

ФІЗІОЛОГІЯ І БІОХІМІЯ РОСЛИН

УДК 581.1

СИНТЕЗ ОКСИДА АЗОТА (NO) В КОРНЯХ ЭТИОЛИРОВАННЫХ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА

© 2011 г. А. К. Глянько, Н. Б. Митанова

*Учреждение Российской академии наук
Сибирский институт физиологии и биохимии растений
Сибирского отделения РАН
(Иркутск, Россия)*

Изучали уровень оксида азота (NO) в корнях двухсуточных этиолированных проростков гороха посевного (*Pisum sativum* L.) с использованием флуоресцентного зонда DAF-2DA (4,5-диаминофлуоресцеин диацетат) и флуоресцентной микроскопии. Анализировали поперечные срезы корня толщиной 100-150 мкм (участок корня 10-15 мм от апекса). Значительный уровень NO в корнях обнаружен при выращивании проростков на воде (контроль). Добавление в среду выращивания растений нитропруссид натрия (НПН) (4 мМ), KNO₃ (20 мМ), NaNO₂ (2 мМ), L-аргинина (2 мМ) способствовало увеличению уровня NO по сравнению с контролем в 1,7 – 2,3 раза. Ингибиторы животной NO-синтазы – L-NAME (N^ω-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride) (1 мМ), амингуанидин (aminoguanidine hydrochloride) (1 мМ), снижали интенсивность флуоресценции в срезах корней на фоне всех изучаемых соединений. Ингибитор нитратредуктазы – вольфрамат натрия (150 мкМ), уменьшал на 60 % интенсивность флуоресценции в корнях в варианте с KNO₃. Поглотители оксида азота – РТЮ (2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide) (100 мкМ) и гемоглобин (4 мкМ), снижали уровень NO во всех вариантах. Неактивный аналог НПН – ферроцианид калия (4 мМ) – ингибировал генерацию NO. Результаты обсуждаются в связи с путями синтеза NO в растениях.

Ключевые слова: *Pisum sativum*, этиолированные проростки гороха, флуоресцентный зонд, оксид азота (NO), ингибиторы животной NO-синтазы и растительной нитратредуктазы, сквенджеры NO

Оксид азота (NO) – газообразная, нейтральная, легко диффундирующая через биологические мембраны липофильная молекула-радикал. NO обладает широким спектром биологического действия как сигнальная молекула и как токсичное вещество (Проскураков и др., 1999). В растениях биологические функции NO проявляются в таких процессах как: рост и развитие, гормональная регуляция, запрограммированная клеточная смерть, защитные реакции, цветение, гравитропизм, устьичные движения и

др. (Neill et al., 2008, Колупаев, Карпец, 2009). В больших концентрациях NO токсичен для бактерий, грибов, опухолевых клеток, вирусов, растений и животных (Zumft, 1997). По данным Дубовской и соавт. (2007), миллимолярное содержание NO способствовало повышению активности каспаз, распаду нуклеиновых кислот и уменьшению синтеза АТФ, но микромолярная концентрация этого соединения в условиях окислительного стресса подавляла перекисное окисление липидов и фрагментацию ДНК в клетках табака.

Токсичность молекулы NO связана с ее высокой реакционной способностью по отношению к белкам, содержащим металлы с переменной валентностью, и кислороду, а также ее способно-

Адрес для корреспонденции: Глянько Анатолий Константинович, Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, ул. Лермонтова, 132, а/я 317, Иркутск, 664033, Россия;
e-mail: akglyanko@sifibr.irk.ru

стью образовывать продукты с аминами и тиолами (Van der Vliet et al., 1996). Высокая химическая активность и полифункциональный характер действия NO затрудняет разработку модели его роли в сигналинге (Grun et al., 2006). Тем не менее, в настоящее время принято, что NO образует одну из восьми клеточных сигнальных систем – NO-синтазную сигнальную систему (Гарчевский, 2002).

Представления о путях синтеза оксида азота у растений остаются предметом дискуссий. Если для животных клеток этот вопрос решен однозначно – это НАДФН-зависимое окисление L-аргинина до цитруллина и NO с участием трех изоформ NO-синтазы, то у растений обнаружены по крайней мере несколько путей синтеза NO (Crawford, 2005). При этом основными считаются нитрат/нитрит- и L-аргинин-зависимые пути. Первый предусматривает восстановление нитратов и нитритов в листьях и корнях до NO с участием цитозольной нитратредуктазы (Shi, Li, 2008) и, возможно, нитратредуктазы и нитрит-NO-редуктазы, локализованных на плазматической мембране корней (Stohr et al., 2001; Stohr, Stremlau, 2006). Второй путь предполагает наличие аргинин-зависимого образования NO, аналогичного тому, что существует в животных клетках. Это подтверждается, в частности, тем, что реакция образования NO в растениях блокируется ингибиторами активности животной NO-синтазы, что ведет к опосредованному влиянию на физиологические процессы: рост, развитие, цветение, гормональную сигнализацию, защитные реакции (Crawford, 2005). Однако до сих пор из растений не выделен белок, гомологичный животным NO-синтазам. Но в последние годы большое внимание уделяется белку AtNOS1 из арабидопсиса, гомологичного белку из виноградной улитки (*Helix pomatia*). Последний катализирует реакцию образования NO из аргинина. Однако белок AtNOS1 по биохимическим и структурным особенностям относится к семейству ГТФ-связывающих белков и не может проявлять NO-синтазную активность (Moreau et al., 2008). Предполагается, что этот белок взаимодействует с другими белками с образованием ферментного комплекса, катализирующего синтез NO (Moreau et al., 2008).

