, что ризобиальный Nod-фактор (липохитоолигосахарид) взаимодействует с растительным рецептором (возможно с рецептороподобными киназами) на плазматической мембране клетки, что ведет к начальным этапам бобово-ризобиального симбиоза [33], хотя не исключается участие и других механизмов взаимодействия молекул растения и ризобий, в частности связывание растительных лектинов с бактериальными полисахаридами [34].

Взаимодействие бактериальных и растительных молекул приводит к “запуску” сигнальных систем, инициирующих экспрессию соответствующих генов растения-хозяина, осуществляющих реализацию генетически запрограммированного механизма формирования бобово-ризобиального симбиоза. Подтверждением этому служат данные опытов [35], в которых липополисахарид, выделенный из симбиотической бактерии *Mesorhizobium loti*, индуцировал генерацию NO и экспрессию гена несимбиотического гемоглобина у *Lotus japonicus*. По данным Лохар с соавт. [36], уменьшение потока АФК в корнях люцерны через 1 ч после обработки проростков Nod-фактором сопровождалось снижением накопления транскриптов гомологов НАДФН-оксидазы корней люцерны. Этот факт авторы объясняют влиянием

Nod-фактора на активность АФК-генерирующей системы, что, по-видимому, способствует на ранних стадиях бобово-ризобиального симбиоза успешному взаимодействию симбионтов.

Что касается снижения под влиянием ризобиальной инокуляции уровня NO, обладающего в зависимости от концентрации сигнальными или токсическими свойствами, то можно предположить, что это происходит благодаря уменьшению функциональной активности ферментных систем, осуществляющих синтез NO, либо путем удаления свободного NO с помощью “ловушек” (скавенджеров) свободных радикалов или других реакций.

**Влияние ФТИО и гемоглобина на уровень оксида азота в клетках корня проростков гороха.** ФТИО (2-фенил-4,4,5,5-тетраметилимидазолин-1-оксил-3-оксид) не является биологическим соединением и его химическое действие в клетках основано на окислении NO до NO<sub>2</sub><sup>-</sup> [37]. Применение ФТИО в исследованиях *in vitro* и *in vivo* обусловлено необходимостью доказать присутствие NO в клетках организмов и устранения биологической активности этого соединения. Как следует из наших данных, ФТИО в концентрации 100 мкМ в существенной степени уменьшает флуоресценцию эпидермальных клеток корней этиолированных проростков гороха (рис. 1, 4, 5).

Другим эффективным скавенджером NO является гемоглобин [38]. Как следует из рис. 1, гемоглобин (4 мкМ) снижал интенсивность свечения в варианте с НП-Na более чем в 2 раза. В варианте с NaNO<sub>2</sub> (рис. 3) уровень NO (вариант 24 ч) под влиянием гемоглобина снизился в 6 раз. Таким образом, гемоглобин вызывает эффекты, сходные с действием ризобиальной инфекции и ФТИО.

Механизм связывания NO гемоглобином состоит в его взаимодействии с гемом гемоглобина с образованием нитрозилгемоглобина [39]. Вопрос в том, какой механизм его действия в клетках растений. По данным Нагата с соавт. [35], ризобии (*Mesorhizobium loti*) индуцировали синтез NO в корнях бобового растения *Lotus japonicus* на начальных стадиях ризобиальной инфекции. Однако усиление синтеза NO носило преходящий характер и было связано с экспрессией гена несимбиотического гемоглобина (*LjHb1*) у *Lotus japonicus*. Авторы предполагают, что функция гена *LjHb1* заключается в регуляции уровня NO в клетках растения-хозяина в процессе симбиоза. Наши данные о том, что инокуляция на начальных этапах инфицирования снижала уровень NO в клетках корня, свидетельствует о возможном участии в этом процессе несимбиотического гемоглобина. Однако это предположение требует экспериментальных доказательств.

Что касается влияния экзогенного гемоглобина на уровень NO в клетках корней проростков гороха на фоне действия различных абиотических факторов, то механизм, по-видимому, тот же, что и при действии ризобияльной инокуляции. По данным литературы, трансгенные растения табака и люцерны с повышенным синтезом несимбиотического гемоглобина класса I обладали меньшей чувствительностью к нитрозативному стрессу, вызываемому в клетках действием экзогенных доноров оксида азота, по сравнению с нормальными (дикими) формами растений [38, 40]. Предполагается, что в растениях несимбиотические формы гемоглобина могут выполнять защитную роль против нитрозативного стресса и модулировать сигнальную функцию NO [41].

