

Ю.В. КАРПЕЦ<sup>1</sup>, Ю.Е. КОЛУПАЕВ<sup>1</sup>,  
Т.О. ЯСТРЕБ<sup>1</sup>, А.П. ДМИТРИЕВ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева  
E-mail: plant\_biology@mail.ru

<sup>2</sup> Институт клеточной биологии и генетической инженерии  
НАН Украины, Киев  
E-mail: dmyt@voliacable.com

## ВОЗМОЖНЫЕ ПУТИ ИНДУЦИРОВАНИЯ ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТИ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК ЭКЗОГЕННЫМ ОКСИДОМ АЗОТА



*Изучали механизмы влияния экзогенного оксида азота (NO) на теплоустойчивость coleoptилей пшеницы. Обработка растительных клеток донором оксида азота (нитропруссидом натрия) вызывала усиление генерации супероксидного анион-радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ) уже через 10 мин. Ингибитор биосинтеза белка циклогексимид не подавлял вызываемое донором NO усиление продуцирования  $O_2^{\cdot-}$  coleoptилями, а ингибитор образования фосфатидной кислоты бутанол-1 частично его нивелировал. Обработка coleoptилей кальциевым ионофором A23187 или активатором инозитольного цикла инозитолом компенсировала негативное действие бутанола-1 на образование  $O_2^{\cdot-}$ . Бутанол-1 нивелировал также повышение теплоустойчивости coleoptилей, вызываемое донором NO, тогда как кальциевый ионофор и инозитол почти полностью снимали такое действие бутанола-1. Обсуждаются возможные механизмы участия активных форм кислорода, фосфатидной кислоты и ионов кальция в реализации физиологических эффектов NO.*

© Ю.В. КАРПЕЦ, Ю.Е. КОЛУПАЕВ, Т.О. ЯСТРЕБ,  
А.П. ДМИТРИЕВ, 2012

**Введение.** Ионы кальция, активные формы кислорода (АФК) и оксид азота (NO) являются важными компонентами внутриклеточной сигнализации. В частности, они участвуют в трансдукции сигнала к факторам регуляции транскрипции для последующей активации защитных реакций клетки в ответ на действие биотических и абиотических стрессоров [1–3].

Роль оксида азота в формировании адаптивных реакций растений на абиотические стрессоры (в особенности на гипертермию) менее исследована по сравнению с АФК и ионами кальция. Лишь в отдельных работах сообщалось об увеличении содержания эндогенного NO в клетках растений в ответ на действие высоких температур [3] и о повышении теплоустойчивости растений под влиянием экзогенного оксида азота [4, 5].

Известно, что биологическая активность NO может реализовываться во взаимодействии с различными сигнальными мессенджерами, в частности, с ионами кальция, фосфатидной кислотой и АФК [6, 7]. Имеются сведения, что NO участвует в регуляции кальциевого гомеостаза в клетках растений по разным механизмам [7–9]. Один из них связан с накоплением цАДФ-рибозы, стимулирующей открывание внутриклеточных кальциевых каналов. Увеличение содержания цАДФ-рибозы происходит вследствие активации АДФ-рибозилциклазы под влиянием цГМФ — продукта, накапливающегося в результате активации оксидом азота гуанилатциклазы, которую считают одной из основных мишеней NO как сигнальной молекулы [10]. Возможно также прямое ферментативное влияние оксида азота на состояние кальциевых каналов. Оно связано с S-нитрозилированием белков кальциевых каналов, что приводит к их открыванию [7]. По-видимому, за счет этих механизмов и реализуется связь между NO-синтазной и кальциевой сигнальными системами.

Под действием NO может активироваться и фосфатидатная сигнальная система. Известна его способность повышать активность фосфолипазы D (ФЛД), что обуславливает увеличение содержания фосфатидной кислоты (ФК) — важного вторичного мессенджера липидного сигналинга [11]. Кроме того, оксид азота может оказывать влияние на фосфо-

липазу С и диацилглицеролкиназу, что также вызывает накопление ФК [12]. В растительных клетках ФК может функционировать как кальциевый ионофор [13] и способствовать поступлению кальция в цитозоль. Таким образом, возможен и третий механизм влияния оксида азота на содержание кальция в цитозоле – через усиление накопления ФК.