Синтез NO в клетках растений может также осуществляться путем неферментативного восстановления нитритов в кислой среде в апопласте при наличии восстановителей (Bethke et al., 2004) и при участии полиаминов (Tun et al., 2006). Таким образом, можно пред-

полагать, что в растениях могут функционировать различные пути синтеза NO и активация этих путей будет, вероятно, зависеть от типа экзогенных факторов биотической или абиотической природы. По мнению Flores et al. (2008), в растениях функционирует несколько источников образования NO и некоторые из них могут регулироваться через сигнальные пути.

Цель наших исследований состояла в изучении уровня эндогенного NO в корнях этиолированных проростков гороха (*Pisum sativum* L.) в зависимости от действия на растения азотных соединений, которые *in planta* могут быть источниками (субстратами) для синтеза NO и выяснении влияния на этот синтез ингибиторов соответствующих ферментов и NO-поглотителей (скавенжеров).

МЕТОДИКА

Объект исследования – 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% раствором пероксида водорода, проращивали в кюветах на влажной фильтровальной бумаге при температуре 22°C в течение 2 суток, 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 окрашивания срезов использовали флуоресцентный зонд 4,5-диаминофлуоресцеин диацетат (DAF-2DA). Это соединение проникает через клеточную мембрану и деацетилирует с помощью внутриклеточных эстераз в 4,5-диаминофлуоресцеин (DAF-2), который образует с NO флуоресцирующее соединение – диаминотриазолфлуоресцеин триазол (DAF-2T) (Nakatsubo et al., 1998). Для получения окрашенного соединения DAF-2T отрезки корней инкубировали с 10 мкМ DAF-2DA в 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) в течение 30 мин при температуре 26°C.

Из инкубированных отрезков корней получали поперечные срезы толщиной 100-150 мкм и анализировали их на флуоресцентном микроскопе Axio Observer Z1 (Германия) с цифровой монохромной камерой Axio Cam

СИНТЕЗ ОКСИДА АЗОТА (NO)

MRm3 и пакетом программного обеспечения для захвата и анализа изображений «Axio Vision Rel.4.6» с использованием блока фильтров № 10 с длиной волны возбуждения 450-490 нм, эмиссией 515-565 нм. Интенсивность флуоресцентного свечения выражена в относительных единицах. В опытах испытывали различные временные экспозиции проростков на растворах изучаемых соединений: от краткосрочных (15-30 мин) до более длительных (2, 5, 24 ч). В статье представлены экспозиции, при которых наблюдался наибольший уровень NO в тканях корней.

Содержание свободного L-аргинина определяли в водной вытяжке из корней этиолированных проростков гороха на аминокислотном анализаторе ААА Т339 (Чехия). Количественное определение нитратов в корнях проводили по методу Cataldo et al. (1975).

Применяли реактивы: гемоглобин из эритроцитов лошади (MP Biomedicals, USA); DAF-2DA (Calbiochem, Germany); нитропруссид натрия (НПН) (MP Biomedicals, USA), РТЮ (2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl 3-oxide) (Sigma, USA), L-NAME (N ω -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride), аминокуанидин (aminoguanidine hydrochloride) (Sigma, USA), L-аргинин, KNO₃ (нитрат), вольфрамат натрия, ферроцианид калия - K₄[Fe(CN)₆] 3H₂O и нитрит – NaNO₂ (Реахим, Россия).

Результаты исследований представлены в виде микрофотографий и графиков, отображающих интенсивность флуоресцентного свечения в клетках. Величины представляют средние арифметические со стандартной ошибкой 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 ОБСУЖДЕНИЕ

В наших опытах флуоресценция наблюдалась в эпидермальных клетках срезов корней проростков гороха (рис. 1). По-видимому, это свидетельствует о том, что этиолированные проростки синтезируют NO в поверхностных клетках корня, создавая постоянное «NO-поле», что может способствовать быстрой передаче сигнальной информации в геном, особенно при стрессовых воздействиях. Как следует из рис. 1,

флуоресценция в эпидермальных клетках наблюдалась при экспозиции проростков на дистиллированной воде (контроль), растворах НПН, нитратной и нитритной солей, L-аргинина.

