

РОЗДІЛ 1. БОТАНІКА ТА ЕКОЛОГІЯ РОСЛИН

УДК 582.739:581.522.5

СТРЕС-ИНДУКОВАНІ ЗМІНИ АКТИВНОСТІ NO-ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ СИГНАЛЬНОЇ СИСТЕМИ В ПРОРОСТКАХ PISUM SATIVUM L.

Войтович О.М., к.б.н., доцент

Запорізький національний університет

Оксид азоту (NO) - універсальна сигнальна молекула, яка регулює метаболізм і виконує чисельні функції в рослинному організмі. Робота присвячена з'ясуванню ролі цієї молекули в розвитку адаптаційних реакцій за дії гіпертермічного, гіпотермічного й біотичного стресу в проростках гороху. Показано залежність біохімічної відповіді від типу стресу й ефективність використання нітропрусиду натрію як донора екзогенного NO.

Ключові слова: NO-сигнальна система, абіотичний та біотичний стрес, проростки гороху, нітропрусид натрію

Войтович Е.Н. СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ NO-ОПОСРЕДОВАННОЙ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ В ПРОРОСТКАХ PISUM SATIVUM L. / Запорожский национальный университет, Украина.

Оксид азота (NO)- универсальная сигнальная молекула, регулирующая метаболизм и выполняющая многообразные функции в растительном организме. Работа посвящена выяснению роли этой молекулы в развитии адаптационных реакций при действии гипертермического, гипотермического и биотического стресса в проростках гороха. Показана зависимость биохимического ответа от типа стресса и эффективность использования нитропрусида натрия в качестве донора экзогенного NO.

Ключевые слова: NO-сигнальная система, абиотический и биотический стресс, проростки гороха, нитропрусид натрия

Voitovich O.M. STRESS - PROVOKING CHANGES ACTIVITY OF THE NO - SIGNAL SYSTEM IN PISUM SATIVUM L. / Zaporizhzhya national university, Ukraine.

Nitric oxide NO- universal signal molecule, which regulates metabolism and executing multiple functions in plants. Role of this molecule in development of adaptation reactions at the action of hiperthermal, hypothermal and in pea is investigated. Dependence of biochemical answer on the type of stress and efficiency of the use of as a donor of exogenous NO is shown.

Key words: NO-signalis system, abiotic and biotic stress, pea, nitroprusside of sodium

ВСТУП

Однією з найважливіших проблем сучасної біології є розшифровка механізмів реагування рослин на зміну умов їх існування, особливо на дію екстремальних факторів. Насамперед це адаптивні події, що відбуваються під час змін в інформаційному полі клітин.

Особливе місце серед сигнальних систем рослинних клітин займає NO – сигнальна система, бо властивості її основного продукту - вільного газоподібного NO, є унікальним з точки зору швидкості утворення та транспорту, а інші інтермедіати цієї системи є індукторами багатьох біохімічних шляхів у межах загальної адаптаційної реакції [1,2].

Існують три джерела виникнення в рослинних тканинах такої важливої сигнальної та ефекторної молекули, як NO. Це два ферментативних шляхи, а саме безпосередня робота NO-синтази або нітрат-редуктази, та третій, неферментативний, шлях (за участі Р-білку гліциндекарбоксилазного комплексу, при реакції нітриту з такими редукторами, як аскорбат або глутатіон, або утворення з NO₂ за участю каротиноїдів).

Показана роль NO в процесах росту та клітинної проліферації [3], апоптозу [4]; у реакції рослин на посуху [5] та механічне пошкодження [6]; формуванні стійкості до хвороб [7,8], зокрема в синтезі фітоалексинів та лігніфікації клітинних стінок; у процесах дозрівання та старіння [9]; замикання продихів; у синтезі етилену та зміні ферментативної активності каталази та аскорбатпероксидази [10].

На сучасному етапі рівень обізнаності про механізми функціонування рослинної NO-сигнальної системи значно нижчий за тваринну. Дослідження ролі NO в рослинах проводиться в трьох основних напрямках:

пошук джерел NO, експертиза ефектів NO та пошук молекул, які беруть участь в трансдукції NO-сигналу.

Метою нашої роботи було дослідження можливої ролі NO-опосередкованого сигнального шляху в адаптаційних реакціях рослинного організму за дії різних стресових факторів.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Матеріалом дослідження були 10-денні проростки гороху посівного (*Pisum sativum L.*) сорту Альфа. Абіотичний стрес для рослин створювали шляхом впливу низької (4 °C) або високої (40 °C) температури впродовж 15 годин. Умови біотичного стресу передбачали обробку культуральним фільтратом грибу *Fusarium oxysporum Schl.* та подальшу 15-годинну інкубацію. Вирощування рослин проводили або на дистильованій воді, або на 0,05% розчині нітропрусиду натрію Na₂ [Fe(NO)(CN)₅] як екзогенного джерела NO.