Есть основания полагать, что многие эффекты NO реализуются во взаимодействии с АФК. Так, в культуре тканей корней женьшеня донор NO вызывал активацию НАДФН-оксидазы и усиление генерации супероксидного анион-радикала [14]. Известно, что НАДФН-оксидаза относится к ферментам, которые регулируются  $Ca^{2+}$  [15]. Имеются данные и о влиянии ФК на активность НАДФН-оксидазы. В системе *in vitro* ФК стабилизирует НАДФН-оксидазный комплекс мембранной фракции, выделенной из растительных клеток, и тем самым усиливает генерацию АФК [16]. Установлено участие ФК в усилении продуцирования АФК растительными клетками в условиях холодового стресса [17]. При этом остается неясным, может ли ФК *in vivo* самостоятельно регулировать активность НАДФН-оксидазы или же ее эффекты опосредованы влиянием на кальциевый баланс в клетках.

Ранее нами было показано, что повышение теплоустойчивости coleoptилей пшеницы донором NO нитропруссидом натрия (НПН) сопровождается усилением генерации  $O_2^{\cdot-}$ . Эти эффекты нивелировались ингибиторами НАДФН-оксидазы имидазолом и  $\alpha$ -нафтолом [18]. Можно предполагать, что зависимое от НАДФН-оксидазы усиление генерации АФК является ключевым эффектом в процессе повышения теплоустойчивости coleoptилей пшеницы под влиянием экзогенного NO.

Цель настоящей работы – выяснение возможного участия ионов кальция и ФК в реализации действия экзогенного NO на генерацию АФК растительными клетками и их теплоустойчивость.

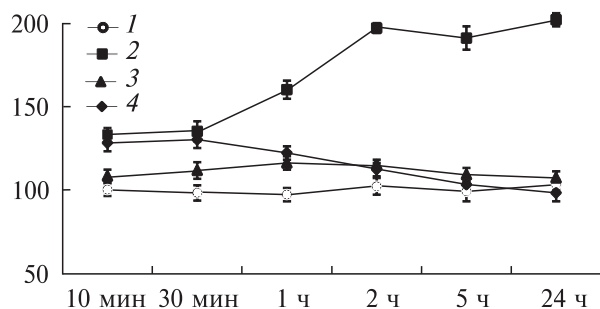
**Материалы и методы.** В работе использовали отрезки coleoptилей, отделенные от четырехдневных этиолированных проростков

пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Элегия, которые выращивали при температуре 20 °С. Coleoptили пшеницы являются адекватной моделью для исследования действия экзогенных соединений на устойчивость растений, которая определяется преимущественно клеточными механизмами [19].

Средой инкубации coleoptилей контрольного варианта служила 2%-ная сахароза с добавлением натриевой соли пенициллина (100 000 ед./л). Обработку coleoptилей донором оксида азота НПН (500 мкМ) проводили в течение 24 ч внесением его в среду инкубации. В соответствующих вариантах опыта coleoptили обрабатывали в течение 26 ч 0,2%-ным бутанолом-1, ингибитором зависимого от ФЛД образования ФК, либо 0,2%-ным бутанолом-2, его неактивным аналогом [11]. В вариантах с комбинированной обработкой coleoptилей НПН и бутанолом-1 или бутанолом-2 соответствующие спирты вносили в среду инкубации coleoptилей за 2 ч до добавления НПН. На среде, содержащей кальциевый ионофор А23187 (1 мкМ) или активатор инозитольного цикла инозитол (5 мМ) [20], coleoptили инкубировали 24 ч. При исследовании комбинированного действия НПН с ионофором либо инозитолом эти соединения добавляли в среду инкубации coleoptилей одновременно с НПН. Для выяснения роли синтеза белка в усилении АФК-генерирующей способности coleoptилей, вызываемой оксидом азота, отрезки обрабатывали ингибитором синтеза белка циклогексимином (ЦГ) в конечной концентрации 10 мкМ. ЦГ вносили в среду инкубации coleoptилей за 2 ч до добавления в нее НПН. Концентрации исследуемых соединений были выбраны по результатам предварительных опытов.

Интенсивность генерации супероксидного анион-радикала оценивали по восстановлению нитросинего тетразолия [19].

