

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ РИЗОБИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ И ДРУГИХ ФАКТОРОВ НА ГЕНЕРАЦИЮ ОКСИДА АЗОТА (NO) В КОРНЯХ ЭТИОЛИРОВАННЫХ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА

© 2010 г. А. К. Глянько, Н. Б. Митанова, А. В. Степанов

Сибирский институт физиологии и биохимии растений

Сибирского отделения Российской академии наук

(Иркутск, Россия)

Изучали содержание оксида азота (NO) в корнях этиолированных проростков гороха (сорт Ямальский) с помощью флуоресцентной микроскопии на поперечных срезах корня (100-150 мкм, участок 10-20 мм от апекса). Показано, что содержание NO в корнях неинкулированных проростков гороха через 24 ч увеличивалось более чем в 2 раза в вариантах с нитритом (NaNO₂) и нитропруссидом натрия. В варианте с нитратом (KNO₃) при экспозиции 24 ч увеличения содержания NO в корнях не наблюдалось. Пик в накоплении оксида азота в корнях (увеличение в два раза) на фоне нитратной соли наблюдался при краткосрочной экспозиции (30 мин). Ризобияльная инфекция и гемоглобин снижали уровень NO в корнях гороха в вариантах с водой, нитропруссидом натрия и азотными солями. Результаты обсуждаются в связи с влиянием NO на процессы симбиотрофного взаимодействия ризобий и бобового растения.

Ключевые слова: *Pisum sativum L.*, оксид азота (NO), бобово-ризобияльный симбиоз, ризобияльная инфекция, гемоглобин, нитропруссид натрия, нитраты, нитриты, флуоресцентная микроскопия

Бобово-ризобияльный симбиоз (БРС) – межвидовое сообщество, образуемое бобовыми растениями (*Leguminosae*) и клубеньковыми бактериями (*Rhizobium leguminosarum*). В отличие от патогенеза, БРС – полезное для обоих организмов сожительство. Клубеньковым бактериям (ризобиям) это сожительство позволяет избежать конкуренции за источники питания в почвенной среде, а растениям получать необходимый для жизнедеятельности минеральный азот в виде NH₃ из недоступного молекулярного азота воздуха (N₂). Формирование БРС происходит под «строгим» контролем растения-хозяина с помощью различных механизмов: генетических, биохимических, физиологических, морфо-цитологических, экологических и др. (*Rhizobiaceae* ..., 2002).

В последние годы увеличивается количество работ с экспериментальным доказательством

важной роли активных форм кислорода (АФК) и азота (АФА) в формировании и функционировании БРС (Santos et al., 2001; Herouart et al., 2002; Ramu et al., 2002; Shaw, Long, 2003; Васильева и др., 2007). Но если участие активных форм радикалов в защитных реакциях растений при патогенезе не вызывает сомнений (Максимов, Черепанова, 2006), то функциональная роль АФК и АФА при БРС менее ясна. Результаты исследований в этом направлении обсуждались в ряде работ (Garcia-Garrido, Ocampo, 2002; Pauly et al., 2006; Baptista et al., 2007; Глянько и др., 2007; Глянько, Васильева, 2007; Chang et al., 2009).

Необходимо отметить, что образование АФК и АФА в процессе развития симбиотического взаимодействия является основным признаком сходства ранних ответов растения на инфекцию патогенами и симбиотрофами (Parniske, 2000). На основании литературных данных можно предполагать о важной роли АФК в формировании и развитии БРС (Глянько, Васильева, 2007). Что касается АФА, к которым в первую очередь следует отнести оксид

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

ВЛИЯНИЕ РИЗОБИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ

азота (NO) – многофункциональную, высокорекреационную молекулу (Меньщикова и др., 2000; Глянько и др., 2009б, Колупаев, Карпец, 2009), их роль в формировании и функционировании БРС практически не изучена. По данным Baudouin et al. (2006), синтез NO наблюдался в зрелых клубеньках люцерны. Но нет данных о синтезе и роли NO в корнях бобовых растений на начальных этапах формирования БРС. По нашим данным, экзогенный NO в виде донора оксида азота (нитропруссид натрия) отрицательно влиял на рост как клубеньковых бактерий, так и бобового растения (Глянько и др., 2009а). При этом степень токсического действия нитропруссид натрия на организмы была дозозависимой.

В связи с этим цель наших исследований состояла в изучении содержания эндогенного оксида азота в корнях этиолированных проростков гороха в зависимости от действия экзогенных факторов с использованием метода флуоресцентной микроскопии.

МЕТОДИКА

Объектом исследования служили этиолированные проростки гороха (*Pisum sativum* L.) сорта Ямальский (селекция ЗАО «НПФ Сибирская аграрная компания», Россия). Семена, поверхностно стерилизованные в течение 15 мин 3% раствором пероксида водорода и затем тщательно промытые дистиллированной водой, проращивали в кюветах на влажной фильтровальной бумаге при температуре 22°C в течение 2 сут, считая с момента замачивания. Для исследований отбирали однородный материал. Критерием однородности служила длина корней (включая эпикотиль) 25-30 мм.

Для дальнейшего роста проростки помещали в кюветы на фильтровальную бумагу, смоченную заданными растворами. Для ризобияльной инокуляции использовали штамм клубеньковых бактерий *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* (SIAM 1026), который был получен из коллекции Государственного учреждения Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии РАСХН (Россия). Инокуляцию отрезков корней (участок 10-20 мм от апекса) проводили суспензией клеток ризобий в концентрации $2 \cdot 10^4$ клеток / 1 мкл на 200 мкл среды.

Для окрашивания срезов использовали флуоресцентный зонд 4,5-диаминофлуоресцин диацетат (DAF-2DA). Для этого срезы корней инкубировали с 10 мкМ DAF-2DA в 10 мМ Tris-HCl (pH 7,4) в течение 30 мин при температуре 26°C (Nakatsubo et al., 1998; Gould et al., 2003).

Этот краситель высокоспецифичен для NO. DAF-2DA проникает через клеточную мембрану и деацетилирует с помощью внутриклеточных эстераз в 4,5-диаминофлуоресцин (DAF-2), который реагирует с NO с образованием флуоресцирующего соединения – диаминотриазолфлуоресцеин триазола (DAF-2T). Поперечные срезы корня толщиной 100-150 мкм (участок корня 10-20 мм от апекса) анализировали на флуоресцентном микроскопе Axio Observer Z1 (Carl Zeiss) с цифровой монохромной камерой Axio Cam 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.

Результаты представлены как средние арифметические значения и их стандартные ошибки из трех независимых экспериментов, проведенных в трехкратной биологической повторности. Достоверность различий средних значений оценивали по критерию Стьюдента. Статистическая обработка данных проведена с помощью пакета программ Microsoft Excel.

Реактивы: гемоглобин из эритроцитов лошади (MP Biomedicals, USA); DAF-2DA (Calbiochem, Germany); нитропруссид натрия (MP Biomedicals, USA); KNO_3 , $NaNO_2$ (Реахим, Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние абиотических факторов на уровень NO в корнях проростков гороха

Мы изучили влияние нитропруссид натрия, KNO_3 и $NaNO_2$ на уровень оксида азота (NO) в корнях двухсуточных этиолированных проростков гороха. Результаты опытов представлены на рис. 1-5. Следует отметить, что флуоресцентное свечение в наших опытах наблюдалось главным образом в поверхностных – эпидермальных клетках корня. Это свидетельствует, по видимому, о том, что реакции синтеза NO локализованы в этих клетках, а образовавшийся NO служит первичным сенсором для различных абиотических и биотических стрессоров.