В наших опытах инокуляция растений ризобиями снимала активирующее влияние высокой дозы минерального азота на активность НАДФН-оксидазы — основного фермента АФК-генерирующей системы растений и животных [32]. Ингибирующее влияние ризобий на генерацию NO и АФК свидетельствует о связи механизмов синтеза этих соединений, опосредованных влиянием метаболических систем, регулирующих формирование бобово-ризобияльного симбиоза.

По данным литературы, синтез АФК в ответ на многие экзогенные “раздражители” сопровождается также синтезом NO [39, 42], и их сигнальное действие может оказывать влияние на многие процессы, например при реализации организмом “программированной клеточной смерти” [43]. Взаимодействие  $H_2O_2$  и NO может идти по пути активации протеинкиназ, изменения концентрации внутриклеточного кальция, активности ионных каналов и др. [5, 44]. Однако полной картины взаимодействия АФК и активных форм азота (АФА), в частности  $H_2O_2$  и NO, в клетках растений нет.

Изучение взаимодействия АФК и АФА при бобово-ризобияльном симбиозе представляет особый интерес, так как, в отличие от патогенеза, усилия растения-хозяина направлены на облегчение проникновения клубеньковых бактерий в клетки и формирования симбиоза. Однако в зависимости от вида биотических и абиотических неблагоприятных стрессовых факторов, взаимодействие сигнальных путей при формировании бобово-ризобияльного симбиоза может быть различным, что, по-видимому, и определяет успех или неуспех в формировании симбиоза. В этом ряду находится такой экзогенный фактор, как высокие дозы минерального азота, оказывающие отрицательное влияние на формирование и функционирование бобово-ризобияльного симбиоза [27]. В этой связи представляет интерес возможная активация под влиянием ризобияльной инфекции анионных каналов плазматической мембраны и, как следствие этого, усиление пото-

ка внутриклеточных нитратов, могущих влиять на активность НАДФН-оксидазы, генерацию NO и другие процессы, связанные с регуляцией физиологических функций у растений [44].

Активация под воздействием грибного элиситора (cryptogin) анионных каналов в плазматической мембране суспензионных клеток табака усиливает поток нитратов через анионные каналы в цитоплазму, что оказывает влияние на экспрессию генов защиты, генерацию АФК, модуляцию активности протеинкиназ, на сверхчувствительную реакцию клеток и их гибель при патогенезе [45]. Эти процессы блокируются ингибиторами ионных каналов. В этой связи активация под действием ризобияльной инокуляции поглощения нитратов этиолированными проростками гороха [46] свидетельствует о сходстве действия патогена и симбионта и о возможном влиянии нитратов на сигнальные пути, задействованные в бобово-ризобияльном симбиозе.

О влиянии минерального азота на взаимодействие патогенного гриба и растения свидетельствуют также результаты других исследователей [47]. По их данным, аммоний ( $NH_4^+$ ), секретируемый патогенным грибом *Colletotrichum coccodes*, активирует растительную НАДФН-оксидазу, что вызывает накопление АФК и гибель клеток плодов томата. В связи с этим интересна гипотеза о возможном влиянии NO на потоки экстра- и внутриклеточного  $Ca^{2+}$ , который оказывает влияние на активность НАДФН-оксидазы. Суть этой гипотезы в том, что NO может повышать или ингибировать индуцированный действием стрессовых факторов поток  $Ca^{2+}$  в цитоплазму путем изменения проницаемости кальциевых каналов с участием сигнальных белков, подвергшихся посттрансляционной модификации оксидом азота [19]. Этот механизм регуляции потоков  $Ca^{2+}$  на плазматической мембране с участием NO может быть применен для объяснения механизмов функциональной активности НАДФН-оксидазы, в частности при симбиотических взаимодействиях организмов, когда чрезмерное накопление АФК может препятствовать установлению симбиоза между бобовым растением и клубеньковыми бактериями [30].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Реутов В.П. // Биохимия. 2000. Т. 65. № 4. С. 485–503.
2. Проскураков С.Я., Конопляников А.Г., Иванников А.И., Скворцов В.Г. // Успехи соврем. биологии. 1999. Т. 119. № 4. С. 380–395.
3. Parani M.P., Myers R., Weirich H., Smith B., Leaman D.W., Goldman S.I. // Plant Biotechnol. J. 2004. V. 2. № 4. P. 359–366.