После инкубации в растворах исследуемых соединений coleoptили подвергали повреждающему прогреву в ультратермостате при температуре 44 °С. Затем отрезки в течение 2 сут продолжали инкубировать на 2%-ной сахарозе с добавлением пенициллина, после чего оценивали их выживание [18].



**Рис. 1.** Динамика генерации супероксидного анион-радикала колеоптилями пшеницы (% от контроля в начале эксперимента): 1 – контроль; 2 – НПН (500 мкМ); 3 – кальциевый ионофор А23187 (1 мкМ); 4 – инозитол (5 мМ)

На рисунках и в таблице приведены средние значения трех независимых экспериментов, каждый из которых был проведен в трехкратной повторности, и их стандартные отклонения.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Под влиянием донора оксида азота НПН происходило значительное усиление генерации супероксидного анион-радикала колеоптилями пшеницы. Такой эффект был достоверным уже через 10 мин и усиливался в течение первых двух часов от начала обработки отрезков НПН, после чего стабилизировался и сохранялся на протяжении 24 ч (рис. 1).

При обработке колеоптилей кальциевым ионофором А23187 относительно небольшое усиление генерации  $O_2^{\cdot-}$  наблюдали через 1–2 ч после начала его воздействия. Под влиянием активатора инозитольного цикла инозитола повышение образования  $O_2^{\cdot-}$  было более заметным и наблюдалось уже через 10 мин после начала обработки, однако ко 2-му часу наблюдений этот показатель снижался до уровня контроля (рис. 1). Таким образом, эффекты ионофора А23187, способствующего поступлению кальция в цитозоль, и инозитола, индуцирующего инозитольный цикл и тем самым повышающего концентрацию ионов  $Ca^{2+}$  в цитозоле за счет их выхода из внутриклеточных депо (вакуоли, эндоплазматического ретикула, митохондрий) [21], имеют значительное сходство.

Усиление генерации АФК, вызываемое донором NO, не угнеталось ингибитором

биосинтеза белка ЦГ (таблица), что позволяет предполагать независимую от работы белоксинтезирующего аппарата активацию фермента(ов), генерирующего(их) супероксидный анион-радикал. При этом сам по себе ЦГ не оказывал достоверного влияния на АФК-генерирующую активность клеток колеоптилей.

Как установлено ранее, основным АФК-генерирующим ферментом клеточной поверхности колеоптилей пшеницы, активность которого повышается под влиянием экзогенного NO, является НАДФН-оксидаза. В литературе имеются сведения о зависимости активности НАДФН-оксидазы от кальциевого гомеостаза клеток и возможности прямой активации фермента ионами кальция [22]. Ранее нами было показано угнетение NO-индуцируемой генерации АФК в колеоптилях пшеницы под влиянием блокатора кальциевых каналов хлорида лантана [23]. Можно предполагать, что вызываемое NO усиление поступления кальция в цитозоль приводит к повышению активности уже существующих молекул НАДФН-оксидазы.

Вместе с тем известно, что NO обладает способностью вызывать накопление ФК в растительных клетках, которая также может влиять на активность НАДФН-оксидазы. Имеющиеся в литературе данные позволяют предполагать как прямое [16], так и опосредованное кальцием и связанное с ионофорными свойствами [13] влияние ФК на активность НАДФН-оксидазы. Один из путей усиления образования ФК в растительных клетках под влиянием NO может быть обусловлен активацией ФЛД. Образование ФК с участием этого фермента ингибируется бутанолом-1 [11].

В наших экспериментах обработка колеоптилей антагонистом ФЛД-зависимого образования ФК бутанолом-1 не оказывала существенного влияния на генерацию супероксидного анион-радикала. Бутанол-1 также не влиял на индуцируемую донором NO активацию образования  $O_2^{\cdot-}$  колеоптилями на начальной стадии эксперимента (через 10 мин после обработки НПН). Однако уже через 2 ч бутанол-1 приблизительно на 60 % снижал эффект усиления генерации

$O_2^{\cdot-}$ , вызываемый экзогенным оксидом азота (таблица). Бутанол-2, неактивный в отношении ингибирования образования ФК в растительных клетках, не оказывал достоверного влияния на образование супероксидного анион-радикала колеоптилями и практически не изменял эффект донора NO. Таким образом, есть основания полагать, что стимулируемая донором оксида азота генерация  $O_2^{\cdot-}$  зависит от образования ФК, происходящего с участием ФЛД. Полученные данные, однако, не позволяют говорить о конкретном механизме влияния ФК на активность НАДФН-оксидазы. Он может быть прямым или косвенным, в частности, опосредованным ионами кальция.