Образование NO в клетках растений на фоне НПН обусловлено способностью этого соединения высвобождать оксид азота в тканях растений и с этим связано его широкое применение в исследованиях как экзогенного донора NO. Следует заметить, что в ряде исследований в качестве контроля к НПН применяется неактивный аналог НПН – ферроцианид калия (КФЦ) (Tewari et al., 2008). В наших опытах КФЦ в концентрации 4 мМ ингибировал генерацию оксида азота при экспозиции 30 мин и при более длительных экспозициях (рис. 1). Механизм его действия неясен. Однако известно, что КФЦ ингибирует образование латеральных корней, инициация образования и рост которых происходят при участии NO и фитогормонов (Tewari et al., 2008). Отсутствием достаточного количества NO в клетках корней на фоне КФЦ в опытах этих авторов можно, вероятно, объяснить ингибирование образования боковых корней.

Механизм генерации NO в корнях проростков, выращенных на воде, мы связываем с наличием в клетках достаточного количества свободного аргинина. Действительно, определение нами свободного L-аргинина в корнях двухсуточных проростков гороха выявило его высокое содержание – $7,73 \pm 1,17$ мкмоль / г сухого вещества (n = 5). По данным других авторов, пул аргинина весьма значителен (5-10 мкмоль / г сухого вещества) у 1-4-дневных проростков арабидопсиса (Zonia et al., 1995). Содержание нитратов в корнях проростков гороха было на уровне «следовых» количеств. Поэтому отсутствие отрицательного влияния ингибитора нитратредуктазы – вольфрамата натрия, на уровень NO в корнях в варианте с водой (рис. 3, I) может объясняться недостаточным количеством субстрата (нитрата) для проявления активности нитратредуктазы.

Можно предположить, что синтез оксида азота в контрольном варианте (вода) происходит за счет использования эндогенного аргинина как субстрата в реакции, катализируемой ферментом подобного NO-синтазе животных. Это предположение подтвердилось результатами наших опытов с ингибиторами животной NO-синтазы (см. рис. 3).