NO-синтазну активність оцінювали за визначенням вмісту NO в інкубаційному середовищі за реакцією його метаболітів з компонентами реактиву Greiss, за методом, викладеним у [11], з модифікаціями. Рослинний матеріал розтирали з додаванням 0,2 М гліцин-NaOH буфера, депротейнізували та центрифугували при 220g упродовж 15 хвилин. До надосадової рідини додавали підготовлений для конверсії нітрат-іонів у нітрит-іони осад кадмію та інкубували реакційну суміш 20 хвилин при кімнатній температурі (22°C) при pH=9,7 (0,6 М гліцин – NaOH буфер). Центрифугували реакційну суміш 3 хвилини при 500g. До надосадової рідини додавали реактив Грису у співвідношенні 5:1 та інкубували 15 хвилин при кімнатній температурі. Реєстрували оптичну густину при 548 нм. Вміст нітрит-іонів визначали за калібрувальним графіком.

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

Проростки гороху вирощувались на середовищі, яке взагалі не містило азотовмісних сполук. Тому єдиним джерелом азотного метаболізму був органічний азот запасних речовин насіння. За контрольних умов напередодні здійснення експерименту було проведено визначення в рослинному матеріалі NO₂⁻ та NO₃⁻ - іонів. Проба була негативна, що свідчить про те, що азот у тканинах знаходиться у відновленому стані NH₄⁺ або входить до складу органічних сполук.

Створені умови термічного та біотичного стресу супроводжуються активацією різних сигнальних систем, зокрема NO-синтазної.

Враховуючи, що сама молекула NO існує дуже обмежений час та після передачі сигналу або ефекторної дії (6 – 10 с) за участю кисню й води перетворюється на нітрати й нітрити, ми переводили всі утворені форми азоту в нітритну та за допомогою реактиву Greiss визначали саме вміст NO₂⁻ - іонів. У зв'язку з тим, що реакції на дію стресу змінюються в часі, нами був обраний інтервал відбору проб: 2,4,6,8 та 12 годин після впливу стресового фактору.

Аналізуючи отримані дані (табл.1), видно, що зміна вмісту нітритів відбулася за всіх умов досліду та в більшості випадків вона суттєво відрізнялась від контролю.

Таблиця 1 – Вміст нітритів (NO₂⁻) в процесі пост-стресової реакції проростків гороху до дії різних стресових факторів (мкг NO₂⁻/г сирої речовини)

Години пост-стресової реакції	Стресові умови						
	Дистильована вода				0,05 % розчин нітропрусиду натрію		
	контроль	гіпотермічний стрес	гіпертермічний стрес	біотичний стрес	контроль	гіпотермічний стрес	гіпертермічний стрес
2	0,55 ± 0,070	0,65 ± 0,129	0,96 ± 0,070	1,12 ± 0,043**	0,76 ± 0,083	0,92 ± 0,065	1,32 ± 0,042**
4	0,58 ± 0,079	0,62 ± 0,063	0,72 ± 0,175	1,76 ± 0,155**	0,73 ± 0,043	1,28 ± 0,379	0,79 ± 0,233
6	0,92 ± 0,180	0,67 ± 0,047	0,53 ± 0,041	0,95 ± 0,136	1,20 ± 0,152	0,79 ± 0,115	1,28 ± 0,064
8	0,54 ± 0,036	1,43 ± 0,239*	1,04 ± 0,089**	1,00 ± 0,190	1,38 ± 0,099	1,96 ± 0,554	2,52 ± 0,041
12	0,61 ± 0,054	0,99 ± 0,142	0,79 ± 0,110	0,61 ± 0,067	0,69 ± 0,109	2,44 ± 0,419***	2,04 ± 0,058**

Примітка: * - P > 0,95; ** - P > 0,99; *** - P > 0,999.

Це підтверджує відому участь сигнальної та захисної системи, ключову роль у котрій відіграє оксид азоту NO, в адаптаційних реакціях рослин на вплив різних абіотичних та біотичних стресів [1-2, 5-8].

Характер динамічних змін вмісту нітритів при вирощуванні на дистильованій воді майже однаковий при всіх трьох видах стресу. Особливо чітко це простежується за умов впливу абіотичних стресів – підвищеної та зниженої температури. В обох випадках перші шість годин після стресу не спостерігається суттєвих відмінностей від контролю, на 8 годину концентрація нітритів у дослідних пробах перевищувала контрольні показники майже в два рази, після чого спостерігалось різке зниження. Тобто можна припустити, що саме в цей час NO-сигнальна система активується внаслідок попереднього стресу.