Для выяснения участия кальция в NO-индуцированной генерации АФК колеоптили обрабатывали кальциевым ионофором А23187 и активатором инозитольного цикла инозитолом.

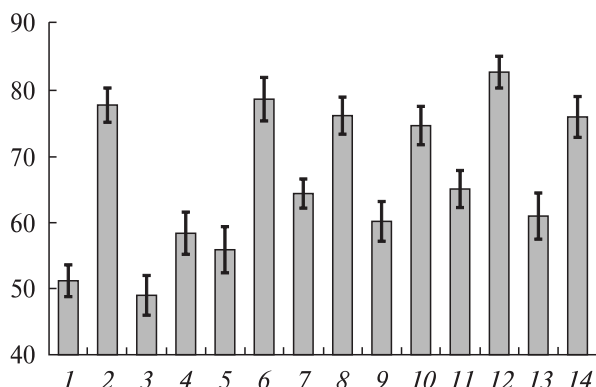
Кальциевый ионофор А23187 при действии на колеоптили в комбинации с НПП частично нивелировал усиление образования  $O_2^{\cdot-}$ , вызываемое донором NO (таблица). Особенно заметно такой эффект проявлялся через 24 ч после начала инкубации. Вероят-

ной причиной этого могло быть избыточное накопление кальция, связанное с одновременным его поступлением при помощи ионофора и влиянием оксида азота на потоки экстра- и внутриклеточного  $Ca^{2+}$  [7]. Известно, что избыток кальция может ингибировать взаимодействие цитозольной и мембранной субъединиц НАДФН-оксидазы и тем самым снижать ее активность [24].

В варианте с комбинированным действием ионофора А23187 и бутанола-1 уровень генерации супероксидного анион-радикала колеоптилями достоверно не отличался от контрольного. Иным оказалось влияние кальциевого ионофора на генерацию  $O_2^{\cdot-}$  при обработке им колеоптилей в комбинации с донором NO и ингибитором образования ФК бутанолом-1. В этом случае добавление ионофора в значительной степени компенсировало снятие NO-зависимого усиления генерации  $O_2^{\cdot-}$ , вызываемое бутанолом-1 (таблица). Такой эффект косвенно указывает на то, что угнетение образования ФК, происходящее под влиянием бутанола-1, может вызывать нарушение кальциевого гомеостаза, отражающееся на процессе активации НАДФН-оксидазы оксидом азота. Не исключено, что

Генерация супероксидного анион-радикала колеоптилями пшеницы при обработке эффекторами, % от контроля

Вариант	Время от момента введения НПП		
	10 мин	2 ч	24 ч
Контроль	100,0 ± 3,8	100,0 ± 2,9	98,5 ± 2,2
НПП (0,5 мМ)	133,0 ± 4,0	197,1 ± 3,2	201,5 ± 3,8
ЦГ (10 мкМ)	85,8 ± 6,4	103,0 ± 4,1	108,1 ± 5,5
НПП (0,5 мМ) + ЦГ (10 мкМ)	110,7 ± 3,9	165,0 ± 3,8	175,0 ± 4,1
Бутанол-1 (0,2 %)	98,3 ± 3,3	102,6 ± 3,9	96,4 ± 3,3
НПП (0,5 мМ) + бутанол-1 (0,2 %)	134,0 ± 4,9	138,5 ± 4,2	133,3 ± 3,9
Бутанол-2 (0,2 %)	102,0 ± 3,9	105,1 ± 2,7	110,2 ± 3,9
НПП (0,5 мМ) + бутанол-2 (0,2 %)	135,8 ± 4,1	183,6 ± 5,1	180,8 ± 4,8
А23187 (1 мкМ)	107,9 ± 3,6	114,9 ± 3,4	106,7 ± 3,8
НПП (0,5 мМ) + А23187 (1 мкМ)	134,1 ± 2,9	181,0 ± 3,1	169,2 ± 4,1
Бутанол-1 (0,2 %) + А23187 (1 мкМ)	98,4 ± 3,2	107,7 ± 3,3	88,2 ± 4,4
НПП (0,5 мМ) + бутанол-1 (0,2 %) + А23187 (1 мкМ)	129,8 ± 4,0	180,5 ± 4,5	177,4 ± 3,6
Инозитол (5 мМ)	128,0 ± 5,1	112,2 ± 4,3	97,5 ± 4,7
НПП (0,5 мМ) + инозитол (5 мМ)	133,8 ± 4,4	199,3 ± 6,0	206,7 ± 3,8
Бутанол-1 (0,2 %) + инозитол (5 мМ)	113,2 ± 4,2	117,0 ± 5,6	94,3 ± 3,7
НПП (0,5 мМ) + бутанол-1 (0,2 %) + инозитол (5 мМ)	149,1 ± 5,3	185,8 ± 5,1	187,2 ± 6,1