При экспозиции двухсуточных неинокулированных проростков на указанных веществах в течение 24 ч выявлено следующее. Нитропруссид натрия (экзогенный донор NO) в концентрации 4 мМ увеличивал уровень оксида азота в корне в 1,8-2,4 раза по сравнению с вариантом на воде (контроль) (рис. 1, 2). В вариантах с KNO_3 (2 и 20 мМ) уровень NO в корне не изменялся через 24 ч по сравнению с контролем

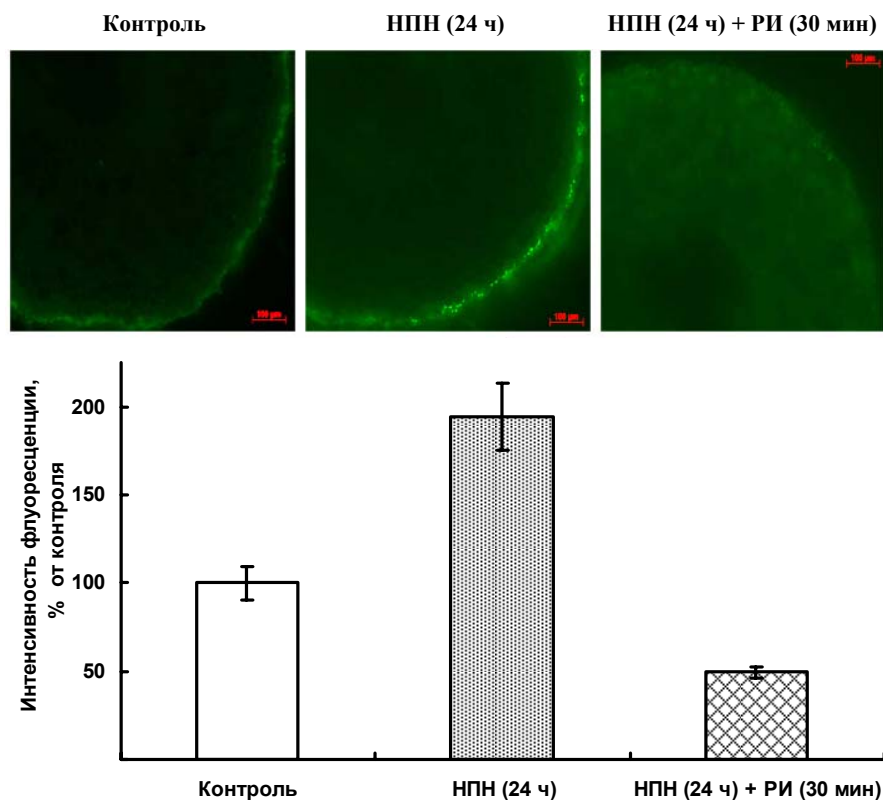


Рис. 1. Влияние нитропруссид натрия (НПН, 4 мМ) и ризобияльной инфекции (РИ) на содержание NO в корнях проростков гороха.

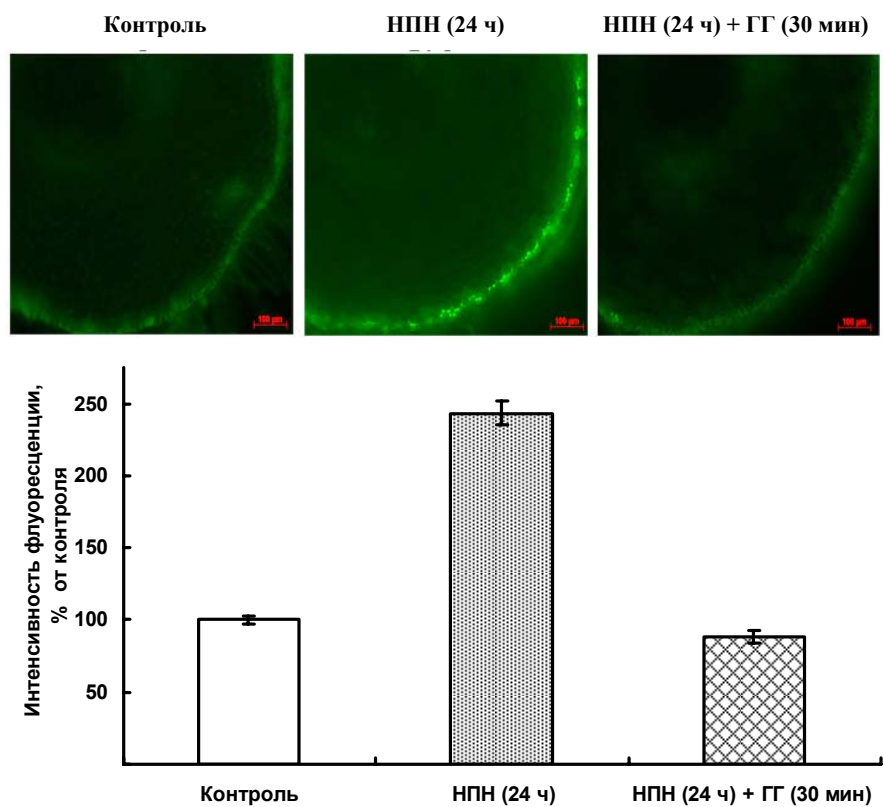


Рис. 2. Влияние нитропруссид натрия (НПН, 4 мМ) и гемоглобина (ГГ, 4 мкМ) на содержание NO в корнях проростков гороха.

