

Ю. В. Карпец, Ю. Е. Колупаев, Т. О. Ястреб,
член-корреспондент НАН Украины А. П. Дмитриев

Возможное взаимодействие сигнальных систем при индуцировании устойчивости растительных клеток к тепловому стрессу

Обработка колеоптилей пшеницы донором оксида азота (NO) нитропруссидом натрия вызывала усиление образования супероксидного анион-радикала ($O_2^{\bullet-}$) и повышение их теплоустойчивости. Этот эффект подавлялся ингибитором образования фосфатидной кислоты (бутанолом-1). При одновременной обработке колеоптилей донором NO, бутанолом-1 и кальциевым ионофором A23187 последний компенсировал угнетение бутанолом-1 NO-зависимого усиления генерации $O_2^{\bullet-}$. Установлено взаимодействие NO-синтазной, НАДФН-оксидазной, фосфатидатной и кальциевой сигнальных систем при индуцировании устойчивости колеоптилей пшеницы к тепловому стрессу.

Оксид азота (NO) — молекула со свойствами радикала, являющаяся важным компонентом каскада защитных реакций, которые участвуют в обеспечении устойчивости растений к биотическим и абиотическим стрессам [1, 2]. Эффекты NO реализуются в тесной взаимосвязи с другими сигнальными молекулами, в том числе с активными формами кислорода (АФК) [3]. Под действием NO у растений повышается активность НАДФН-оксидазы — одного из основных источников АФК [4]. АФК играют важную роль в регуляции защитных механизмов растений, они не только оказывают прямое антимикробное действие, но и являются вторичными мессенджерами НАДФН-оксидазной сигнальной системы.

Известна также способность NO повышать активность стартового фермента фосфатидатной сигнальной системы фосфолипазы D (ФЛД), что приводит к увеличению содержания фосфатидной кислоты (ФК), которая является важным вторичным мессенджером липидного сигналинга [5]. К числу белков, активируемых ФК, относится и НАДФН-оксидаза [6, 7]. Один из механизмов влияния ФК на активность НАДФН-оксидазы может быть связан с повышением активности ФК-специфичной протеинкиназы, участвующей в активации НАДФН-оксидазы, хотя наличие такого механизма доказано только для животных клеток [6]. С другой стороны, показано, что ФК в растительных клетках может функционировать как кальциевый ионофор [8] и способствовать поступлению кальция в цитозоль. Известно, что НАДФН-оксидаза относится к ферментам, регулируемым Ca^{2+} [9]. Таким образом, нельзя исключить, что влияние ФК на НАДФН-оксидазу может быть также опосредовано кальцием.

Наша цель состояла в изучении взаимодействия NO-синтазной, НАДФН-оксидазной, фосфатидатной и кальциевой сигнальных систем при индуцировании теплоустойчивости пшеницы. Для этого исследовали влияние донора NO нитропрусида натрия (НПН) на образование супероксидного анион-радикала колеоптилями пшеницы и их устойчивость к повреждающему прогреву на фоне обработки ингибитором ФЛД-зависимого образования ФК (бутанолом-1) и/или кальциевым ионофором (A23187).

В работе использовали отрезки колеоптилей, отделенные от 4-дневных этиолированных проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Элегия. Колеоптили пшеницы считаются

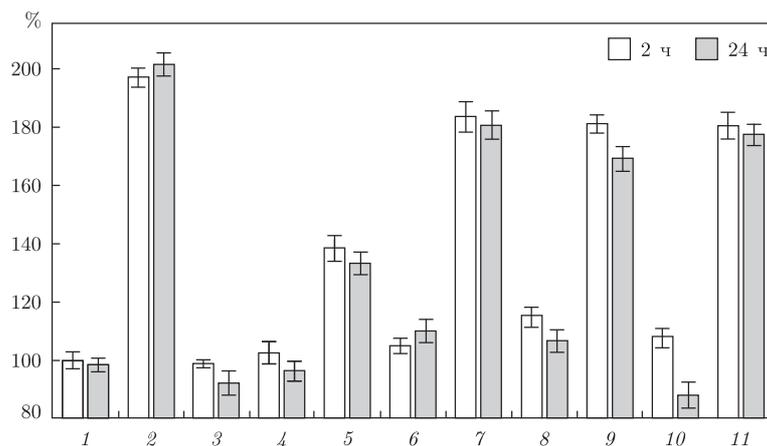


Рис. 1. Генерация супероксидного анион-радикала колеоптилями пшеницы (% к исходной величине в контроле).