**Рис. 2.** Выживаемость (%) coleoptилей пшеницы после повреждающего прогрева (44 °С, 10 мин): 1 – контроль; 2 – НПН (500 мкМ); 3 – бутанол-1 (0,2 %); 4 – НПН (500 мкМ) + бутанол-1 (0,2 %); 5 – бутанол-2 (0,2 %); 6 – НПН (500 мкМ) + бутанол-2 (0,2 %); 7 – А23187 (1 мкМ); 8 – НПН (500 мкМ) + А23187 (1 мкМ); 9 – бутанол-1 (0,2 %) + А23187 (1 мкМ); 10 – НПН (500 мкМ) + бутанол-1 (0,2 %) + А23187 (1 мкМ); 11 – инозитол (5 мМ); 12 – НПН (500 мкМ) + инозитол (5 мМ); 13 – бутанол-1 (0,2 %) + инозитол (5 мМ); 14 – НПН (500 мкМ) + бутанол-1 (0,2 %) + инозитол (5 мМ)

в данном случае ионофор, усиливая поступление кальция, компенсировал недостаток ФК, которая может проявлять свою физиологическую активность, в том числе и благодаря свойству кальциевого ионофора [13].

Обработка coleoptилей НПН в сочетании с активатором инозитольного цикла инозитолом, который может способствовать усилению поступления кальция в цитозоль, существенно не влияла на проявление эффектов донора оксида азота на генерацию АФК (таблица). В варианте с комбинированной обработкой coleoptилей инозитолом и бутанолом-1 на начальной стадии наблюдений генерация супероксидного анион-радикала была несколько выше, чем в контроле, а через 24 ч уже достоверно не отличалась от контроля.

При комбинированной обработке coleoptилей НПН, бутанолом-1 и инозитолом последний компенсировал угнетение NO-зависимого усиления образования  $O_2^{\cdot-}$ , вызываемое ингибитором синтеза ФК. В этом отношении влияние инозитола было идентичным действию кальциевого ионофора. Оба агента, усиливающие поступление кальция в цитозоль, существенно снижали ингибиру-

ющее действие бутанола-1 на NO-индуцируемую генерацию супероксидного анион-радикала. Это указывает на участие как ФК, так и ионов кальция в регуляции активности НАДФН-оксидазы. Возможно, влияние ФК на активность НАДФН-оксидазы опосредовано кальцием, поступление которого усиливается в связи с ионофорным эффектом ФК.

Однако полученные результаты не являются однозначным доказательством того, что индуцированное оксидом азота усиление генерации  $O_2^{\cdot-}$  у пшеницы связано именно с влиянием ФК на кальциевый гомеостаз клеток. Так, в системе *in vitro* показана возможность прямого влияния ФК на активность НАДФН-оксидазы [16]. Нельзя исключить, что ФК и ионы кальция влияют на активность НАДФН-оксидазы независимо друг от друга. В этом случае введение в среду инкубации coleoptилей ионофора или активатора инозитольного цикла и усиление поступления ионов кальция в цитозоль могло частично компенсировать отсутствие активации НАДФН-оксидазы ФК, обусловленное действием бутанола-1.