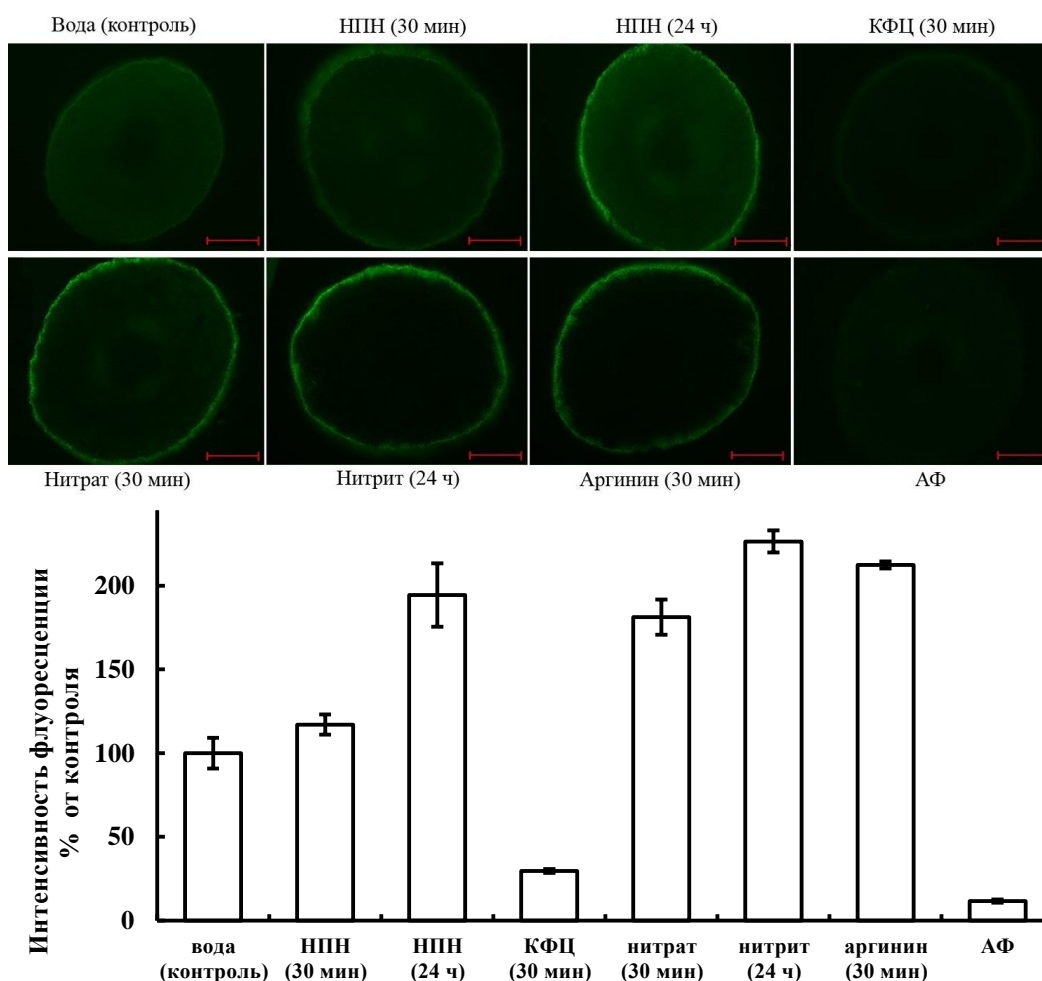


Рис. 1. Влияние нитропруссид натрия, ферроцианида калия, нитрата, нитрита и L-аргинина на уровень NO в корнях этилированных проростков гороха.

Бар на фотографии 100 мкм.

НПН – нитропруссид натрия (4мМ); КФЦ – ферроцианид калия (4 мМ); KNO_3 – нитрат (20 мМ); $NaNO_2$ – нитрит (2 мМ); L-аргинин – (2 мМ); АФ – автофлуоресценция.

Во всех вариантах опыта отмечалось увеличение уровня NO по сравнению с контролем: с НПН (4 мМ) через 24 ч – в 1,9 раза; с KNO_3 (20 мМ) через 30 мин – в 1,7 раза; с $NaNO_2$ (2 мМ) через 24 ч – в 2,3 раза; с L-аргинином (2 мМ) через 30 мин – в 2,1 раза. Таким образом, экзогенные соединения усиливали интенсивность флуоресценции в корнях проростков. Чтобы доказать, что в клетках корня образуется NO, мы применили сквенджер оксида азота – РТИО. Это вещество не является биологическим соединением и его химическое действие в клетках организмов основано на окислении NO до NO_2^- (Maeda et al., 1994). РТИО используют в исследованиях *in vitro* и *in vivo* для доказательства синтеза NO в клетках и устранения биологической активности NO.

Как видно из рис. 2, экспозиция корней на растворе РТИО (100 мкМ) на фоне воды, НПН, нитрата и L-аргинина снижала интенсив-

ность флуоресценции на 65-90 %. Это доказывает присутствие NO клетках корней гороха и его связывание РТИО. Подобным сквенгирующим действием обладает также гемоглобин, под влиянием которого (концентрация 4 мкМ) интенсивность флуоресцентного свечения в вариантах с H_2O и НПН снизилась приблизительно в 2 раза (рис. 2).

Известно, что NO взаимодействует с гемом гемоглобина с образованием нитрозилгемоглобина (Perazzolli et al., 2006). Предполагается, что в растениях несимбиотические (несвязанные с симбиотической азотфиксацией в клубеньках бобовых растений) формы гемоглобина могут выполнять защитную роль против нитрозативного стресса и модулировать сигнальную функцию NO (Perazzolli et al., 2006). Трансгенные растения табака и люцерны с повышенным синтезом несимбиотического гемоглобина класса 1 обладали меньшей чувстви-

СИНТЕЗ ОКСИДА АЗОТА (NO)

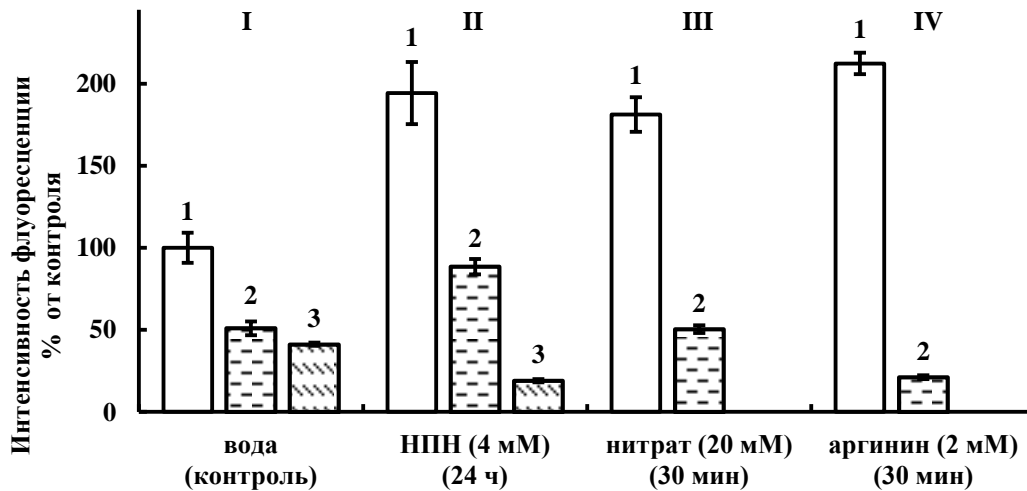


Рис. 2. Влияние РТЮ (100 мкМ) и гемоглобина (ГГ, 4 мкМ) на уровень NO в корнях этиолированных проростков гороха.