4. Глянько А.К., Митанова Н.Б., Степанов А.В. // Журнал стресс-физиологии и биохимии. 2009. Т. 5. № 3. С. 34–52.
5. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. // Вестник Харьковск. нац. аграрн. ун-та. Серия Биология. 2009. Вып. 3 (18). С. 6–19.
6. Красиленко Ю.А., Емец А.И., Блюм Я.Б. // Физиология растений. 2010. Т. 57. № 4. С. 483–494.
7. Anderson L., Mansfield T.A. // Environ. Pollution. 1979. V. 20. № 2. P. 113–121.
8. Klepper L.A. // Atmospheric Environ. 1979. V. 13. № 4. P. 537.
9. Wildt J., Kley D., Rockel A., Rockel P., Segschneider H.J. // J. Geophys. Res. 1997. V. 102. № D5. P. 5919–5927.
10. Rockel P., Strube F., Rockel A., Wild J., Kaizer W.M. // J. Exp. Bot. 2002. V. 53. № 366. P. 103–110.
11. Mur L.A.J., Carver T.L.W., Prats E. // J. Exp. Bot. 2006. V. 57. № 3. P. 489–505.
12. Zumft W.G. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1997. V. 61. № 4. P. 533–616.
13. Дубовская Л.В., Колеснева Е.В., Князев Д.М., Вологовский И.Д. // Физиология растений. 2007. Т. 54. № 6. С. 847–855.
14. Van der Vliet A., Eiserich J.P., Kaur H., Cross C.E., Halliwell B. // Methods in Enzymology. 1996. V. 269. P. 175–184.
15. Klatt P., Lamas S. // Eur. J. Biochem., 2000. V. 267. № 16. P. 4928–4944.
16. Valderrama R., Corpas F.J., Carreras A., Fernandez-Ocana A., Chaki M., Luque L., Gomez-Rodriguez M.V., Colmenero-Varea P., del Rio L.A., Barroso J.B. // FEBS Lett. 2007. V. 581. № 3. P. 453–461.
17. Grun S., Lindermayr S., Durner J. // J. Exp. Bot. 2006. V. 57. № 3. P. 507–516.
18. Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений / Ред. А.Н. Гречкин. М.: Наука, 2002. 295 с.
19. Besson-Bard A., Pugin A., Wendehenne D. // Annu. Rev. Plant Biol. 2008. V. 59. P. 21–39.
20. Flores T., Todd C.D., Tovar-Mendez A., Dhanoa P.K., Corra-Aragunde N., Hoyos M.E., Brownfield D.M., Mullen R.T., Lamattina L., Polacco J.C. // Plant Physiol. 2008. V. 147. № 4. P. 1936–1948.
21. Bethke P.C., Badger M.P., Jones R.L. // Plant Cell. 2004. V. 16. № 2. P. 332–341.
22. Глянько А.К., Васильева Г.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 1. С. 21–28.
23. Глянько А.К., Митанова Н.Б., Макарова Л.Е., Васильева Г.Г. // Сельскохозяйств. биология. 2009. № 1. С. 83–88.
24. Nakatsubo N., Kojima H., Kikuchi K., Nagoshib H., Hiratab Y., Maeda D., Imaia Y., Irimura T., Nagano T. // FEBS Lett. 1998. V. 427. № 2. P. 263–266.
25. Gould K.S., Lamotte O., Klinguer A., Pugin A., Wendehenne D. // Plant Cell Environ. 2003. V. 26. № 11. P. 1851–1862.
26. Foissner I., Wendehenne D., Langebartels C., Durner J. // Plant J. 2000. V. 23. № 6. P. 817–824.
27. Глянько А.К., Васильева Г.Г., Митанова Н.Б., Ищенко А.А. // Изв. РАН. Сер. биол. 2009. Т. 36. № 3. С. 302–312.
28. Yamasaki H., Sakihama Y. // FEBS Lett. 2000. V. 468. № 1. P. 89–92.
29. Xu J., Yin H., Li Y., Liu X. // Plant Physiol. 2010. V. 154. № 3. P. 1319–1334.
30. Shaw S.L., Long S.R. // Plant Physiol. 2003. V. 132. № 4. P. 2196–2204.
31. Глянько А.К., Макарова Л.Е., Васильева Г.Г., Миронова Н.В. // Изв. РАН. Сер. биол. 2005. Т. 32. № 3. С. 300–305.
32. Глянько А.К., Васильева Г.Г., Ищенко А.А., Миронова Н.В., Алексеенко А.Л. // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 4. С. 479–485.
33. Limpens E., Franken C., Smit P., Willemse J., Bisseling T., Geurts R. // Science. 2003. V. 302. № 5645. P. 630–633.
34. Downie J.A. // FEMS Microbiol. Rev. 2010. V. 34. № 2. P. 150–170.
35. Nagata M., Hashimoto M., Murakami E., Shimoda Y., Shimoda-Sasakura F., Kucho K., Suzuki A., Abe M., Higashi S., Uchiumi T. // Plant Signal. Behavior. 2009. V. 4. № 3. P. 202–204.
36. Lohar D.P., Haridas S., Gantt J.S., Vandenbosch K.A. // New Phytol. 2007. V. 173. № 1. P. 39–49.
37. Maeda H., Akaike T., Yoshida M., Suga M. // J. Leukocyte Biol. 1994. V. 56. № 5. P. 588–592.
38. Dordas C., Rivoal J., Hill R.D. // Ann. Bot. 2003. V. 91. № 2. P. 173–178.
39. Neill S.J., Bright J., Desikan R., Hancock J., Harrison J., Wilson I. // J. Exp. Bot. 2008. V. 59. № 1. P. 25–35.
40. Seregelyes C., Igamberdiev A.U., Maassen A., Maassen A., Hennig J., Dudits D., Hill R.D. // FEBS Lett. 2004. V. 571. № 1. P. 61–66.
41. Perazzolli M., Romero-Puertas M.C., Delledonne M. // J. Exp. Bot. 2006. V. 57. № 3. P. 479–488.
42. Neill S.J., Desikan R., Clarke A., Hurst R.D., Hancock J.T. // J. Exp. Bot. 2002. V. 53. № 372. P. 1237–1242.
43. Delledonne M., Zeier J., Marocco A., Lamb C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. № 23. P. 13454–13459.
44. Elmayan T., Simon-Plas F. // Plant Signal. Behavior. 2007. V. 2. № 6. P. 505–507.
45. Wendehenne D., Lamotte O., Frachisse J.M., Barbier-Brygoo H., Pugin A. // Plant Cell. 2002. V. 14. № 8. P. 1937–1951.
46. Митанова Н.Б., Миронова Н.В., Глянько А.К. // Агробиохимия. 2006. № 1. С. 32–33.
47. Alkan N., Davydov O., Sagi M., Fluhr R., Prusky D. // Mol. Plant-Microbe Interact. 2009. V. 22. № 12. P. 1484–1491.

