

## ФІЗИОЛОГІЯ І БІОХІМІЯ РОСЛИН

УДК 581.138.1

### РИТМИЧНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ОКСИДА АЗОТА (NO) В КОРНЯХ ЭТИОЛИРОВАННЫХ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА (*PISUM SATIVUM* L.)

© 2013 г. А. К. Глянько<sup>1</sup>, А. А. Ищенко<sup>1</sup>, Г. Г. Васильева<sup>1</sup>,  
А. В. Степанов<sup>1</sup>, О. А. Пройдакова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Сибирский институт физиологии и биохимии растений

Сибирского отделения Российской академии наук

(Иркутск, Россия)

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт геохимии Сибирского отделения Российской академии наук

(Иркутск, Россия)

Изучена временная динамика (в течение 30 и 60 мин) генерации оксида азота (NO) в корнях двухсуточных этиолированных проростков гороха посевного. В течение экспозиции проростков на воде и растворе CaCl<sub>2</sub> (100 мкМ) показаны флуктуации в уровне оксида азота в корнях – его повышение и снижение. Обсуждается физиологическая роль флуктуаций содержания оксида азота в корне и участие ионов кальция в этом процессе.

**Ключевые слова:** *Pisum sativum* L., ионы кальция, оксид азота (NO), флуоресцентный зонд

Оксид азота (NO) многофункциональная сигнальная молекула, играющая ключевую роль в широком спектре физиолого-биохимических процессов у растений, животных и микроорганизмов (Glyan'ko et al., 2010; Gupta et al., 2011). В растениях NO выполняет функцию сигнальной молекулы и одного из важнейших компонентов защитной системы при действии стрессовых факторов (Колупаев, Карпец, 2009). Известно, что NO контролирует гомеостаз ионов кальция (Ca<sup>2+</sup>) в клетках организмов (Clementi, 1998) и почти все типы кальциевых каналов и транспортеров регулируются оксидом азота путем S-нитрозилирования белков или с участием вторичных мессенджеров NO – циклических ГМФ (сGMP), АДФР

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

(сADPR) и протеинкиназ (ПК) (Besson-Bard et al., 2008). Эндогенные и экзогенные источники NO активируют приток Ca<sup>2+</sup> в цитоплазму из внеклеточного пространства (Garcia-Mata et al., 2003; Lamotte et al., 2004). С другой стороны, увеличение концентрации цитозольного Ca<sup>2+</sup> под действием внешних факторов влияет на синтез NO, что ведет к усилению физиолого-биохимических процессов и каскаду сигнальных реакций, сопровождаемых изменением экспрессии генов (Courtois et al., 2008). Так, показана активация Ca<sup>2+</sup>-кальмодулинзависимой киназы (ССаМК) ритмическими изменениями концентрации кальция в цитоплазме и органеллах, что сопровождается усилением генерации NO (Courtois et al., 2008). Исходя из этого, можно говорить о перекрестном и взаимном влиянии двух сигнальных посредников на процессы метаболизма, особенно при трансдукции абиотических и биотических сигналов (Vandelle et al., 2006; Колупаев, 2007). Однако

механизмы, с помощью которых NO модулирует поток  $Ca^{2+}$  в клетках, до конца непонятны.

С другой стороны, нерешенным остается вопрос о путях синтеза NO в растениях. В настоящее время бесспорно признается путь генерации NO в растительных клетках с участием цитозольной нитратредуктазы (НР). Однако при этом необходимо отметить, что функциональная связь между ионами  $Ca^{2+}$  и синтезом NO с участием НР остается под вопросом (Courtois et al., 2008). Второй путь синтеза NO, связанный с использованием в качестве субстрата L-аргинина, подтвержден многочисленными исследованиями (Besson-Bard, 2008; Глянько, 2013), но не доказан присутствием в растениях фермента идентичного NO-синтазе (NOS) млекопитающих, катализирующей окислительную реакцию синтеза NO из аргинина в животных клетках. Что же касается взаимосвязи между  $Ca^{2+}$  и генерацией NO по L-аргининзависимому пути, то имеются данные о необходимости ионов кальция в реакции, катализируемой растительной NO-синтазой, подобной NOS животных (Vandelle et al., 2006). Так, зависимость активности конститутивной изоформы cNOS млекопитающих от кальмодулина и ионов  $Ca^{2+}$  (Bogdan, 2001) подтверждена также в опытах с тканями различных видов растений (Corpas et al., 2006). Хотя эти данные не ус-