I – контроль: 1 – вода; 2 – вода + ГГ; 3 – вода + РТЮ. II: 1 – НПН; 2 – НПН + ГГ; 3 – НПН + РТЮ. III: 1 – нитрат; 3 – нитрат + РТЮ. IV: 1 – аргинин; 3 – аргинин + РТЮ.

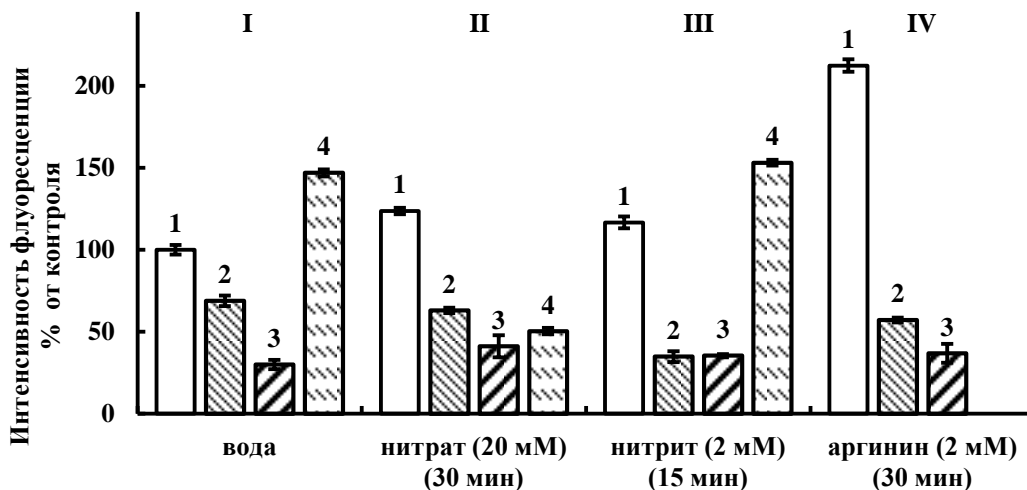


Рис. 3. Влияние ингибиторов животной NO-синтазы L-NAME (1 мМ), аминогуанидина (АГ, 1 мМ) и нитратредуктазы (вольфрабат натрия, 150 мкМ) на уровень NO в корнях этиолированных проростков гороха.

I: 1 – контроль; 2 – вода + АГ; 3 – вода + L-NAME; 4 – вода + вольфрабат натрия. II: 1 – нитрат; 2 – нитрат + АГ; 3 – нитрат + L-NAME; 4 – нитрат + вольфрабат натрия. III: 1 – нитрит; 2 – нитрит + АГ; 3 – нитрит + L-NAME; 4 – нитрит + вольфрабат натрия. IV: 1 – аргинин; 2 – аргинин + АГ; 3 – аргинин + L-NAME.

тельностью к нитрозативному стрессу, вызываемому в клетках действием экзогенных доноров NO, по сравнению с нормальными (дикими) формами растений (Dordas et al., 2003; Seregelyes et al., 2004). Возможно, несимбиотические формы гемоглобина играют определенную роль в регуляции уровня NO в клетках на ранних этапах бобово-ризобияльного симбиоза (Глянько, Васильева, 2007). Таким образом, физиологическая роль растительных гемоглобинов в метаболизме NO хотя и очевидна, но требует углубленного изучения и, в частности, как возможных регуляторов уровня оксида азота в

растительных клетках, защищающих их от нитрозативного стресса (Besson-Bard, 2008).

В литературе достаточно много работ, свидетельствующих об ингибировании синтеза NO в растениях с помощью соединений, являющихся ингибиторами животных NO-синтаз (Besson-Bard, 2008). Мы в своих исследованиях использовали два ингибитора животной NO-синтазы – аминогуанидин гидрохлорид (Cognas et al., 2006), L-NAME (Assai et al., 2008) и ингибитор нитратредуктазы – вольфрабат натрия (Assai et al., 2008). Как следует из рис. 3, в варианте с водой (контроль) аминогуанидин (1 мМ)

снижал интенсивность флуоресценции на 37 %, а L-NAME (1 мМ) – на 68 %. Существенное снижение интенсивности флуоресценции наблюдалось и в варианте с нитритом, особенно на фоне аргинина (рис. 3).

В варианте с KNO_3 интенсивность флуоресценции увеличилась на 20% по сравнению с контролем (рис. 3, II). Это свидетельствует, по-видимому, о включении дополнительного пути синтеза NO, а именно – восстановления нитратов до NO. Но при этом ингибиторы животной NO-синтазы, как и в контрольном варианте, снижали интенсивность флуоресценции: амингуанидин на 49%, L-NAME на 66%. Таким образом, можно сделать вывод, что при 30-минутной экспозиции основной путь генерации NO в корнях гороха – это аргинин-зависимое образование оксида азота. В то же время снижение под влиянием вольфрамата натрия (150 мкМ) активности нитратредуктазы на 60% говорит о том, что в генерации NO также задействован этот фермент (рис. 3, II).