ВЛИЯНИЕ РИЗОБИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ

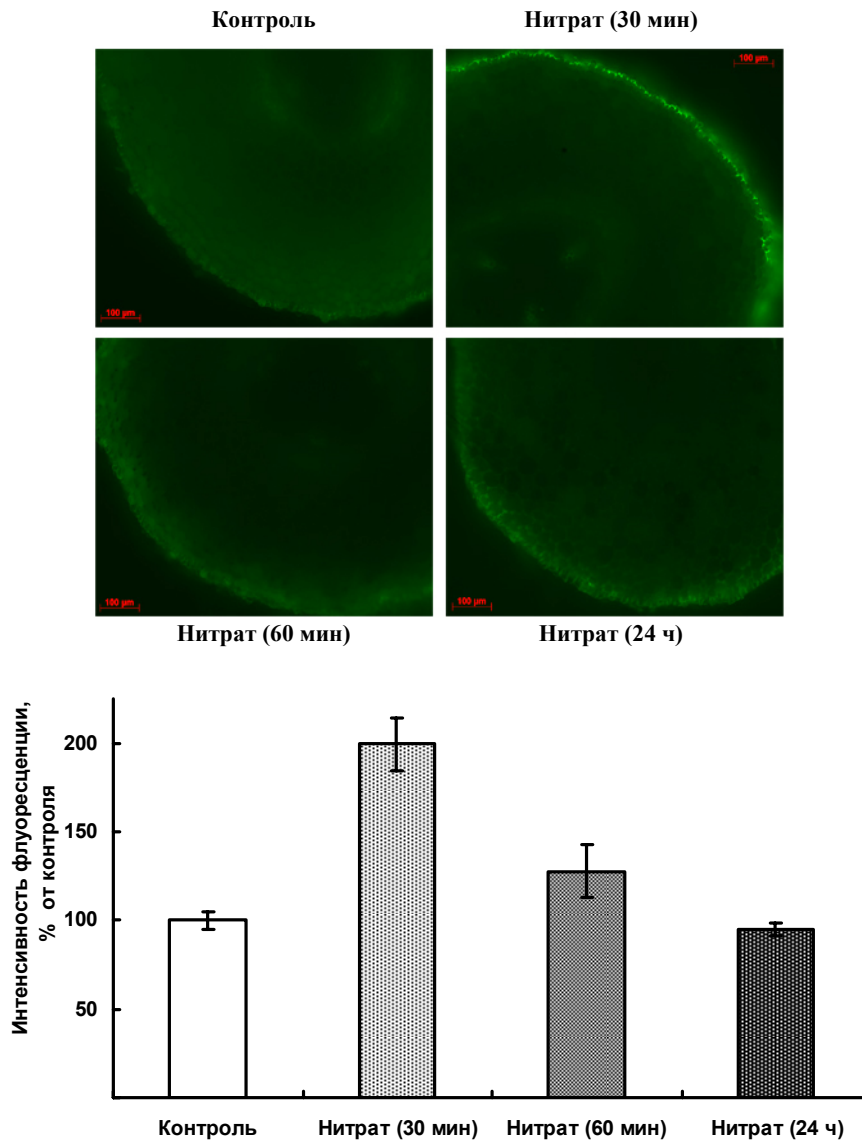


Рис. 3. Влияние нитрата калия (2 мМ) на содержание NO в корнях проростков гороха.

(рис. 3, 4). Действие NaNO_2 (2 мМ) через 24 ч способствовало увеличению уровня NO в корнях в 2,3 раза и было аналогично действию нитропруссид натрия (рис. 5).

В опытах с краткосрочными экспозициями (30 и 60 мин) влияние нитратной и нитритной солей на уровень оксида азота носило другой характер по сравнению с экспозицией 24 ч. Так, при экспозиции 30 мин в варианте с KNO_3 (2 и 20 мМ) наблюдалось увеличение уровня NO в корне в 1,8-2,0 раза, а через 60 мин – снижение до уровня контроля (рис. 3, 4). Противоположная картина отмечалась в варианте с NaNO_2 : через 30 мин происходило небольшое снижение уровня NO в корне по сравнению с контролем, через 60 мин – достоверное повышение (на 25-30%), а через 24 ч более чем 2-кратное увеличение NO (рис. 5).

Полученные результаты свидетельствуют о преходящем, временном характере регуляции уровня оксида азота в корнях проростков гороха под влиянием азотных соединений. Причем эндогенный уровень оксида азота, оцениваемый по интенсивности флуоресцентного свечения, зависит от вида экзогенного фактора. Так, если содержание эндогенного NO в корнях при воздействии на растения экзогенного нитропруссид натрия определяется, очевидно, скоростью освобождения NO из этого соединения в клетках, то в случае с нитратной и нитритной солью эндогенный уровень NO зависит, по видимому, от скорости восстановления NO_3^- и NO_2^- или от их влияния на сигнальные пути, инициирующие синтез NO с помощью других механизмов, например, ферментов с NO-синтазной активностью.

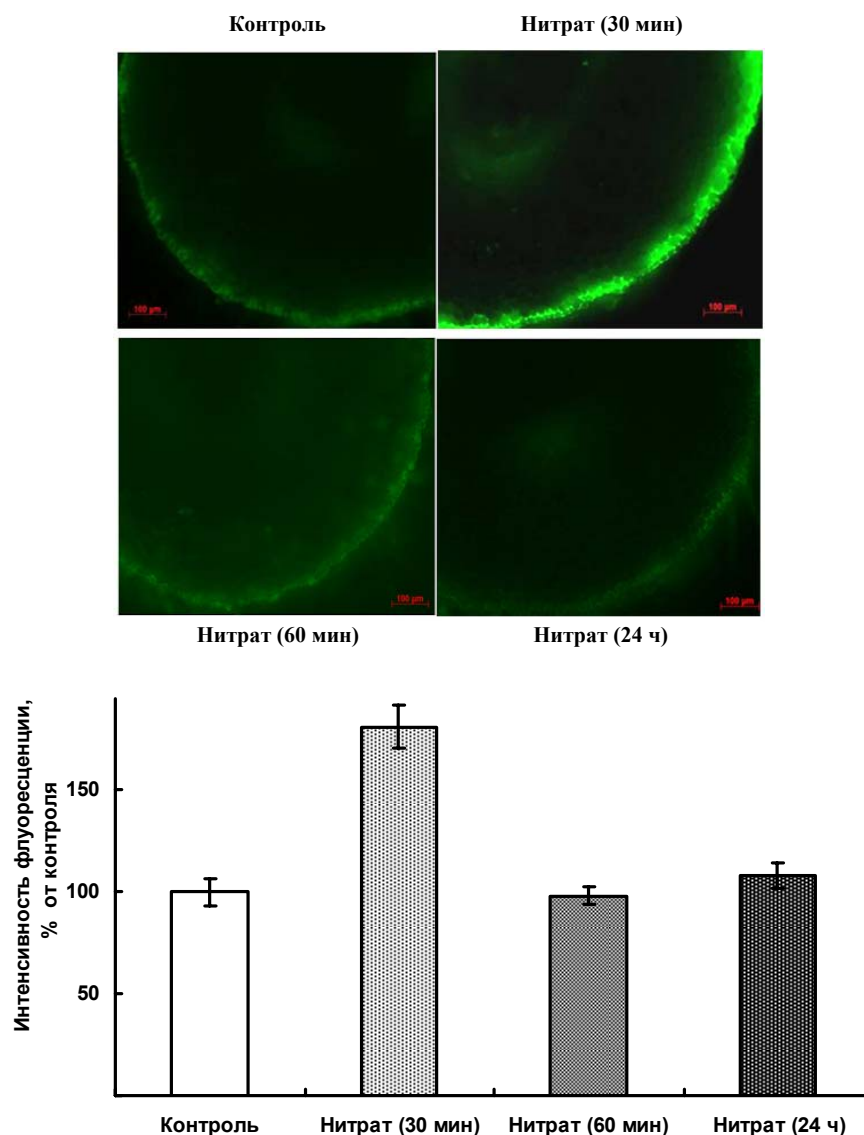


Рис. 4. Влияние нитрата калия (20 мМ) на содержание NO в корнях проростков гороха.

При постановке опытов с азотными солями мы исходили из того, что минеральный азот в высоких дозах нарушает формирование и функционирование БРС. Одной из возможных причин этого может быть образование в клетках растения-хозяина NO за счет восстановления нитратов и нитритов с помощью нитрат- и нитритредуктаз (Глянько и др., 2009а).