танавливают прямого взаимодействия ионов кальция с NOS-подобным ферментом растений, но, по-видимому, свидетельствуют о роли флуктуаций (колебаний) концентрации внеклеточного и внутриклеточного кальция в синтезе NO в растительных клетках и участии NO в сигнальном каскаде, инициируемом  $Ca^{2+}$ . Однако последовательность передачи сигналов в NO/ $Ca^{2+}$ -связанном пути также остается до конца не выясненной.

В связи с изложенным можно представить следующую упрощенную схему взаимодействия  $Ca^{2+}$  и NO на начальных этапах трансдукционных процессов (рис. 1). Эндогенный оксид азота, генерируемый ферментными (или неферментными) системами растений, оказывает прямое или косвенное влияние на  $Ca^{2+}$ -каналы, усиливая или ингибируя поток внеклеточного  $Ca^{2+}$  в цитоплазму через плазматическую мембрану. С другой стороны,  $Ca^{2+}$  стимулирует генерацию растительными клетками оксида азота, по крайней мере через реакцию, в которой в качестве субстрата используется L-аргинин. Накопление внутриклеточного NO будет вести к стимуляции процессов, оказывающих влияние на гомеостаз  $Ca^{2+}$  во внутриклеточных органеллах путем создания в цитоплазме кальциевых волн (осцилляций), составляющих звенья в трансдукции информации в

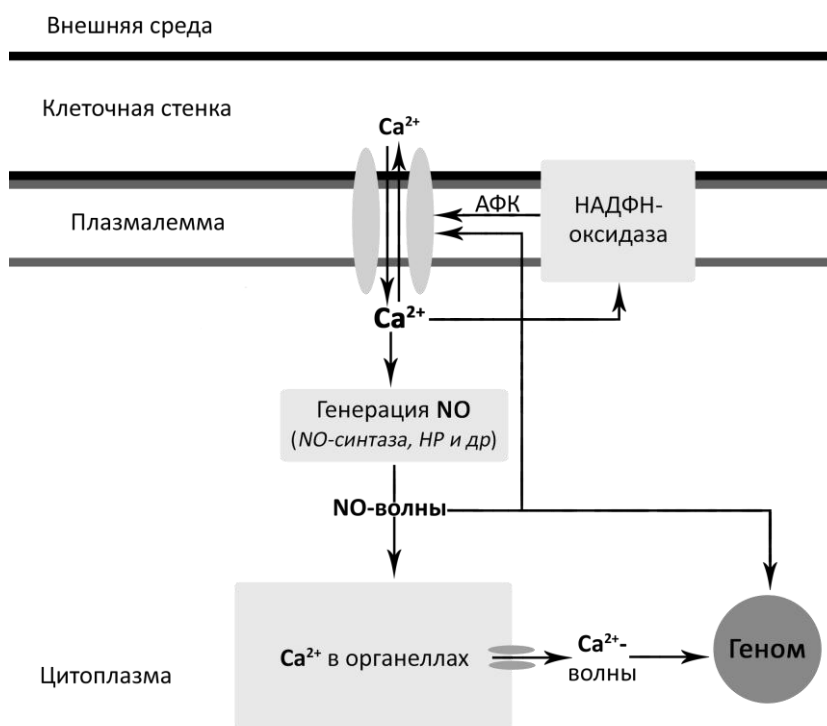


Рис. 1. Гипотетическая схема взаимосвязи сигнальных молекул ( $Ca^{2+}$ , NO, АФК) в клетке растения (объяснения в тексте).