Как было показано ранее, снятие вызываемого донором оксида азота усиления генерации АФК путем обработки coleoptилей антиоксидантом ионолом [23] или ингибиторами НАДФН-оксидазы [18] приводило к снижению уровня индуцирования теплоустойчивости пшеницы донором NO. С учетом зависимости активности НАДФН-оксидазы от ФК и ионов кальция изучали влияние антагониста образования ФК бутанола-1, кальциевого ионофора, активатора инозитольного цикла, а также их комбинаций с донором оксида азота на устойчивость растительных клеток к тепловому стрессу.

Обработка coleoptилей НПН заметно увеличивала процент их выживания после повреждающего прогрева (рис. 2). Бутанол-1 заметно не влиял на устойчивость coleoptилей к прогреву, но в то же время существенно угнетал повышение теплоустойчивости coleoptилей, вызываемое донором NO. Его неактивный аналог бутанол-2 не вызывал изменения теплоустойчивости coleoptилей пшеницы и не влиял на ее индуцирование донором NO.

Кальциевый ионофор A23187 и инозитол сами по себе незначительно, но достоверно, повышали теплоустойчивость coleoptилей пшеницы (рис. 2). В варианте с обработкой coleoptилей кальциевым ионофором в сочетании с НПН аддитивности или антагонизма эффектов не наблюдали. При комбинированной обработке coleoptилей НПН и инозитолом их выживаемость после повреждающего прогрева была несколько выше по сравнению с вариантом обработки только донором NO, однако такое увеличение оказалось недостоверным при  $p \leq 0,05$ .

Бутанол-1 не снимал положительного влияния кальциевого ионофора и инозитола на теплоустойчивость coleoptилей пшеницы (рис. 2). Можно полагать, что индуцирование теплоустойчивости coleoptилей соединениями, усиливающими поступление ионов кальция в цитозоль, в условиях наших экспериментов не зависело от образования ФК в реакциях, катализируемых ФЛД.

Обработка coleoptилей кальциевым ионофором в значительной степени компенсировала вызываемое бутанолом-1 снятие положительного влияния НПН на теплоустойчивость coleoptилей (рис. 2). Такой же эффект проявлял и активатор инозитольного цикла – инозитол. Таким образом, оба агента, способные усиливать поступление ионов кальция в цитозоль (ионофор A23187 и инозитол), действовали как антагонисты физиологических эффектов ингибитора образования ФК бутанола-1. В связи с этим можно предположить, что ингибирование образования ФК в клетках coleoptилей нарушает их кальциевый гомеостаз. Влияние ФК на поступление кальция в цитозоль, как уже отмечалось, может быть связано с ее ионофорными свойствами. Однако для однозначного заключения о  $\text{Ca}^{2+}$ -опосредованном участии ФК в усилении генерации АФК в coleoptилях пшеницы и последующем индуцировании их теплоустойчивости под влиянием донора NO необходимо прямое определение изменений концентрации ионов кальция в цитозоле с помощью флуоресцентных зондов.

**Выводы.** Обработка coleoptилей пшеницы донором оксида азота (НПН) приводит

к быстрому усилению генерации в них  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , которая не подавляется ингибитором биосинтеза белка ЦГ. Можно полагать, что оксид азота вызывает активацию уже имеющихся в клетках молекул НАДФН-оксидазы. Эффект усиления генерации супероксидного анион-радикала, вызываемый НПН, угнетался бутанолом-1, ингибитором ФЛД-зависимого образования ФК. В то же время добавление в среду инкубации coleoptилей кальциевого ионофора A23187 или активатора инозитольного цикла инозитола в значительной степени снимало ингибирующее действие бутанола-1 на NO-индуцированную генерацию  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Донор оксида азота повышал теплоустойчивость coleoptилей пшеницы, а бутанол-1 существенно угнетал этот эффект НПН. Добавление в среду инкубации coleoptилей пшеницы соединений, усиливающих поступление кальция в цитозоль (ионофора A23187 и инозитола), компенсировало отрицательное влияние бутанола-1 на вызываемое донором NO повышение теплоустойчивости растительных клеток. Полученные данные свидетельствуют о том, что ФК, ионы кальция и АФК являются посредниками в реализации влияния экзогенного оксида азота на теплоустойчивость coleoptилей пшеницы. ФК наряду с ионами кальция, по-видимому, принимает участие в активации НАДФН-оксидазы – стартового фермента НАДФН-оксидантной сигнальной системы. Образующиеся в результате этого АФК играют важную роль в трансдукции сигнала к факторам регуляции транскрипции для последующей активации защитных реакций клетки в ответ на тепловой стресс.