Здесь и на рис. 2: 1 — контроль; 2 — НПН (500 мкМ); 3 — ФЦК (500 мкМ); 4 — бутанол-1 (0,2 %); 5 — НПН (500 мкМ) + бутанол-1 (0,2 %); 6 — бутанол-2 (0,2 %); 7 — НПН (500 мкМ) + бутанол-2 (0,2 %); 8 — А23187 (1 мкМ); 9 — НПН (500 мкМ) + А23187 (1 мкМ); 10 — бутанол-1 (0,2 %) + А23187 (1 мкМ); 11 — НПН (500 мкМ) + бутанол-1 (0,2 %) + А23187 (1 мкМ)

адекватной моделью для исследования действия экзогенных соединений на устойчивость растений, определяющуюся преимущественно клеточными механизмами [10]. Средой инкубации колеоптилей контрольного варианта служила 2% сахароза с добавлением натриевой соли пенициллина (100 тыс. ед./л). Обработку колеоптилей НПН (500 мкМ) проводили в течение 24 ч путем внесения его в указанную среду инкубации. В качестве контроля к НПН использовали его неактивный структурный аналог ферроцианид калия (ФЦК) [4]. В соответствующих вариантах опыта колеоптили обрабатывали в течение 26 ч 0,2% бутанолом-1 — ингибитором зависимого от ФЛД образования ФК либо его неактивным аналогом 0,2% бутанолом-2 [5]. В вариантах с комбинированной обработкой колеоптилей НПН и бутанолом-1 или бутанолом-2 соответствующие спирты вносили в среду инкубации колеоптилей за 2 ч до добавления в нее НПН. На среде, содержащей 1 мкМ кальциевый ионофор А23187, колеоптили инкубировали 24 ч. При исследовании комбинированного действия НПН и ионофора последний вносили в среду инкубации колеоптилей одновременно с НПН. Концентрации исследуемых соединений были выбраны по результатам предварительных опытов.

Интенсивность генерации супероксидного анион-радикала ($O_2^{\bullet-}$) оценивали по восстановлению нитросинего тетразолия [10]. Генерацию $O_2^{\bullet-}$ колеоптилями определяли через 2 и 24 ч после их обработки.

После инкубации на растворах исследуемых соединений колеоптили подвергали повреждающему прогреву в ультратермостате при 44 °С. Затем отрезки в течение 2 сут продолжали инкубировать на 2% сахарозе с добавлением пенициллина, после чего оценивали их выживание [10].

На рисунках приведены средние значения трех независимых экспериментов, каждый из которых был проведен в 3-кратной повторности, и их стандартные отклонения.

Под влиянием донора оксида азота НПН происходило 2-кратное увеличение генерации супероксидного анион-радикала колеоптилями (рис. 1). Неактивный аналог НПН ФЦК не оказывал достоверного влияния на образование $O_2^{\bullet-}$, что свидетельствует о специфичности действия НПН как донора NO.

Обработка колеоптилей антагонистом ФЛД-зависимого образования ФК бутанолом-1 существенно не влияла на генерацию супероксидного анион-радикала. Однако при этом бутанол-1 более чем на 60% снижал эффект усиления генерации $O_2^{\bullet-}$, вызываемый экзогенным NO (см. рис. 1). 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.

Кальциевый ионофор A23187 вызывал небольшое усиление генерации супероксидного анион-радикала, которое было достоверным только через 2 ч после начала обработки колеоптилей (см. рис. 1). В то же время при комбинированной обработке ионофор частично снимал усиление образования $O_2^{\bullet-}$, вызываемое донором NO. Особенно заметным данный эффект был через 24 ч после начала инкубации. Вероятной причиной этого могло быть избыточное накопление кальция, связанное с одновременным его поступлением с помощью ионофора и влиянием NO на потоки экстра- и внутриклеточного Ca^{2+} [11]. Избыток кальция может ингибировать взаимодействие цитозольной и мембранной субъединиц НАДФН-оксидазы и тем самым снижать ее активность [12].

В варианте с комбинированным действием ионофора A23187 и бутанола-1 уровень генерации супероксида колеоптилями не отличался от контрольного. Иным оказалось влияние кальциевого ионофора на генерацию $O_2^{\bullet-}$ 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 супероксида, вызываемое бутанолом-1 (см. рис. 1). 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 в данном случае ионофор, усиливая поступление кальция, компенсировал недостаток ФК, которая может проявлять свою физиологическую активность в том числе и благодаря свойству кальциевого ионофора [8]. Вполне естественно, что полученные результаты не являются однозначным доказательством того, что индуцированное NO усиление генерации супероксидного анион-радикала 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 [7]. Нельзя исключить, что ФК и ионы кальция влияют на активность НАДФН-оксидазы независимо друг от друга. В этом случае введение в среду инкубации колеоптилей ионофора и усиление поступления кальция в цитозоль могло частично компенсировать отсутствие активации НАДФН-оксидазы ФК, обусловленное действием бутанола-1.