геном (Тарчевский, 2002; Медведев, 2010). Необходимо также отметить, что увеличение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме происходит как за счет внеклеточного кальция, так и за счет освобождения его из внутриклеточных компонентов цитоплазмы – эндоплазматического ретикула, вакуолей и других органелл (Денисенко, Кузьмина, 2013).

В данной работе в краткосрочных опытах с этиолированными проростками гороха изучали влияние эндогенного (экспозиция проростков на воде) и экзогенного кальция (экспозиция проростков на растворе  $\text{CaCl}_2$ ) на временную динамику содержания NO в корнях проростков гороха.

### МЕТОДИКА

Объект исследований – этиолированные проростки гороха посевного (*Pisum sativum* L.) сорта Ямальский, выращенные в пластмассовых кюветах на влажной фильтровальной бумаге при 22°C. Перед замачиванием семена промывали теплой проточной водой с мылом и обеззараживали 3 % раствором перекиси водорода в течение 15 мин. После этого семена заливали прокипяченной водопроводной водой (60°C) и помещали в термостат для набухания при 22°C в течение 48 ч. Для исследований отбирали однородные проростки с длиной корней 25-30 мм (исходный растительный материал для экспериментов).

Содержание NO в тканях корня определяли с использованием флуоресцентного зонда 4,5-диаминофлуоресцеин-диацетата (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). Перед окрашиванием исходные 2-суточные проростки экспонировали на соответствующих средах ( $\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{CaCl}_2$ ) в течение необходимого времени: 5, 10, 15, 20, 25 и так далее минут. Затем отрезки корней (участки 5-15 мм от апекса) инкубировали в среде для окрашивания, содержащей 10 мкМ DAF-2DA и 10 мМ трис-HCl (pH 7,4), в течение 20 мин на шейкере, при 26°C. Интенсивность флуоресценции определяли на поперечных срезах (толщина 100 – 150 мкм) корней с использованием флуоресцентного микроскопа Axio Observer Z1 (Германия) с цифровой монохромной камерой Axio Cam MRm3 и пакетом программного обеспечения для захвата и анализа изо-

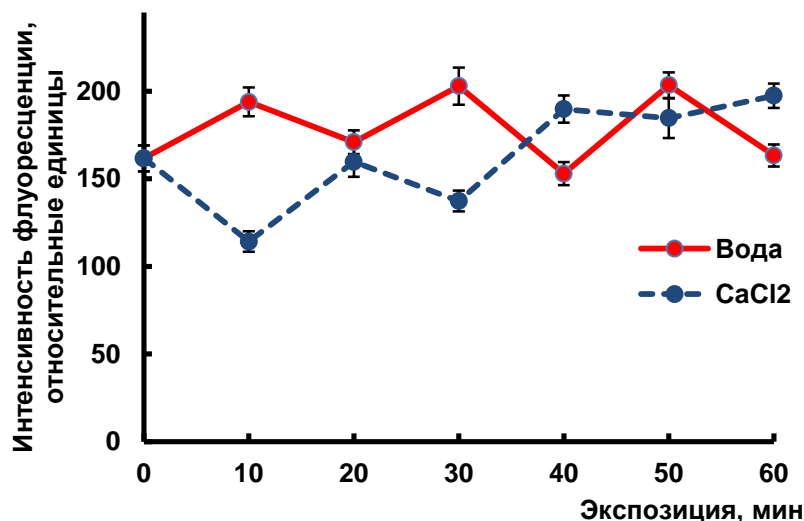
бражений Axio Vision Rel.4.6. Блок фильтров № 10, длина волны возбуждения 450-490 нм, эмиссия 515-565 нм. Результаты анализа срезов представлены в относительных единицах интенсивности флуоресцентного свечения.