*Yu.V. Karpets, Yu.E. Kolupaev,  
T.O. Yastreb, O.P. Dmitriev*

#### POSSIBLE PATHWAYS OF HEAT RESISTANCE INDUCTION IN PLANT CELLS BY EXOGENOUS NITROGEN OXIDE

The mechanisms of influence of exogenous nitrogen oxide (NO) on heat resistance of wheat coleoptiles have been studied. The treatment of plant cells with nitrogen oxide donor (sodium nitroprusside) resulted in the increase of superoxide anion-radical ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) generation already after 10 minutes. The inhibitor of protein biosynthesis cycloheximide did not inhibit the  $\text{O}_2^{\cdot-}$  generation by coleoptiles caused with the NO do-

nor whereas the inhibitor of phosphatidic acid formation (butanol-1) partially inhibited it. The treatment of coleoptiles with the calcium ionophore (A23187) or activator of inositol cycle (inositol) compensated the suppression of butanol-1 effect on NO-dependent  $O_2^{\cdot-}$  formation. Butanol-1 has also leveled the induction of coleoptiles heat resistance caused by the NO donor, whereas calcium ionophore and inositol almost completely removed the butanol-1 effect. The possible mechanisms of participation of reactive oxygen species, phosphatidic acid and calcium ions in the realization of NO physiological effects are discussed.