Усиление генерации АФК колеоптилями пшеницы под влиянием NO рассматривается нами как эффект, необходимый для индуцирования теплоустойчивости колеоптилей. С учетом возможной зависимости активности НАДФН-оксидазы от ФК и ионов кальция представлялось целесообразным изучить влияние антагониста образования ФК бутанола-1 и кальциевого ионофора, а также их комбинаций с донором NO на устойчивость пшеницы к тепловому стрессу.

Обработка колеоптилей НПН заметно увеличивала процент их выживания после повреждающего прогрева, а неактивный аналог донора оксида азота ФЦК такого действия не оказывал (рис. 2). Бутанол-1 существенно не влиял на устойчивость колеоптилей к прогреву, но в то же время в значительной степени нивелировал повышение теплоустойчивости колеоптилей, вызываемое донором NO. Бутанол-2 не оказывал влияния на проявление эффекта донора NO на теплоустойчивость.

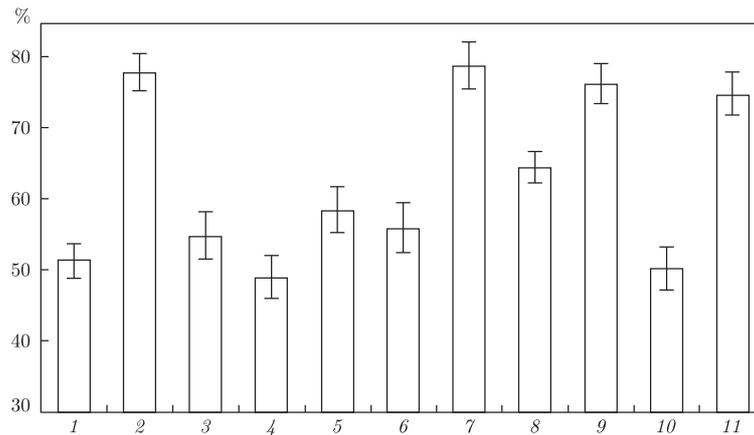


Рис. 2. Выживание (%) coleoptилей пшеницы после повреждающего нагрева (44 °С, 10 мин)

Кальциевый ионофор A23187 сам по себе незначительно, но достоверно, повышал теплоустойчивость coleoptилей пшеницы (см. рис. 2). В варианте с обработкой coleoptилей кальциевым ионофором в сочетании с НПН ни аддитивности, ни антагонизма эффектов не наблюдали. При комбинированной обработке coleoptилей бутанолом-1 и ионофором их выживаемость после прогрева была на уровне контроля. В то же время обработка coleoptилей кальциевым ионофором в значительной степени компенсировала вызываемое бутанолом-1 снятие положительного влияния НПН на теплоустойчивость coleoptилей (см. рис. 2).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о возможном взаимодействии сигнальных молекул кальциевой, НАДФН-оксидазной и NO-синтазной сигнальных систем при индуцировании устойчивости пшеницы к тепловому стрессу. Так, ФК и Ca^{2+} могут принимать участие в активации НАДФН-оксидазы и усилении генерации АФК, которые, по-видимому, участвуют в трансдукции сигнала NO к факторам регуляции транскрипции защитных генов.

Одним из механизмов взаимодействия NO-синтазной и НАДФН-оксидазной сигнальных систем может быть предварительная активация оксидом азота ФЛД, вызывающая накопление ФК. Последняя может индуцировать транспорт ионов Ca^{2+} по градиенту концентрации, т. е. обладает функцией кальциевого ионофора. Как известно, ФК может активировать и фосфолипазу С (ФЛС) [13], стартовый фермент кальциевой сигнальной системы [14]. Такие эффекты, вызывающие повышение концентрации кальция, могут способствовать активации НАДФН-оксидазы и усилению генерации АФК, выполняющих роль вторичных мессенджеров и для NO-синтазной сигнальной системы.

С другой стороны, влияние ФК и ионов Ca^{2+} на генерацию АФК, индуцируемую экзогенным оксидом азота, может происходить и независимыми путями. Имеются сведения, указывающие на возможность прямой активации НАДФН-оксидазы ионами кальция [12] и ФК [7]. Наконец, следует отметить, что усиление образования ФК в растительных клетках под влиянием NO может происходить не только за счет активации ФЛД, но и за счет повышения активности ФЛС, образования диацилглицерола и последующего его фосфорилирования диацилглицеролкиназой [15]. При этом продукты реакций, катализируемых ФЛД и ФЛС, могут оказывать влияние на кальциевый гомеостаз. С другой стороны, эти же ферменты могут активироваться ионами кальция [14]. Таким образом, между различными сигнальными системами клеток растений существуют прямые и обратные связи, обеспе-

чиваючі їх взаємодіє для розвитку стійкості до біотических і абіотических стресам.