Содержание общего кальция в корнях проростков определяли на атомно-абсорбционном спектрометре модели 403 фирмы Perkin Elmer (США) в пламени ацетилен-воздух. Для определения использовали корни, высушенные до воздушно-сухого состояния (в термостате при 110°C) которые тщательно промывали перед высушиванием дистиллированной водой. Сухую навеску корней (0,05 г) подвергали разложению (смесь  $\text{HNO}_3$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) с применением автоклавного комплекса Анкон-АТ. Смесь оставляли при комнатной температуре на 1 ч. Затем автоклавы герметизировали и помещали в электронагреватель на 2 ч при температуре 160°C (1 ч) и 200°C (1 ч). После охлаждения содержимое автоклавов количественно переносили в мерные колбы и определяли содержание кальция.

Значения представляют собой средние арифметические с указанием стандартной ошибки из трех независимых экспериментов, проведенных в трехкратной аналитической повторности. Число анализируемых срезов корней при микроскопических исследованиях не менее 10. Достоверность различий средних значений оценивали по *t*-критерию Стьюдента. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Microsoft Excel.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как следует из рис. 2, временная динамика содержания NO в пробах срезов корней проростков гороха, инкубируемых на кипяченной водопроводной воде и взятых через каждые 10 минут, характеризуется флуктуациями: возрастанием уровня NO через 10, 30 и 50 минут и снижением через 20, 40 и 60 минут. Флуктуации в уровне NO наблюдаются и на фоне действия экзогенного источника кальция (100 мкМ  $\text{CaCl}_2$ ). Однако временная зависимость флуктуаций уровня NO в этом случае иная: повышение уровня NO через 20, 40, 60 минут, снижение – через 10, 30, 50 минут. Подобная закономерность получена и в опыте, когда пробы корней брали через 5 мин (рис. 3). В то же время, как следует из рис. 3, четкая картина максимумов и минимумов в синтезе NO также наблюдается через 10 минут, что согласуется с данными, представленными на рис. 2. Таким образом, можно говорить об определенной



**Рис. 2.** Динамика уровня оксида азота в корнях этиолированных проростков гороха (взятие проб через 10 мин).

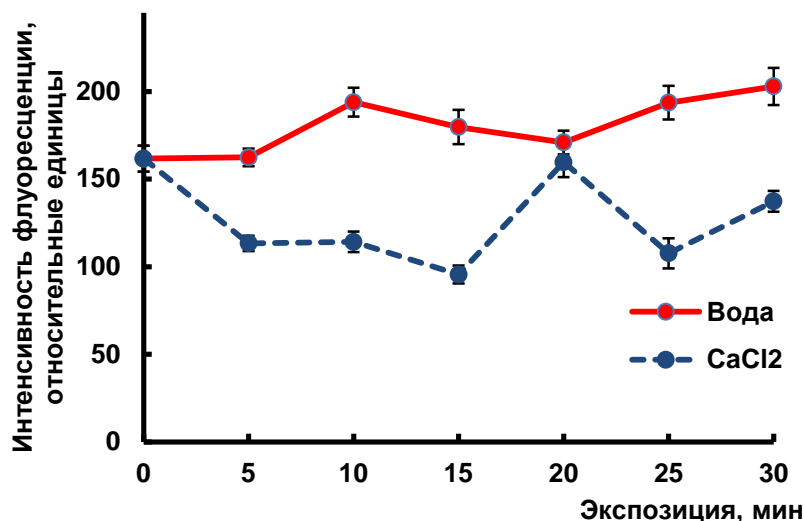
ритмичности в синтезе оксида азота в корнях этиолированных проростков гороха. При этом экзогенный кальций влияет на содержание оксида азота, изменяя временную амплитуду его синтеза и сохраняя ритмичность флуктуаций. Надо полагать, что подобное влияние экзогенного кальция связано с увеличением внутриклеточного и апопластного  $\text{Ca}^{2+}$ . Об этом косвенно можно судить по содержанию общего кальция в корнях исходных (2-суточных) этиолированных проростках гороха:  $860 \pm 36$  мкг/г сухого вещества ( $21,5 \pm 0,9$  мкмоль/г) в варианте с водой и  $1043 \pm 28$  мкг/г сухого вещества ( $26,0 \pm 0,7$  мкмоль/г) в варианте с экзогенным кальцием. То есть, на фоне  $\text{CaCl}_2$  содержание кальция в тканях корней было достоверно (на 21%) выше, чем при инкубации корней на воде.