Участие цитозольной нитратредуктазы (НР) в генерации NO в настоящее время не вызывает сомнения (Besson-Bard, 2008). Вопрос в том, в каких количествах NO может образовываться с участием этого фермента. По данным Rockel et al. (2002), продукция NO при насыщающих концентрациях субстрата (нитрата) составляет только 1% от нитратвосстанавливающей способности НР. Этого количества NO более чем достаточно для функционирования ее как сигнальной молекулы (Meuer et al., 2005). Однако при действии на растения экстремальных факторов, когда генерация NO в клетках усиливается многократно, объяснить синтез NO активностью только НР затруднительно. Можно предполагать, что в растительных клетках существуют другие формы нитратвосстанавливающих ферментов, участвующих в реакциях образования NO. В этой связи обращают на себя внимание результаты исследований Stohr с соавт. (2001; 2006), которые обосновывают локализацию в клетках корня табака корнеспецифичных, связанных с плазмалеммой нитратредуктазы (PM-NR) и нитрит-NO-редуктазы (NI-NOR). По мнению указанных авторов, работа этих ферментов скоординирована и скорость ферментативной продукции NO в данном случае зависит от силы стрессового воздействия.

В наших опытах отсутствие отрицательного влияния ингибитора активности нитратредуктазы – вольфрамата натрия – на уровень NO в корнях проростков гороха в варианте с нит-

ритом (рис. 3, III) свидетельствует, по-видимому, о том, что восстановление нитрита (NO_2^-) осуществляется другим(и) ферментом(ами), на активность которого(ых) ингибитор нитратредуктазы не действует. Однако достоверное повышение уровня NO в корнях под влиянием вольфрамата натрия при 15-минутной экспозиции в вариантах с водой и нитритом (рис. 3, I, III) пока не находит у нас объяснения. Возможно, наблюдается неспецифическое действие вольфрамата натрия на синтез NO.

Синтез оксида азота с участием аргинин-зависимого пути подтверждают наши данные о существенном уменьшении (в 3,7 и более раза) интенсивности флуоресценции под влиянием амингуанидина (1 мМ) и L-NAME (1 мМ) при экспозиции проростков гороха на растворе L-аргинина (2 мМ) в течение 30 мин (рис. 3, IV). На этом же рисунке также приведены данные об ингибирующем влиянии амингуанидина и L-NAME на уровень NO в корнях в вариантах с водой, нитратом и нитритом. Неактивный аналог НРН – ферроцианид калия проявил себя как скавенжер NO (рис. 1).

Таким образом, в данной работе показан синтез оксида азота в этиолированных проростках гороха, который усиливался при добавлении в среду нитрата, нитрита и L-аргинина. Четко показано частичное блокирование синтеза NO в корнях проростков ингибиторами активности животных NO-синтаз. Прослеживается усиление синтеза NO при экспозиции проростков на KNO_3 и $NaNO_2$ и показано, что нитратвосстанавливающая активность частично блокируется ингибитором нитратредуктазы. Однако уровень NO в этих вариантах также снижается под влиянием ингибиторов животной NO-синтазы. Это говорит о том, что в проростках одновременно функционируют как нитрат/нитрит – генерирующий путь, так и L-аргинин-зависимый путь образования NO. Основываясь на экспериментальном факте, что дефицитные по НР и нитратам мутанты арабидопсиса содержали в 10 раз меньше L-аргинина по сравнению с диким типом, Modolo et al. (2006) предположили, что синтез NO через нитрат/нитрит-восстанавливающий путь связан с метаболизмом аргинина. В какой-то степени этот вопрос подтверждается результатами исследований Zonia et al. (1995), которые показали увеличение (в 3-5 раз) содержания свободного аргинина в проростках арабидопсиса по мере их роста на растворе азотной соли (NH_4NO_3) по сравнению с проростками, расту-

СИНТЕЗ ОКСИДА АЗОТА (NO)

щими на воде. В целом, вопрос о путях синтеза NO в растениях остается до конца невыясненным и открытым для дальнейших исследований.

Авторы выражают благодарность А. А. Степанову за помощь в проведении анализов.