Ю.В. Карпець, Ю.Є. Колупаєв,  
Т.О. Ястреб, А.П. Дмитрієв

#### МОЖЛИВІ ШЛЯХИ ІНДУКУВАННЯ ТЕПЛОСТІЙКОСТІ РОСЛИННИХ КЛІТИН ЕКЗОГЕННИМ ОКСИДОМ АЗОТУ

Вивчали механізми впливу екзогенного оксиду азоту (NO) на теплостійкість колеоптилів пшениці. Обробка рослинних клітин донором оксиду азоту (нітропрусидом натрію) викликала посилення генерації супероксидного аніон-радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ) вже через 10 хв. Інгібітор біосинтезу білка циклогексимід не пригнічував посилення продукування  $O_2^{\cdot-}$  колеоптилями, спричинюване донором NO, а інгібітор утворення фосфатидної кислоти бутанол-1 частково його нівелював. Обробка колеоптилів кальцієвим іонофором A23187 або активатором інозитольного циклу інозитолом компенсувала негативну дію бутанолу-1 на утворення  $O_2^{\cdot-}$ . Бутанол-1 нівелював також підвищення теплостійкості колеоптилів, індуковане донором NO, тоді як кальцієвий іонофор та інозитол майже повністю знімали таку дію бутанолу-1. Обговорюються можливі механізми участі активних форм кисню, фосфатидної кислоти та іонів кальцію в реалізації фізіологічних ефектів NO.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Arasimowicz M., Floryszak-Wieczorek J.* Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses // *Plant Sci.* – 2007. – **172**. – P. 876–887.
2. *Красиленко Ю.А., Емец А.И., Блюм Я.Б.* Функциональная роль оксида азота у растений // *Физиология растений.* – 2010. – **57**, № 4. – С. 483–494.
3. *Siddiqui M.H., Al-Whaibi M.H., Basalah M.O.* Role of nitric oxide in tolerance of plants to abiotic stress // *Protoplasma.* – 2011. – **248**. – P. 447–455.
4. *Uchida A., Jagendorf A.T., Hibino T., Takabe T.* Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice // *Plant Sci.* – 2002. – **163**. – P. 515–523.
5. *Song L., Ding W., Zhao M., Sun B., Zhang L.* Nitric oxide protects against oxidative stress under heat stress in the calluses from two ecotypes of reed // *Plant Sci.* – 2006. – **171**. – P. 449–458.
6. *Yemets A.I., Krasylenko Yu.A., Lytvyn D.I., Shermetya Ya.A., Blume Ya.B.* Nitric oxide signalling via cytoskeleton in plants // *Plant Sci.* – 2011. – **181**. – P. 545–554.
7. *Besson-Bard A., Pugin A., Wendehenne D.* New insights into nitric oxide signaling in plants // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2008. – **59**. – P. 21–39.
8. *Courtois C., Besson A., Dehan J., Bourque S., Dobrowolska G., Pugin A., Wendehenne D.* Nitric oxide signalling in plants: interplays with  $Ca^{2+}$  and protein kinases // *J. Exp. Bot.* – 2008. – **59**, № 2. – P. 155–163.
9. *Neill S., Bright J., Desikan R., Hancock J., Harrison J., Wilson I.* Nitric oxide evolution and perception // *J. Exp. Bot.* – 2008. – **59**. – P. 25–35.
10. *Дмитрієв А.П.* Сигнальная роль оксида азота у растений // *Цитология и генетика.* – 2004. – **38**, № 4. – С. 67–75.
11. *Lanteri M.L., Laxalt A.M., Lamattina L.* Nitric oxide triggers phosphatidic acid accumulation via phospholipase D during auxin-induced adventitious root formation in Cucumber // *Plant Physiol.* – 2008. – **147**. – P. 188–198.
12. *Laxalt A.M., Raho N., Ten Have A., Lamattina L.* Nitric oxide is critical for inducing phosphatidic acid accumulation in xylanase-elicited tomato cells // *J. Biol. Chem.* – 2007. – **282**. – P. 21160–21168.
13. *Медведев С.С., Танкелюн О.В., Батов А.Ю., Воронина О.В., Мартинец Я., Махачкова И.* Ионофорные функции фосфатидной кислоты в растительной клетке // *Физиология растений.* – 2006. – **53**, № 1. – С. 45–53.
14. *Tewari R.K., Hahn E.J., Paek K.Y.* Function of nitric oxide and superoxide anion in the adventitious root development and antioxidant defence in *Panax ginseng* // *Plant Cell Rep.* – 2008. – **27**. – P. 563–573.
15. *Sagi M., Fluhr R.* Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases // *Plant Physiol.* – 2006. – **141**. – P. 336–340.
16. *Sang Y., Cui D., Wang X.* Phospholipase D and phosphatidic acid-mediated generation of superoxide in Arabidopsis // *Plant Physiol.* – 2001. – **126**. – P. 1449–1458.
17. *Gupta K.J., Hincha D.K., Mur L.A.J.* NO way to treat a cold // *New Phytol.* – 2011. – **189**. – P. 360–363.
18. *Карпець Ю.В., Колупаєв Ю.Є., Швиденко М.В., Дмитрієв О.П.* Вплив екзогенного оксиду азоту (NO) на генерацію супероксидного аніон-ради-

- кала та теплостійкість колеоптилів пшениці // Доп. НАН України. – 2011. – № 9. – С. 147–152.
19. Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е., Швиденко Н.В. Замедление процесса гибели клеток в сегментах колеоптилей пшеницы, инкубируемых на растворе сахарозы // Физиология и биохимия культур. растений. – 2011. – **43**, № 6. – С. 513–519.
  20. Дмитриева С.А., Миннибаева Ф.В., Гордон Л.Х. Митотический индекс меристематических клеток и рост корней гороха *Pisum sativum* при действии модуляторов инозитольного цикла // Цитология. – 2006. – **48**, № 6. – С. 475–479.
  21. Blume B., Nurnberger T., Nass N., Scheel D. Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley // Plant Cell. – 2000. – **12**. – P. 1425–1440.
  22. Ogasawara Y., Kaya H., Hiraoka G., Yumoto F., Kimura S., Kadota Y., Hishinuma H., Senzaki E., Yamagoe S., Nagata K., Nara M., Suzuki K., Tanokura M., Kuchitsu K. Synergistic activation of the *Arabidopsis* NADPH oxidase AtrbohD by Ca<sup>2+</sup> and phosphorylation // J. Biol. Chem. – 2008. – **283**. – P. 8885–8892.
  23. Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О. Влияние нитропруссиды натрия на теплоустойчивость колеоптилей пшеницы: связь эффектов с образованием и обезвреживанием активных форм кислорода // Физиология растений. – 2011. – **58**, № 6. – С. 883–890.
  24. Глянько А.К., Ищенко А.А. Структурные и функциональные особенности НАДФН-оксидазы растений (обзор) // Приклад. биохимия и микробиология. – 2010. – **46**, № 5. – С. 509–518.

Поступила 21.03.12