Рассматривая экзогенный кальций как фактор внешней среды, можно предполагать, что не исключено подобное действие на синтез NO и других внешних факторов как абиотических, так и биотических, что может быть также связано с определенным ритмом его генерации. Полученные данные позволяют предполагать о существовании в корнях механизма, регулирующего синтез NO и, по-видимому, связанного с ионами кальция. Причем увеличение содержания  $\text{Ca}^{2+}$  в корнях за счет экзогенного кальция изменяет характер ритмичности синтеза NO, снижая уровень оксида азота и изменяя максимумы и минимумы в синтезе NO по сравнению с вариантом с водой. Примечательно, что в раннее проведенных нами опытах получены результаты, свидетельствующие о коле-

баниях в активности микросомальной НАДФН-оксидазы, локализованной на плазмалемме клеток и на мембранах органелл корня гороха (Глянько и др., 2012). Так, было установлено, что активность фермента на фоне экзогенного  $\text{CaCl}_2$  повышалась через 5 и 20 мин и снижалась через 10 и 30 мин. Эндогенный ритм активности НАДФН-оксидазы и генерации NO в корнях, по всей вероятности, свидетельствует о наличии в клетках механизма, регулирующего как образование оксида азота, так и АФК – продуктов функционирования НАДФН-оксидазы и супероксиддисмутазы (СОД). Это подтверждается данными литературы о том, что в ответ на различные факторы генерация NO и АФК в клетках происходит одновременно и изменения в концентрации одного из компонентов оказывает влияние на уровень другого (Neill et al., 2008). Подобный механизм, по-видимому, связан с гомеостазом ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , что выражается в пульсирующем изменении концентрации этого иона в цитоплазме ( $\text{Ca}^{2+}$ -волны). В последнее время это явление в литературе обозначается термином “ $\text{Ca}^{2+}$ -сигнатура” (calcium signatures), которое характеризует флуктуации в концентрации внутриклеточного кальция по таким параметрам, как амплитуда, частота, количество пульсов (Whalley, Knight, 2013).

Обсуждая возможный механизм, регулирующий оба физиологических процесса, следует прежде всего отметить необходимость ионов  $\text{Ca}^{2+}$  для реакций, осуществляющих генерацию NO. Выше уже обсуждались данные литерату-

## РИТМИЧНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ



**Рис. 3** Динамика уровня оксида азота в корнях этиолированных проростков гороха (взятие проб через 5 мин)

ры о возможной зависимости активности NOS-подобного фермента растений от ионов кальция. Доказана необходимость кальция для проявления активности НАДФН-оксидазы (Глянько и др., 2009). Можно заключить, что активация и ингибирование рассматриваемых физиологических процессов, по-видимому, связано с изменением концентрации цитозольного и апопластного кальция, обусловленного влиянием NO и, по-видимому, АФК на кальциевые каналы – их открытие и закрытие (Mori, Schroeder, 2004; Demidchik, Maathuis, 2007).