За дії біотичного стресу загальна картина дещо інша. Участь NO в захисних реакціях на біотичний стрес, тобто на вплив патогенів, є найбільш відомою. Враховуючи цей факт, як чинник стресових умов ми використовували культуральний фільтрат *Fusarium oxysporum Schl.* характерного для гороху посівного на цій стадії розвитку патогена.

Отримані результати дозволяють відзначити, що при біотичному стресі спостерігається суттєве збільшення вмісту нітритів вже на другу годину після припинення дії стресу. Ймовірно, участь NO-сигнальної системи у відповідь на вплив патогену починається відразу та є більш тривалою. Вже на 2 годину пост-стресового періоду відмінності вмісту нітритів становили майже 150% за кількістю. На четверту годину цей показник сягнув 303%, після чого знизився та подальші його коливання суттєво від контролю не відрізнялися.

Для того, щоб з'ясувати, чи може рослина використовувати за дії стресу екзогенний NO (при наявності в середовищі пророщування донора NO – нітропрусиду натрію), ми провели співставлення характеру змін вмісту нітритів у часі залежно від середовища вирощування (рис. 1-2).

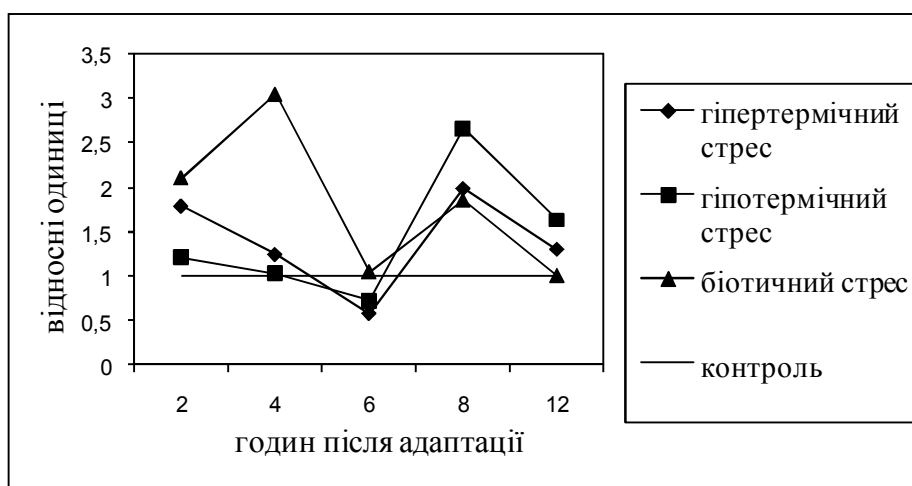


Рис. 1. Динаміка вмісту NO₂⁻ в проростках гороху в процесі пост-стресової реакції при вирощуванні на дистильованій воді

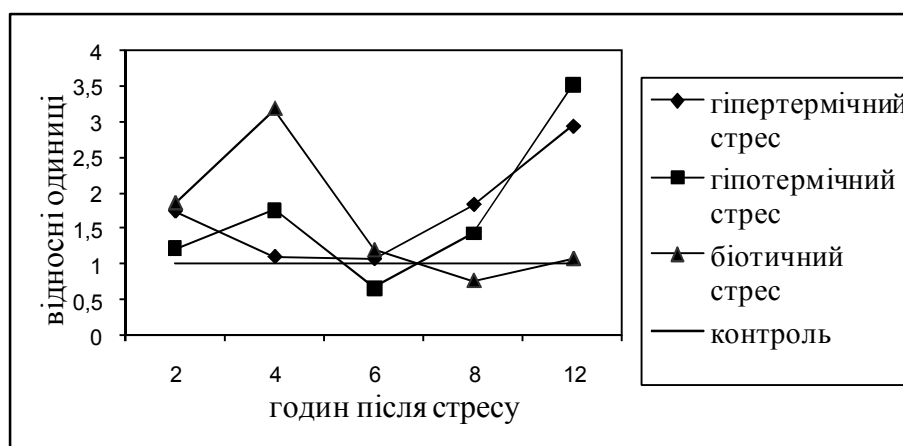


Рис.2. Динаміка вмісту NO₂⁻ в проростках гороху в процесі пост-стресової реакції при вирощуванні на середовищі з 0,05 % нітропрусидом натрію

При додаванні до середовища вирощування донора NO- нітропрусиду натрію характер динамічних змін у азотному метаболізмі клітини відрізнявся від такого на дистильованій воді. А саме, і гіпер-, і гіпотермічний стрес вплинули на рослину таким чином, що залучення до метаболізму екзогенного NO спостерігалось, починаючи з 12 години після впливу чинника.