Необходимо заметить, что нитратредуктаза, по-видимому, вовлекается в генерацию NO. Об этом свидетельствуют и наши данные о существенном уменьшении синтеза NO (более чем в 2 раза) в корнях проростков гороха под влиянием ингибитора нитратредуктазы – вольфрамата натрия (150 мкМ) (Asai et al., 2008) (вариант KNO₃ (20 мМ), экспозиция 30 мин) (рис. 6). Но в то же время экспозиция двухсуточных проростков на 1 мМ растворе L-аргинина, являющегося субстратом животной

NO-синтазы, достоверно увеличивала флуоресцентное свечение в клетках на 25 % (рис. 7). Эти данные, по-видимому, могут свидетельствовать о том, что проростки гороха для генерации NO используют нитраты, нитриты и аргинин как субстраты ферментативных или других реакций.

Влияние инокуляции проростков гороха клубеньковыми бактериями на синтез NO в корнях

Проростки гороха, выращенные на воде, также имели флуоресцентное свечение в поверхностных клетках корня. Это говорит о том, что этиолированные проростки гороха синтезируют NO в поверхностных клетках корня, создавая постоянное “NO-поле” и NO является нормальным продуктом обмена веществ у растений, концентрация которого может существ-

ВЛИЯНИЕ РИЗОБИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ

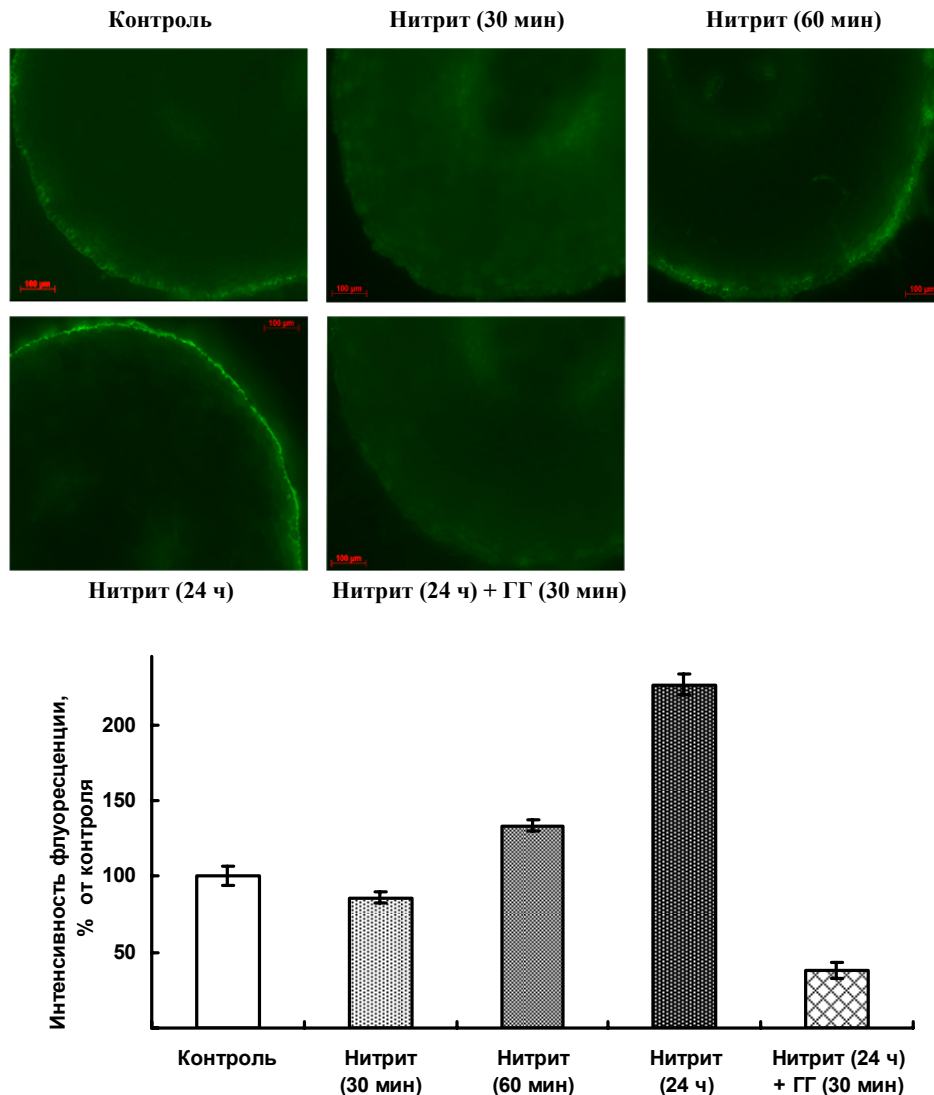


Рис. 5. Влияние нитрита натрия (2 мМ) и гемоглобина (ГГ, 4 мкМ) на содержание NO в корнях проростков гороха.

венно увеличиваться при действии на организмы неблагоприятных факторов.

Инокуляция отрезков корней двухсуточных проростков суспензией клубеньковых бактерий снижала интенсивность свечения в этом варианте (H_2O) на 30-40% (рис. 8). Такое же действие ризобияльной инфекции проявилось и в варианте с нитропруссидом натрия, где интенсивность свечения под влиянием инокуляции уменьшалась почти в 4 раза (рис. 1). Снижение интенсивности синтеза NO под влиянием инокуляции наблюдалось и в варианте с KNO_3 (20 мМ, 24 ч) (рис. 9).

Следует отметить, что ингибирование синтеза АФК, уменьшение содержания салициловой кислоты и снижение активности НАДФН-оксидазы в клетках растения-хозяина с помощью ризобияльной инфекции и очищенного ризобияльного *Nod*-фактора было уста-

новлено и в других работах (Shaw, Long, 2003; Глянько и др., 2005; Глянько и др., 2008).

Таким образом, ризобияльная инфекция частично блокирует синтез NO, а также, по-видимому, и других активных метаболитов в клетках корня, что, вероятно, создает благоприятные физиологические условия для инфицирования корня ризобиями и формирования БРС, в том числе и за счет ингибирования защитных систем растения-хозяина. Однако механизмы, с помощью которых ризобии модулируют обмен веществ растения-хозяина, неизвестны. Логично предположить, что началом преобразований в метаболизме макросимбионта является взаимодействие ризобияльного *Nod*-фактора (липохитоолигосахарида) с растительным рецептором (предположительно киназой, содержащей LysM-домен) на плазматической мембране клетки (Limpens et al., 2003). Это взаимодейст-