Таким образом, в настоящей работе в краткосрочных опытах обнаружен эндогенный ритм изменения содержания NO в тканях корня проростков гороха, характеризующийся во временной динамике увеличением и снижением уровня оксида азота и который подвержен влиянию экзогенного кальция. Физиологическая роль флуктуаций уровня NO (NO-волн) в клетках растений не изучена, хотя нет сомнения, что это связано с сигнальной функцией оксида азота.

### ЛИТЕРАТУРА

Глянько А.К., Ищенко А.А., Митанова Н.Б., Васильева Г.Г. НАДФН-оксидаза растений // *Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія.* – 2009. – Вип. 2 (17). – С. 6-18.

Глянько А.К., Ищенко А.А., Г.Г. Васильева. Влияние ионов кальция на активность НАДФН-оксидазы в корнях этиолированных проростков гороха

(*Pisum sativum* L.) // *Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія.* – 2012. – Вип. 2 (26). – С. 46-53.

Глянько А.К. Инициация синтеза оксида азота (NO) в корнях этиолированных проростков гороха (*Pisum sativum* L.) под влиянием N-соединений // *Биохимия.* – 2013. – Т. 78, № 5. – С. 620-626.

Денисенко В.Ю., Кузьмина Т.И. К вопросу идентификации путей внутриклеточной сигнализации // *Биохимия.* – 2013. – Т. 78, № 4. – С. 556-558.

Колупаев Ю.Е. Кальций и стрессовые реакции растений // *Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія.* – 2007. – Вип. 1 (10). – С. 24-41.

Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Участие оксида азота (NO) в трансдукции сигналов абиотических стрессоров у растений // *Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія.* – 2009. – Вип. 3 (18). – С. 6-19.

Медведев С.С. Кальциевая сигнальная система растительной клетки // *Клеточная сигнализация / Отв. ред. А.Н. Гречкин.* – Казань: ФЭН, 2010. – С. 26-36.

Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. – М.: Наука, 2002. – 295 с.

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.

Bogdan C. Nitric oxide and the regulation of gene expression // *Trends Cell Biol.* – 2001. – V. 11, № 1. – P. 66-75.

Clementi E. Role of nitric oxide and its intracellular signaling pathways in the control of Ca<sup>2+</sup> homeostasis //

- Biochem. Pharmacol. – 1998. – V. 55, № 6. – P. 713-718.
- Corpas F.J., Barroso J.B., Carreras A., Valderrama R., Palma J.M., Leon A.V., Sandalio L.M., del Rio L.A. Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development // *Planta*. – 2006. – V. 224, № 2. – P. 246-254.
- Courtois C., Besson A., Dahan J., Bourque S., Dobrowolska G., Pugin A., Wendehenne D. Nitric oxide signaling in plants: interplays with  $Ca^{2+}$  and protein kinases // *J. Exp. Bot.* – 2008. – V. 59, № 2. – P. 155-163.
- Demidchi V., Maathuis F.J. Physiological roles of non-selective cation channels in plants: from salt stress to signaling and development // *New Phytol.* – 2007. – V. 175, № 3. – P. 387-404.
- Garcia-Mata C., Gay R., Sokolovski S., Hills A., Lamattina L., Blatt M.R. Nitric oxide regulates  $K^+$  and  $Cl^-$  channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways // *Proc. Natl. Acad. USA*. – 2003. – V. 100, № 19. – P. 11116-11121.
- Glyan'ko A.K., Mitanova N.B., Stepanov A.V. The physiological role of nitric oxide (NO) in plants // *Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія*. – 2010. – Вип. 1 (19). – С. 6-20.
- Gupta K.J., Fernie A.R., Kaiser W.M., van Dongen J.T. On the origins of nitric oxide // *Trends Plant Sci.* – 2011. – V. 16, № 3. – P. 160-168.
- Lamotte O., Gould K., Lecourieux D., Sequeira-Legrand A., Lebrun-Garcia A., Durner J., Pugin A., Mori I.C., Schroeder J.I. Reactive oxygen species activation of plant  $Ca^{2+}$  channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction // *Plant Physiol.* – 2004. – V. 135, № 2. – P. 702-708.
- Nakatsubo N., Kojima H., Kikuchi K., Nagoshi H., Hirata Y., Maeda D., Imai J., Irimura T., Nagano T. Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins // *FEBS Lett.* – 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.
- Reddy A.S.N. Calcium: Siler bullet in signaling // *Plant Sci.* – 2001. – V.160, № 3. – P. 381-404.
- Vandelle E., Poinssot B., Wendehenne D., Bentejac M., Pugin A. Integrated signaling network involving calcium, nitric oxide, active oxygen species but not mitogen-activated protein kinases in BcPG1-elicited grapevine defenses // *Mol. Plant-Microbe Interact.* – 2006. – V. 19, № 4. – P. 429-440.
- Wendehenne D. Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein // *Plant Physiol.* – 2004. – V. 135, № 1. – P. 516-529.
- Whalley H.J., Knight M.R. Calcium signatures are decoded by plants to give specific gene responses // *New Phytol.* – 2013. – V. 197, № 3. – P. 690-693.