ЛИТЕРАТУРА

- Глянько А.К., Васильева Г.Г. Особенности действия активных форм кислорода и азота при бобово-ризобиальном симбиозе // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Серія Біологія. – 2007. – Вип. 3 (12). – С. 27-41.
- Дубовская Л.В., Колеснева Е.В., Князев Д.М., Волотовский И.Д. Защитная роль оксида азота при окислительном стрессе, индуцированном в растениях табака пероксидом водорода // Физиология растений. – 2007. – Т. 54, № 6. – С. 847-855.
- Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Участие оксида азота (NO) в трансдукции сигналов абиотических стрессоров у растений // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Серія Біологія. – 2009. – Вип. 3 (18). – С. 6-19.
- Проскуряков С.Я., Коноплиников А.Г., Иванников А.И., Скворцов В.Г. Биология окиси азота // Успехи соврем. биологии. – 1999. – Т. 119, № 4. – С. 380-395.
- Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. – М.: Наука, 2002. – 295 с.
- Assai S., Ohta T., Yoshioka H. MAPK signaling regulates nitric oxide and NADPH oxidase-dependent oxidative burst in *Nicotina benthamiana* // Plant Cell. – 2008. – V. 20, № 5. – P. 1390-1406.
- Besson-Bard A., Pugin A., Wendehenne D. New insights into nitric oxide signaling in plants // Annu. Rev. Plant Biol. – 2008. – V. 59. – P. 21-39.
- Bethke P.C., Badger M.P., Jones R.L. Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues // Plant Cell. – 2004. – V. 16, № 2. – P. 332-341.
- Cataldo D.A., Haroom M., Schrader L.E., Young V.L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by salicylic acid // Commun. Soil Sci. Plant Anal. 1975. – V. 6, № 1. – P. 71-80.
- Corpas F.J., Barroso J.B., Carreras A. et al. Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development // Planta. – 2006. – V. 224, № 2. – P. 246-254.
- Crawford N.M. Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants // J. Exp. Bot. – 2005. – V. 57, № 3. – P. 471-478.
- Dordas C., Rivoal J., Hill R.D. Plant haemoglobins, nitric oxide and hypoxia stress // Ann. Bot. – 2003. – V. 91, № 2. – P. 173-178.
- Flores T., Todd C.D., Tovar-Mendez A. et al. Arginase-negative mutants of *Arabidopsis* exhibit increased nitric oxide signaling in root development // Plant Physiol. – 2008. – V. 147, № 4. – P. 1936-1946.
- Grun S., Lindermayr S., Durner J. Nitric oxide signaling plant growth and development // J. Exp. Bot. – 2006. – V. 57, № 3. – P. 507-516.
- Maeda H., Akaike T., Yoshida M., Suga M. Multiple functions of nitric oxide in pathophysiology and microbiology: analysis by a new nitric oxide scavenger // J. Leukocyte Biol. – 1994. – V. 56, № 5. – P. 588-592.
- Meyer C., Lea U.S., Provan F. et al. Is nitrate reductase a major player in the plant NO (nitric oxide) game? // Photosynth. Res. – 2005. – V. 83, № 2. – P. 181-189.
- Modolo L.V., Augusto O., Almeida I.M.G. et al. Decreased arginine and nitric oxide levels in nitrate reductase deficient *A. thaliana* plants impair nitric oxide synthesis and the hypersensitive response to *Pseudomonas syringae* // Plant Sci. – 2006. – V. 171, № 1. – P. 34-40.
- Moreau M., Lee G.L., Wang Y. et al. AtNOS/AtNOA1 is a functional *Arabidopsis thaliana* cGTPase and not a nitric-oxide synthase // J. Biol. Chem. – 2008. – V. 283, № 47. – P. 32957-32967.
- Nakatsubo N., Kojima H., Kikuchi K. et al. Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins // FEBS Letters. – 1998. – V. 427, № 2. – P. 263-266.
- Neill S., Bright J., Desikan R., Hancock J., Harrison J., Wilson I. Nitric oxide evolution and perception // J. Exp. Bot. – 2008. – V. 59, № 1. – P. 25-35.
- Perazzolli M., Romero-Puertas M.C., Delledonne M. Modulation of nitric oxide bioactivity by plant haemoglobins // J. Exp. Bot. – 2006. – V. 57, № 3. – P. 479-488.
- Rockel P., Strube F., Rockel A. et al. Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro* // J. Exp. Bot. – 2002. – V. 53, № 1. – P. 103-110.
- Seregelyes C., Igamberdiev A.U., Maassen A. et al. NO-degradation by alfalfa class 1 hemoglobin (Mhb1): a possible link to *PR-la* gene expression in Mhb1-overproducing tobacco plants // FEBS Lett. – 2004. – V. 571, № 1. – P. 61-66.
- Shi F-M., Li Y-Z. Verticillium dahliae toxins-induced nitric oxide production in *Arabidopsis* is major de-