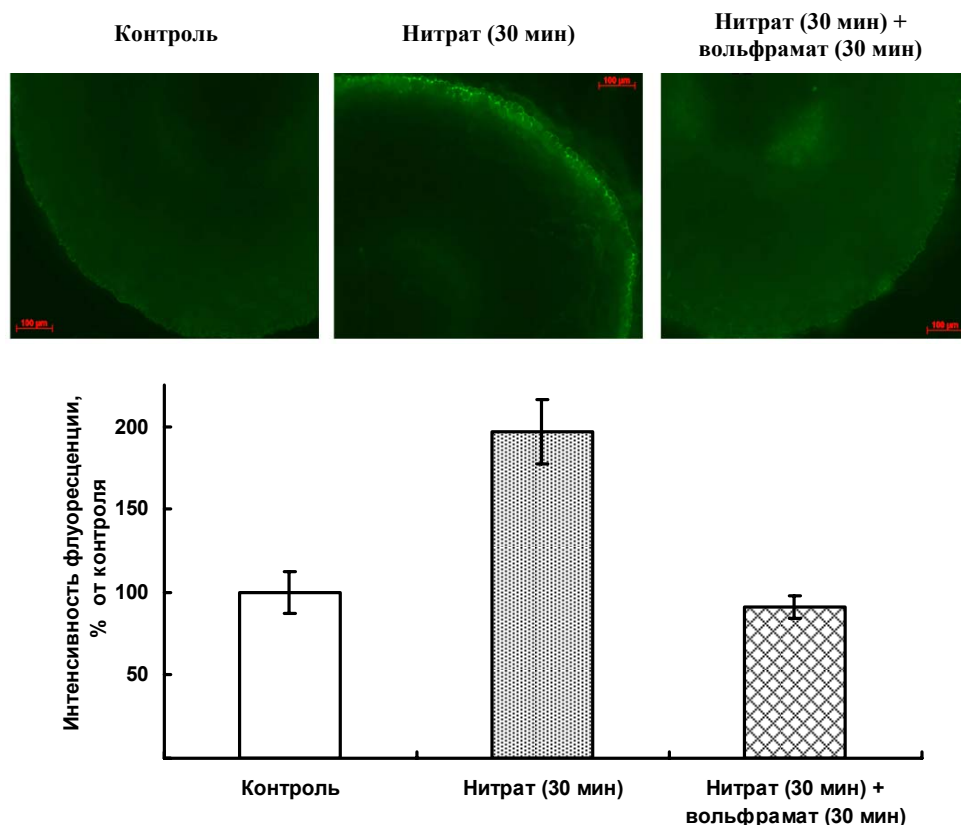


Рис. 6. Влияние нитрата калия (20 мМ) и ингибитора нитратредуктазы вольфрамата натрия (150 мкМ) на содержание NO в корнях проростков гороха.

вие приводит к “запуску” сигнальных систем, инициирующих экспрессию соответствующих генов растения-хозяина, осуществляющих реализацию генетически запрограммированного формирования БРС. Подтверждением этому служат данные опытов Nagata et al. (2009), в которых липополисахарид, выделенный из симбиотической бактерии *Mesorhizobium loti*, индуцировал генерацию NO и экспрессию гена несимбиотического гемоглобина у *Lotus japonicus*. По данным Lohar et al. (2007), уменьшение потока АФК в корнях люцерны через 1 ч после обработки проростков *Nod*-фактором сопровождалось снижением накопления транскриптов гомологов НАДФН-оксидазы корней люцерны – *MtRBOH2* и *MtRBOH3*. Этот факт авторы объясняют влиянием *Nod*-фактора на активность АФК-генерирующей системы, что, по-видимому, способствует на ранних стадиях БРС успешному взаимодействию симбионтов.

Что касается снижения под влиянием ризобияльной инфекции уровня оксида азота, обладающего в зависимости от концентрации сигнальными или токсическими свойствами, то можно предположить, что это происходит либо благодаря уменьшению функциональной ак-

тивности ферментных систем, осуществляющих синтез NO, либо путем удаления свободного NO с помощью “поглотителей” (скавенжеров).

Влияние гемоглобина на уровень NO в клетках корня проростков гороха

Одним из эффективных “поглотителей” NO у растений является гемоглобин (Dordas et al., 2003). Мы проверили это предположение и результаты представлены на рис. 2, 5 и 8.

Как следует из рис. 2, гемоглобин (4 мкМ) снижал интенсивность флуоресцентного свечения в варианте с нитропруссидом натрия почти в три раза. В варианте с NaNO_2 (рис. 5) уровень NO под влиянием гемоглобина снизился в 6 раз. Таким образом, гемоглобин вызывает эффекты, сходные с действием ризобияльной инфекции.

Механизм связывания оксида азота гемоглобином состоит в его взаимодействии с гемом гемоглобина с образованием нитрозилгемоглобина (Neill et al., 2008). Вопрос в том, какой механизм его действия *in planta*. По данным Nagata et al. (2009), ризобии (*Mesorhizobium loti*) индуцируют синтез NO в корнях бобового растения *Lotus japonicus* на

ВЛИЯНИЕ РИЗОБИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ

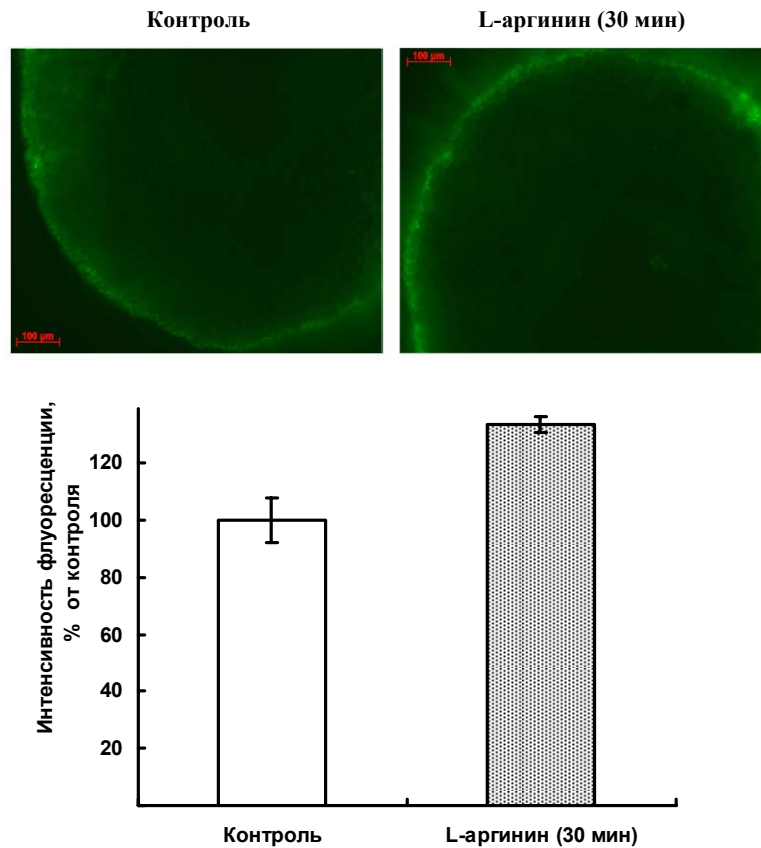


Рис. 7. Влияние L-аргинина (1 мМ) на содержание NO в корнях проростков гороха.

начальных стадиях инфекции. Однако усиление синтеза NO носит преходящий характер и связано с экспрессией гена несимбиотического гемоглобина (*LjHb1*) у *Lotus japonicus*. Авторы предполагают, что *LjHb1* выполняет регулируемую роль по отношению к уровню NO в клетках растения-хозяина в процессе симбиоза. Наши данные о том, что ризобиальная инфекция на начальных этапах инфицирования снижала уровень NO в клетках корня, свидетельствует о возможном участии в этом процессе несимбиотического гемоглобина. Это предположение требует экспериментальных доказательств.