Поступила в редакцію  
05.08.2013 з.

## DYNAMICS OF SYNTHESIS NITRIC OXIDE (NO) IN ROOTS ETIOLATED SEEDLINGS OF PEA (*PISUM SATIVUM L.*)

A. K. Glyan'ko<sup>1</sup>, A. A. Ischenko<sup>1</sup>, A. V. Stepanov<sup>1</sup>, G. G. Vasil'eva<sup>1</sup>, O.A. Projdakova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>State Federal Budget Institution  
of Science Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry  
Siberian Division of the Russian Academy Sciences  
(Irkutsk, Russia)

<sup>2</sup>State Federal Budget Institution  
of Science Institute of Geochemistry  
Siberian Division of the Russian Academy Sciences  
(Irkutsk, Russia)

Time dynamics (during 30 and 60 minutes) of generation nitric oxide (NO) were studied in roots of etiolated pea seedlings of 48 h age. During an exposition of seedlings on water and  $CaCl_2$  solution (100  $\mu M$ ) fluctuations of level nitric oxide in roots – its increase and decrease, are shown. Physiological role of fluctuation of level nitric oxide in root and participation ions calcium in this process are discussed.

**Key words:** *Pisum sativum L.*, ions  $Ca^{2+}$ , nitric oxide (NO), fluorescent probe

## **РИТМИЧНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ**

### **РИТМІЧНІ ЗМІНИ ВМІСТУ ОКСИДУ АЗОТУ (NO) У КОРЕНЯХ ЕТІОЛЬОВАНИХ ПРОРОСТКІВ ГОРОХУ (*PISUM SATIVUM L.*)**

А. К. Глянько<sup>1</sup>, О. О. Іщенко<sup>1</sup>, Г. Г. Васильєва<sup>1</sup>, О. В. Степанов<sup>1</sup>, О. А. Пройдакова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Федеральна державна бюджетна установа науки  
Сибірський інститут фізіології і біохімії рослин  
Сибірського відділення Російської академії наук  
(Іркутськ, Росія)

<sup>2</sup>Федеральна державна бюджетна установа науки  
Інститут геохімії Сибірського відділення  
Російської академії наук  
(Іркутськ, Росія)

Вивчено часову динаміку (протягом 30 і 60 хв) генерації оксиду азоту (NO) в коренях дводобових етіольованих проростків гороху посівного. Протягом експозиції проростків на воді і розчині CaCl<sub>2</sub> (100 мкМ) показані флуктуації рівня оксиду азоту в коренях – його підвищення і зниження. Обговорюється фізіологічна роль флуктуацій вмісту оксиду азоту в корені і участь іонів кальцію у цьому процесі.

**Ключові слова:** *Pisum sativum L.*, іони кальцію, оксид азоту (NO), флуоресцентний зонд