- pendent on nitrate reductase // BMB Rep. – 2008. – V. 41, № 1. – P. 79-85.
- Stohr C., Strube F., Marx G. et al. A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite // Planta. – 2001. – V. 212, № 5-6. – P. 835-841.
- Stohr C., Stremlau S. Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots // J. Exp. Bot. – 2006. – V. 57, № 3. – P. 463-470.
- Tewari R.K., Kim S., Hahn E-J., Paek K-Y. Involvement of nitric oxide-induced NADPH oxidase in adventitious root growth and antioxidant defense in *Panax ginseng* // Plant Biotech. Rep. – 2008. – V. 2, № 1. – P. 113-122.
- Tun N.N., Santa-Catarina C., Begum T. et al. Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings // Plant Cell Physiol. – 2006. – V. 47, № 3. – P. 346-354.
- Van der Vliet A., Eiserich J.P., Kaur H. et al. Nitrotyrosine as biomarker for reactive nitrogen species // Methods Enzymol. – 1996. – V. 269. – P. 175-184.
- Zonia L.E., Stebbins N.E., Polacco J.C. Essential role of urease in germination of nitrogen-limited *Arabidopsis thaliana* seed // Plant Physiol. – 1995. – V. 107, № 4. – P. 1097-1103.
- Zumft W.G. Cell biology and molecular basis of denitrification // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 1997. – V. 61, № 4. – P. 533-616.

Поступила в редакцию
10.08.2011 г.

SYNTHESIS NITRIC OXIDE (NO) IN ROOTS ETIOLATED SEEDLINGS OF PEA

A. K. Glyan'ko, N. B. Mitanova

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

The level nitric oxide (NO) in roots etiolated seedlings pea sowing (*Pisum sativum* L.) with the help of a fluorescent probe DAF-2DA ((4,5-diaminofluorescein diacetate) and fluorescent microscopy was studied. The cross cuts of a root thickness 100-150 μm (a site of a root of 10-15 mm from apex) was analyzed. Considerable level NO in roots is found out at cultivation of seedlings on water (control). Addition on environment of cultivation plants the sodium nitroprusside (SNP) (4 mM), KNO_3 (20 mM), NaNO_2 (2 mM), L-arginine (2 mM) promoted increase of level NO in comparison with the control in 1,7 – 2,3 time. The inhibitors animal NO-synthase – L-NAME (N_w -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (1 mM) and aminoguanidine (1 mM) reduced intensity of fluorescence of cuts roots on a background of all investigated compounds. The inhibitor of nitrate reductase – sodium tungstate (150 μM), reduced by 60% intensity of fluorescence in roots in variant with KNO_3 . The NO scavengers – PTIO (2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide) (100 μM) and hemoglobin (4 μM), reduced level NO in all variants. Inactive analogue of SNP – potassium ferrocyanide (4mM), has inhibit the generate nitric oxide. Results are discussed in connection with ways of synthesis NO in plants.

Key words: *Pisum sativum*, etiolated seedlings of pea, fluorescent probe, nitric oxide (NO), scavengers NO, inhibitors animal NO-synthase and plant nitrate reductase

СИНТЕЗ ОКСИДА АЗОТА (NO)

СИНТЕЗ ОКСИДУ АЗОТУ (NO) В КОРЕНЯХ ЕТІОЛЬОВАНИХ ПРОРОСТКІВ ГОРОХУ

А. К. Глянько, Н. Б. Мітанова

*Установа Російської академії наук
Сибірський інститут фізіології і біохімії рослин
Сибірського відділення РАН
(Іркутськ, Росія)*

Вивчали рівень оксиду азоту (NO) в коренях дводобових етіольованих проростків гороху посівного (*Pisum sativum* L.) з використанням флуоресцентного зонда DAF-2DA (4,5-діамінофлуоресцеїн діацетат) і флуоресцентної мікроскопії. Аналізували поперечні зрізи кореня завтовшки 100-150 мкм (ділянка кореня 10-15 мм від апексу). Значний рівень NO в коренях знайдений при вирощуванні проростків на воді (контроль). Додавання в середовище вирощування рослин нітропрусиду натрію (НПН) (4 мМ), KNO₃ (20 мМ), NaNO₂ (2 мМ), L-аргініну (2 мМ) сприяло збільшенню вмісту NO порівняно з контролем в 1,7 – 2,3 раза. Інгібітори тваринної NO-синтази – L-NAME (N ω -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride) (1 мМ), аміногуанідин (aminoguanidine hydrochloride) (1 мМ), знижували інтенсивність флуоресценції в зрізах коренів на фоні всіх сполук, що вивчалися. Інгібітор нітратредуктази – вольфрамат натрію (150 мкМ), зменшував на 60 % інтенсивність флуоресценції в коренях у варіанті з KNO₃. Поглиначі оксиду азоту – РТІО (2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide) (100 мкМ) і гемоглобін (4 мкМ), знижували рівень NO в усіх варіантах. Неактивний аналог НПН – фероціанід калію (4 мМ) – інгібував генерацію NO. Результати обговорюються у зв'язку з можливими шляхами синтезу NO в рослинах.

Ключові слова: *Pisum sativum*, етіольовані проростки гороху, флуоресцентний зонд, оксид азоту (NO), інгібітори тваринної NO-синтази і рослинної нітратредуктази, скавенжери NO