Что касается влияния экзогенного гемоглобина на уровень NO в клетках корней проростков гороха на фоне действия различных абиотических факторов, то механизм, по видимому, тот же, что и при действии ризобиальной инфекции. По данным Dordas et al. (2003) и Seregelyes et al. (2004), трансгенные растения табака и люцерны с повышенным синтезом несимбиотического гемоглобина класса I обладали меньшей чувствительностью к нитрозативному стрессу, вызываемому в клетках действием экзогенных доноров NO, по сравнению с нормальными (дикими) формами

растений. Предполагается, что в растениях несимбиотические формы гемоглобина могут выполнять защитную роль против нитрозативного стресса и модулировать сигнальную функцию NO (Perazzolli et al., 2006).

В наших экспериментах (Глянько и др., 2008) ризобиальная инфекция снимала активирующее влияние высокой дозы минерального азота на активность НАДФН-оксидазы – основного фермента АФК-генерирующей системы растений и животных. Ингибирующее влияние ризобиальной инфекции на генерацию NO и АФК свидетельствует о связи механизмов синтеза этих соединений, опосредованных влиянием метаболических систем, регулирующих формирование БРС.

Активация под воздействием грибного элиситора (cryptogin) анионных каналов в плазматической мембране суспензионных клеток табака усиливает поток нитратов через анионные каналы в цитоплазму, что оказывает влияние на экспрессию генов защиты, генерацию АФК, модуляцию активности протеинкиназ, на сверхчувствительную реакцию клеток и их гибель при патогенезе (Wendehenne et al., 2002). По данным Wendehenne et al. (2002), эти

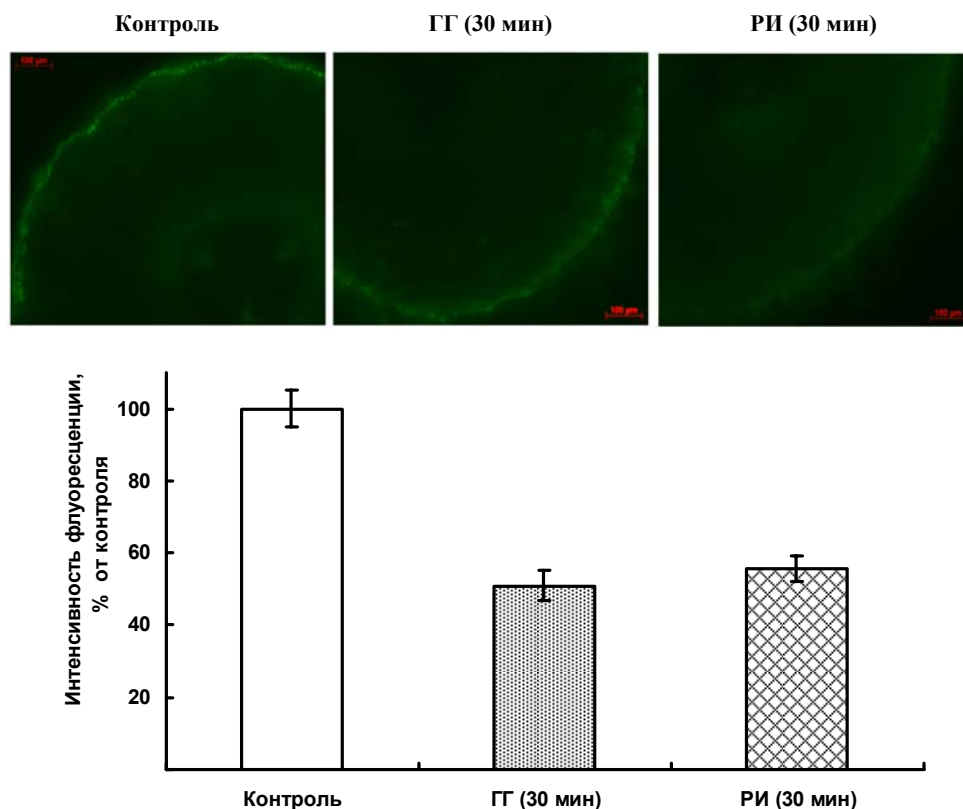


Рис. 8. Влияние гемоглобина (ГГ, 4 мкМ) и ризобияльной инфекции (РИ) на содержание NO в корнях проростков гороха.

процессы ингибируются блокаторами ионных каналов. В этой связи активация под действием ризобияльной инфекции поглощения нитратов этиолированными проростками гороха (Митанова и др., 2006) свидетельствует о сходстве действия патогена и симбионта и о возможном влиянии нитратов на сигнальные пути, задействованные в БРС.

По литературным данным, синтез АФК в ответ на многие экзогенные «раздражители» сопровождается также синтезом NO (Neill et al., 2002), и их сигнальное действие может суммироваться на многие процессы, например, при реализации организмом «программированной клеточной смерти» (Delledonne et al., 2001). Взаимодействие H_2O_2 и NO может идти по пути активации протеинкиназ, изменения концентрации внутриклеточного кальция, активности ионных каналов и др. (Neill et al., 2003; Elmayer, Simon-Plas, 2007; Колупаев, Карпец, 2009). Однако полной картины взаимодействия АФК и АФА, в частности H_2O_2 и NO, в клетках растений нет.

Изучение взаимодействия АФК и АФА при БРС представляет особый интерес, так как, в отличие от патогенеза, «усилия» растения-хозяина направлены на «облегчение» проник-

новения клубеньковых бактерий в клетки и формирования симбиоза. Однако, в зависимости от вида биотических и абиотических неблагоприятных стрессовых факторов, взаимодействие разных сигнальных путей при формировании БРС может быть различным, что, по-видимому, и определяет «успех» или «неуспех» в формировании симбиоза. В этом ряду находится такой экзогенный фактор как высокие дозы минерального азота, оказывающие отрицательное влияние на формирование и функционирование БРС (Глянько, Митанова, 2009). В этой связи представляет интерес возможная активация под влиянием ризобияльной инфекции анионных каналов плазматической мембраны и, как следствие этого, усиление потока внутриклеточных нитратов, могущих влиять на активность НАДФН-оксидазы, генерацию оксида азота и другие процессы, связанные с up- и down-регуляцией физиологических функций (Elmayer, Simon-Plas, 2007).

О возможности влияния минерального азота в виде аммония (NH_4^+) на взаимодействие патогенного гриба и растения свидетельствуют результаты исследований Alkan et al. (2009). По данным этих авторов, аммоний, секретлируемый патогенным грибом *Colletotrichum coccodes*, ак-