Натомість, вплив патогена на проростки (біотичний стрес) сприяв більш суттєвому та більш ранньому застосуванню донорського NO. Пікова концентрація в тканинах проростків відмічена на четверту годину після припинення дії стресу. Після чого спостерігалось доволі різке зниження кількості кислого азоту. Навіть при достатній його кількості в середовищі він рослиною не використовувався. Імовірно це пов'язано із залученням інших систем захисту, каскад яких був запущений при безумовній участі NO.

Узагальнюючи вищевикладене, можна відзначити, що в цілому характер динамічних змін вмісту метаболітів NO залежить як від виду стресу, так і від наявності в середовищі екзогенного оксиду азоту, який може служити додатковим джерелом сигналів та ефекторів постстресового метаболізму.

Таким чином, наявність у середовищі нітропрусиду натрію дозволяла рослині використовувати його в якості донора NO під час перебудови метаболізму за дії всіх типів стресу. Найбільш активне його використання спостерігалось на 6 та на 12 годину пост- стресового метаболізму. При цьому характер ефективного використання екзогенного NO не залежав від типу стресу. Він визначався, ймовірно, загальними потребами рослини підтримувати баланс сигнальних азотовмісних сполук для регулювання та запуску системних механізмів стійкості для протидії зовнішньому впливу, незалежно від його типу.

ВИСНОВКИ

1. Оксид азоту відіграє суттєву роль у реакціях рослин на дію абіотичних (гіпер- та гіпотермічного) та біотичного стресів, про що свідчить суттєве збільшення вмісту (до 3,5 разів) його метаболітів у період пост-стресової реакції. Картина динамічних змін в азотному метаболізмі клітини на дію окремих стресів різнилась.

2. Використання нітропрусиду натрію в якості донора NO ефективно підвищує його вміст у тканинах у пост-стресовий період та дещо змінює загальну картину реагування. Це визначається загальними потребами рослини підтримувати баланс сигнальних азотовмісних сполук для регулювання та запуску системних механізмів стійкості незалежно від типу зовнішнього впливу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Дмитриев А.П. Сигнальная роль оксида азота у растений / А.П. Дмитриев // Цитология и генетика. – 2004. - №4. - С. 67-75.
2. Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений / И.А. Тарчевский. - М. : Наука, 2002. – 294с.
3. Ribeiro E.A. Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells / E.A. Ribeiro, F.Q. Cunha, W.M. Tamashiro, I.S.Martins // FEBS, 1999. – V. 445. - P.283–286.
4. Pedrosa M.C. Nitric oxide induces cell death in *Taxus* cells / M. C. Pedrosa, JR. Magalhaes, DJ. Durzan // Plant Sci. - 2000. – V. 157.- P.173–180.
5. Mata Carlos Garcia. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress / Garcia Mata Carlos, Lorenzo Lamattina // Plant Physiol. - 2001.- V.126. - P.1196-1204.
6. Garcês Helena. Mechanical stress elicits nitric oxide formation and DNA fragmentation in *Arabidopsis thaliana* / Helena Garcês, Don Durzan, Maria C. Pedrosa // Annals of Botany. - 2001. – V.87. – P. 567-574.
7. Zeie J. Genetic elucidation of nitric oxide signaling in incompatible plant-Pathogen Interactions / J. Zeie, M. Delledonne, T. Mishina, E. Severi // Plant Physiology. - September 2004. - Vol. 136. – P. 2875-2886.
8. Hausladen A Nitric oxide in plant immunity / A. Hausladen, J.S. Stamler // Proc Nat Acad Sci USA. - September 1998. –V. 95 (18).- P.10345–10347.
9. Leshem Y.Y. Evidence for the function of the free radical gas-nitric oxide (NO) as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants / Y.Y. Leshem, R. H. Wills, Ku V. Veng-Va // Plant Physiol Biochem. - 1998. – V. 36. – P.825–833.
10. Clark D. Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase / D. Clark, J. Durner, D.A. Navarre, D. Klessig // Mol. Plant Microbe Interact. - 2000. – V.13. – P.1380–1384.
11. Пат. 41003 А Україна, МПК 7 G01N33/48, 33/52. Спосіб визначення оксиду азоту / Поливода С.Н., Черепок О.О., Войтович О.В., заявник та патентовласник Запорізький державний медичний університет -№ 2000127587; заяв. 27.12.2000; опубл. 15.08.2001, Бюл. №7.