## Influence of Environmental Factors on the Generation of Nitric Oxide in the Roots of Etiolated Pea Seedlings

A. K. Glyan'ko, N. B. Mitanova, and A. V. Stepanov

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 644033 Russia*

*e-mail: akglyanko@sifibr.irk.ru*

Received January 12, 2011

**Abstract**—The article studies the nitric oxide (NO) levels in the roots of etiolated seedlings of garden peas (*Pisum sativum* L.) using the DAF-2DA fluorescent probe and fluorescent microscopy. Cross sections of roots of 100–150  $\mu\text{m}$  (the site of a root which is 10–15 mm from the apex) are analyzed. It is shown that the level of NO in the roots after 24 h increased by more than a factor of 2 in the versions with  $\text{NaNO}_2$  and sodium nitroprusside. At feeding the seedlings with  $\text{KNO}_3$ , a peak in the accumulation of NO in the roots (twofold increase) was observed after 30 min. Fertilizing seedlings with L-arginine (2 mM) increased the intensity of the fluorescence of the root sections by more than a factor of 2. The inoculation of seedlings of rhizobia (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*) contributed to the reduction of NO on the background of the control ( $\text{H}_2\text{O}$ ) and sodium nitroprusside and nitrogen compounds. Scavengers of NO (2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide (PTIO), hemoglobin) and inhibitors of nitrate reductase and animal NO synthase (sodium tungstate and aminoguanidine hydrochloride) reduced the level of NO in the roots. The results are discussed in relation to the role of NO in plants under the influence of biotic and abiotic factors.