ВЛИЯНИЕ РИЗОБИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ

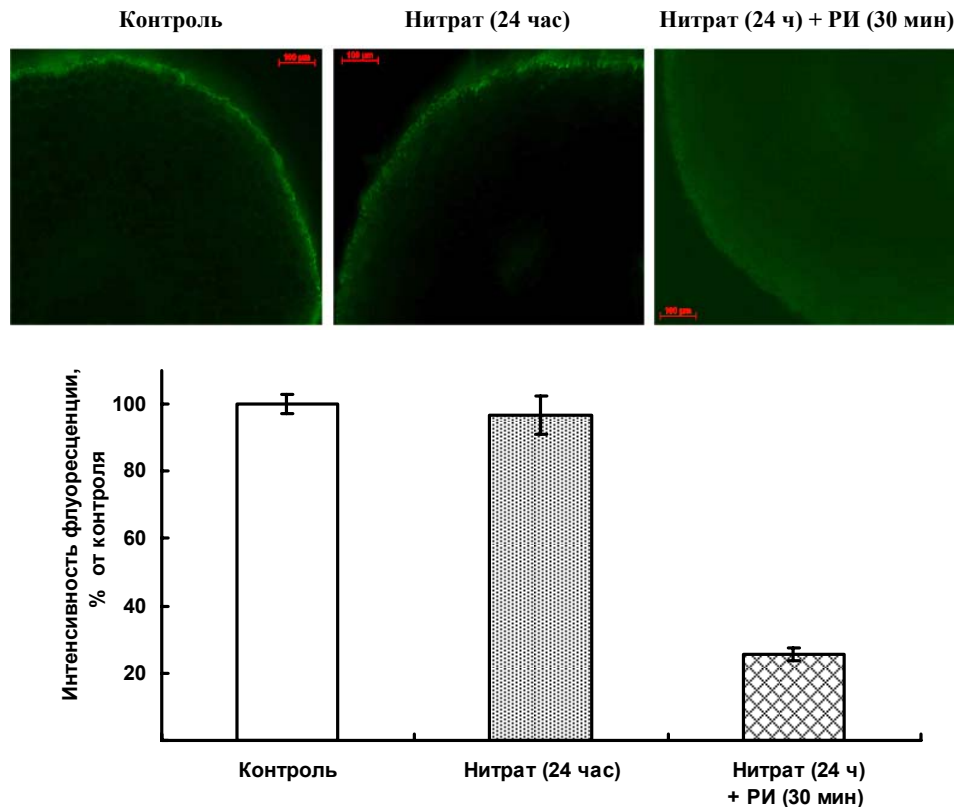


Рис. 9. Влияние нитрата калия (20 мМ) и ризобияльной инфекции (РИ) на содержание NO в корнях проростков гороха.

тивирует растительную НАДФН-оксидазу, что вызывает накопление АФК и гибель клеток плодов томата. В связи с этим интересна гипотеза о возможном влиянии NO на потоки экстра- и внутриклеточного Ca^{2+} , который оказывает влияние на активность НАДФН-оксидазы. Суть гипотезы в том, что NO может повышать или ингибировать индуцированный действием стрессовых факторов поток Ca^{2+} в цитоплазму путем изменения проницаемости Ca^{2+} -каналов с участием сигнальных белков, подвергшихся посттрансляционной модификации оксидом азота (Besson-Bard et al., 2008). Этот механизм регуляции потоков Ca^{2+} на плазматической мембране с участием NO может быть полезен для объяснения механизмов функциональной активности НАДФН-оксидазы, в частности, при симбиотических взаимодействиях организмов, когда чрезмерное накопление АФК может препятствовать установлению симбиоза (Shaw, Long, 2003).

ЛИТЕРАТУРА

Васильева Г.Г., Глянько А.К., Миронова Н.В. и др. Активные формы кислорода в проростках гороха при взаимодействии с симбиотическими и пато-

генными микроорганизмами // Прикл. биохимия и микробиология. – 2007. – Т. 43, № 2. – С. 240-245.

Глянько А.К., Акимова Г.П., Соколова М.Г. и др. Защитно-регуляторные механизмы при развитии бобово-ризобияльного симбиоза // Прикл. биохимия и микробиология. – 2007. – Т. 43, № 3. – С. 289-297.

Глянько А.К., Васильева Г.Г. Особенности действия активных форм кислорода и азота при бобово-ризобияльном симбиозе // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2007. – Вип. 3 (12). – С. 27-41.

Глянько А.К., Васильева Г.Г., Ищенко А.А. и др. Активность НАДФН-оксидазы в корнях проростков гороха при ризобияльной инфекции в зависимости от действия неблагоприятных факторов // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2008. – Вип. 3 (15). – С. 6-14.

Глянько А.К., Макарова Л.Е., Васильева Г.Г., Миронова Н.В. Возможное участие перекиси водорода и салициловой кислоты в бобово-ризобияльном симбиозе // Известия Российской АН. Серия биологическая. – 2005. – Т. 32, № 3. – С. 300-305.

Глянько А.К., Митанова Н.Б. Физиологические механизмы отрицательного влияния высоких доз

- минерального азота на бобово-ризобийный симбиоз // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2008. – Вип. 2 (14). – С. 26-41.
- Глянько А.К., Митанова Н.Б., Макарова Л.Е., Васильева Г.Г. Влияние азотсодержащих соединений на рост клубеньковых бактерий в культуре и их взаимодействие с корнями проростков гороха // С.-х. биология. – 2009а. – № 1. – С. 83-88.
- Глянько А.К., Митанова Н.Б., Степанов А.В. Физиологическая роль оксида азота (NO) у растительных организмов // J. Stress Physiol. & Biochem. – 2009б. – V. 5, № 3. – P. 33-52.
- Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Участие оксида азота (NO) в трансдукции сигналов абиотических стрессоров у растений // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2009. – Вип. 3 (18). – С. 6-19.
- Максимов И.В., Черепанова Е.А. Про/анти-оксидантная система и устойчивость растений к патогенам // Успехи соврем. биологии. – 2006. – Т. 126, № 3. – С. 250-261.
- Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Реутов В.П. Оксид азота и NO-синтазы в организме млекопитающих при различных функциональных состояниях // Биохимия. – 2000. – Т. 65, № 4. – С. 485-503.
- Митанова Н.Б., Миронова Н.Б., Глянько А.К. Поглощение нитратов проростками гороха в зависимости от дозы азота и инокуляции клубеньковыми бактериями // Агрохимия. – 2006. – № 1. – С. 32-33.
- Alkan N., Davydov O., Sagi M. et al. Ammonium secretion by *Colletotrichum coccodes* activates host NADPH oxidase activity enhancing host cell death and fungal virulence in tomato fruits // Mol. Plant-Microbe Interac. – 2009. – V. 22, № 12. – P. 1484-1491.
- Asai S., Ohta K., Yoshioka H. MAPK signaling regulates nitric oxide and NADPH oxidase-dependent oxidative bursts in *Nicotiana benthamiana* // Plant Cell. – 2008. – V. 20, № 5. – P. 1390-1406.
- Baptista P., Martins A., Pais M.S. et al. Involvement of reactive oxygen species during early stages of ectomycorrhiza establishment between *Castanea sativa* and *Pisolithus tinctorius* // Mycorrhiza. – 2007. – V. 17, № 3. – P. 185-193.
- Baudouin E., Pieuchot L., Engler G. et al. Nitric oxide is formed in *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* functional nodules // Mol. Microbe-Plant Interac. – 2006. – V. 19, № 9. – P. 970-975.
- 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.
- Chang C., Damiani I., Puppo A., Frendo P. Redox changes during the legume-rhizobium symbiosis // Molecular Plant. – 2009. – V. 2, № 3. – P. 370-377.
- Delledonne M., Zeier J., Marocco A., Lamb C. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2001. – V. 98, № 23. – P. 13454-13459.
- Dordas C., Rivoal J., Hill R.D. Plant haemoglobins, nitric oxide and hypoxia stress // Ann. Bot. – 2003. – V. 91, № 2. – P. 173-178.
- Elmayan T., Simon-Plas F. Regulation of plant NADPH oxidase // Plant Signaling Behavior. – 2007. – V. 2, № 6. – P. 505-507.
- Garcia-Garrido J.M., Ocampo J.A. Regulation of the plant defense response in arbuscular-mycorrhizal symbiosis // J. Exp. Bot. – 2002. – V. 53, № 373. – P. 1377-1386.
- Gould K.S., Lamotte O., Klinguer A. et al. Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response? // Plant Cell Environ. – 2003. – № 11. – P. 1851-1862.
- Herouart D., Baudouin E., Frendo P. et al. Reactive oxygen species, nitric oxide and glutathione: key role in the establishment of the legume-*Rhizobium* symbiosis // Plant Physiol. Biochem. – 2002. – V. 40, № 6-8. – P. 619-624.
- Limpens E., Franken C., Smit P. et al. LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor – induced infection // Science. – 2003. – V. 302, № 5645. – P. 630-633.
- Lohar D.P., Haridas S., Gantt J.S., Vandenbosch K.A. A transient decrease in reactive oxygen species in roots leads to root hair deformation in the legume-rhizobia symbiosis // New Phytol. – 2007. – V. 173, № 1. – P. 39-49.
- Nagata M., Hashimoto M., Murakami E. et al. A possible role of class 1 plant hemoglobin at the early stage of legume-rhizobium symbiosis // Plant Signaling Behavior. – 2009. – V. 4, № 3. – P. 202-204.
- 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 Lett. – 1998. – V. 427, № 2. – P. 263-266.
- Neill S.J., Bright J., Desikan R. et al. Nitric oxide evolution and perception // J. Exp. Bot. – 2008. – V. 59, № 1. – P. 25-35.
- Neill S.J., Desikan R., Hancock T. Nitric oxide signaling in plants // New Phytol. – 2003. – V. 159, № 1. – P. 11-35.