1. *Дмитрієв А. П.* Сигнальна роль оксиду азоту у рослин // Цитологія і генетика. – 2004. – **38**, № 4. – С. 67–75.
2. *Zhang L., Zhou S., Xuan Y. et al.* Protective effect of nitric oxide against oxidative damage in *Arabidopsis* leaves under ultraviolet-B irradiation // J. Plant Biol. – 2009. – **52**. – P. 135–140.
3. *Wilson I. D., Neill S. J., Hancock J. T.* Nitric oxide synthesis and signalling in plants // Plant Cell Environ. – 2008. – **31**. – P. 622–631.
4. *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.
5. *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.
6. *Wang X.* The role of phospholipase D in signaling cascades // Ibid. – 1999. – **120**. – P. 645–652.
7. *Sang Y., Cui D., Wang X.* Phospholipase D and phosphatidic acid-mediated generation of superoxide in *Arabidopsis* // Ibid. – 2001. – **126**. – P. 1449–1458.
8. *Медведев С. С., Танкемон О. В., Батов А. Ю. и др.* Ионофорные функции фосфатидной кислоты в растительной клетке // Физиология растений. – 2006. – **53**, № 1. – С. 45–53.
9. *Sagi M., Fluhr R.* Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases // Plant Physiol. – 2006. – **141**. – P. 336–340.
10. *Карпец Ю. В., Колупаев Ю. Е., Швиденко Н. В.* Замедление процесса гибели клеток в сегментах coleoptiles пшеницы, инкубируемых на растворе сахарозы // Физиология и биохимия культ. растений. – 2011. – **43**, № 6. – С. 513–519.
11. *Besson-Bard A., Pugin A., Wendehenne D.* New insights into nitric oxide signaling in plants // Annu. Rev. Plant Biol. – 2008. – **59**. – P. 21–39.
12. *Глянько А. К., Ищенко А. А.* Структурные и функциональные особенности НАДФН-оксидазы растений (обзор) // Прикл. биохимия и микробиология. – 2010. – **46**, № 5. – С. 509–518.
13. *Ryu S. B., Wang X.* Increase in free linolenic and linoleic acids associated with phospholipase D-mediated hydrolysis of phospholipids in wounded castor leaves // Biochim. Biophys. Acta – 1998. – **1393**. – P. 193–202.
14. *Тарчевский И. А.* Сигнальные системы клеток растений. – Москва: Наука, 2002. – 294 с.
15. *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.

Харьковский национальный аграрный университет им. В. В. Докучаева
Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев

Поступило в редакцию 02.02.2012

Ю. В. Карпец, Ю. Є. Колупаєв, Т. О. Ястреб,
член-кореспондент НАН України **О. П. Дмитрієв**

Можлива взаємодія сигнальних систем при індукуванні стійкості рослинних клітин до теплового стресу

Обробка coleoptilів пшениці донором оксиду азоту (NO) нітропрусидом натрію викликала посилення утворення супероксидного аніон-радикала ($O_2^{\bullet-}$) і підвищення їх теплостійкості. Цей ефект пригнічувався інгібітором утворення фосфатидної кислоти (бутанолом-1). У разі одночасної обробки coleoptilів донором NO, бутанолом-1 і кальцієвим іонофором A23187 останній компенсував пригнічення бутанолом-1 NO-залежного посилення генерації $O_2^{\bullet-}$. Встановлено взаємодію NO-синтазної, НАДФН-оксидазної, фосфатидатної і кальцієвої сигнальних систем при індукуванні стійкості coleoptilів пшениці до теплового стресу.

Yu. V. Karpets, Yu. Ye. Kolupaev, T. O. Yastreba,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine **O. P. Dmitriev**

**Possible interaction of signal systems at the induction of plant cells
resistance to heat stress**

Treatment of wheat coleoptiles with nitrogen oxide (NO) donor sodium nitroprusside increases the superoxide anion-radical ($O_2^{\bullet-}$) generation and the coleoptiles resistance to heat stress. This effect is suppressed by the inhibitor of phosphatidic acid formation (butanol-1). At the combined treatment of coleoptiles with the NO donor, butanol-1, and calcium ionophore A23187, the last one compensated a suppression of the NO-dependent increase of $O_2^{\bullet-}$ generation caused by butanol-1. The interaction of NO-synthase, NADPH-oxylase, phosphatidate, and calcium signal systems at the induction of the wheat coleoptiles resistance to heat stress is established.