ВЛИЯНИЕ РИЗОБИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ

- Neill S.J., Desikan R., Clarke A. et al. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants // J. Exp. Bot. – 2002. – V. 53, № 372. – P. 1237-1242.
- Parniske M. Intracellular accommodation of microbes by plants: a common developmental program for symbiosis and disease? // Curr. Opin. Plant Biol. – 2000. – V. 3, № 4. – P. 320-328.
- Pauly N., Pucciariello C., Mandon K. et al. Reactive oxygen and nitrogen species and glutathione: key players in the legume-*Rhizobium* symbiosis // J. Exp. Bot. – 2006. – V. 57, № 8. – P. 1769-1776.
- 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.
- Ramu K., Peng H. M., Cook D.R. Nod factor induction of reactive oxygen species production is correlated with expression of the nodulin gene *rip1* in *Medicago truncatula* // Mol. Plant-Microbe Interact. – 2002. – V. 15, № 6. – P. 522-528.
- Rhizobiaceae*. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями / Ред. И.А. Тихоновича, Н.А. Проворова. – С.-Пб.: Россельхозакадемия. – 2002. – 567 с.
- Santos R., Herouart D., Sigaud S. et al. Oxidative burst in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction // Mol. Plant-Microbe Interact. – 2001. – V. 14, № 1. – P. 86-89.
- Seregelyes C., Igamberdiev A.U., Maassen A. et al. NO-degradation by alfalfa class 1 hemoglobin (Mhb1): a possible link to *PR-1a* gene expression in Mhb1-overproducing tobacco plants // FEBS Lett. – 2004. – V. 571, № 1. – P. 61-66.
- Shaw S.L., Long S.R. Nod factor inhibition of reactive oxygen efflux in a host legume // Plant Physiol. – 2003. – V. 132, № 4. – P. 2196-2204.
- Shimoda U., Nagata M., Suzuki A. et al. Symbiotic *Rhizobium* and nitric oxide induce gene expression of non-symbiotic hemoglobin in *Lotus japonicus* // Plant Cell Physiol. – 2005. – V. 46, № 1. – P. 99-107.
- Wendehenne D., Lamotte O., Frachisse J.M. et al. Nitrate efflux is an essential component of the cryptogin signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco // Plant Cell. – 2002. – V. 14, № 8. – P. 1937-1951.

Поступила в редакцию
13.01.2010 г.

INFLUENCE OF RHIZOBIAL INFECTION AND OTHER FACTORS ON GENERATION OF NITRIC OXIDE (NO) IN ROOTS OF ETIOLATED SEEDLINGS OF PEA

A. K. Gyan'ko, N. B. Mitanova, A. V. Stepanov

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

In experiments with 2 daily etiolated seedlings of pea (variety Yamal'skij) studied with the help of fluorescent microscopy content of nitric oxide (NO) the roots (a site of 10-20 mm from apex) on cross cuts of a root (100-150 mkm). It was show, that level NO in roots not inoculation seedlings of pea through 24 h was increased more than in 2 times on a variants of nitrite (NaNO₂) and nitroprusside sodium. On a variant of nitrate (KNO₃) at this exposition of increase of level NO in roots it was not observed. At a short-term exposition (30 min) the peak observed on a background nitrate salt (increase the NO in 2 times). Rhizobial the infection and hemoglobin reduced level NO in roots in some times on a variants of water, nitroprusside sodium and nitrogen salts. Results are discussed in connection with influence NO in processes symbiotic interaction rhizobia and leguminous plant.

Key words: *Pisum sativum* L., nitric oxide (NO), legume-rhizobium symbiosis, rhizobial infection, hemoglobin, nitroprusside sodium, nitrate, nitrite, fluorescent microscopy

**ВПЛИВ РИЗОБІАЛЬНОЇ ІНФЕКЦІЇ ТА ІНШИХ ЧИННИКІВ
НА ГЕНЕРАЦІЮ ОКСИДУ АЗОТУ (NO) В КОРЕНЯХ
ЕТІОЛЬОВАНИХ ПРОРОСТКІВ ГОРОХУ**

А. К. Глянько, Н. Б. Мітанова, А. В. Степанов

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

Вивчали вміст оксиду азоту (NO) в коренях етіольованих проростків гороху (сорт Ямальський) за допомогою флуоресцентної мікроскопії на поперечних зрізах коренів (100-150 мкм, ділянка 10-20 мм від апекса). Показано, що вміст NO в коренях неінокульованих проростків гороху через 24 год зростав більше ніж в 2 рази у варіантах з нітритом (NaNO₂) і нітропрусидом натрію. У варіанті з нітратом (KNO₃) при експозиції 24 год збільшення вмісту NO в коренях не спостерігалось. Пік нагромадження оксиду азоту в коренях (збільшення в два рази) на фоні нітратної солі спостерігався за короткочасової експозиції (30 хв). Ризобіальна інфекція і гемоглобін знижували рівень NO в коренях гороху у варіантах з водою, нітропрусидом натрію і азотними солями. Результати обговорюються у зв'язку з впливом NO на процеси симбіотрофної взаємодії ризобій і бобових рослин.

Ключові слова: *Pisum sativum L.*, оксид азоту (NO), бобово-ризобіальний симбіоз, ризобіальна інфекція, гемоглобін, нітропрусид натрію, нітрати, нітрит, флуоресцентна мікроскопія