

Обзорные статьи

УДК 543.272.3+581.192

А.П. ДМИТРИЕВ

Институт клеточной биологии
и генетической инженерии НАН Украины, Киев

СИГНАЛЬНАЯ РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА У РАСТЕНИЙ



Открытие оксида азота (NO) как универсального эндогенного соединения, регулирующего метаболизм у организмов, которые стоят на разных ступенях эволюционного развития, стимулировало поток работ, направленных на изучение его многообразных функций у растений. NO может выступать в качестве токсичного агента, регулятора метаболизма, вторичного мессенджера при трансдукции сигнала для активации экспрессии защитных генов. Он индуцирует программированную клеточную гибель, закрывание устьиц, прорастание семян и рост корня. Выяснение роли этой сигнальной молекулы в регуляции цитофизиологических процессов представляет собой «горячую» точку современной клеточной биологии.

© А.П. ДМИТРИЕВ, 2004

Введение. Оксид азота (NO^{\cdot}) — молекула со свойствами радикала, являющаяся важным компонентом каскада защитных реакций, которые участвуют в обеспечении резистентности организма к инфекции. NO^{\cdot} убивает множество патогенных организмов или останавливает их рост. Его биологическая активность обнаружена у различных живых систем — от амебы до человека, но на каждой ступени эволюционного развития она выражена по-своему.

Благодаря широкому спектру физиологических функций оксид азота привлек большое внимание исследователей. В 1992 г. оксид азота был объявлен журналом «Science» молекулой года, а в 1998 г. трем ученым, сделавшим значительный вклад в описание биологической активности NO^{\cdot} , присуждена Нобелевская премия в области медицины [1].

Синтез и биохимическая активность NO^{\cdot} . Физико-химические свойства, синтез и особенности метаболизма NO^{\cdot} к настоящему времени изучены довольно подробно [2]. Поскольку молекула NO^{\cdot} как свободный радикал может отдавать или присоединять неспаренный электрон, то она существует в трех взаимозаменяемых состояниях: радикала (NO^{\cdot}), нитроксильного катион- (NO^{+}) и анион-радикала (NO^{-}) [3]. NO^{\cdot} является газообразным водо- и липорастворимым соединением, поэтому легко дифундирует через цитоплазму и липидную фазу клеточных мембран в соседние клетки. Однако как свободный радикал NO^{\cdot} отличается высокой реакционной способностью и коротким периодом (несколько секунд) своего существования. Обычно NO^{\cdot} быстро реагирует с O_2 с образованием двуокиси азота (NO_2) и затем разлагается в водных растворах до нитрита и нитрата. Следовательно, сфера влияния NO^{\cdot} ограничена клеткой, в которой он образовался, или близлежащими клетками.

NO^{\cdot} синтезируется ферментами из семейства NO -синтаз [4], которые в присутствии кофакторов окисляют гуанидиновую группу L-аргинина до NO^{\cdot} . В клетках животных NO -синтаза в норме практически не обнаруживается. Однако синтез этого фермента индуцируется под действием про-воспалительных и анти-mикробных факторов — γ -интерферона, бактериального липополисахарида и др. В результате оксид азота синтезируется в макрофагах, лейкоцитах и гепатоцитах. Секретируемый ими NO (до 100 нмоль/сут на 10^6 клеток) выполняет

в основном роль противоопухолевого и анти-микробного агента, вызывая задержку деления и гибель чужеродных клеток. Кроме того, в клетках животных NO⁻ выполняет также роль регулятора тонуса сосудов, функции медиатора нервной и иммунной систем организма, взаимодействует с активными формами кислорода (АФК) для инициации клеточной гибели.

В организме потенциально может реализовываться еще ряд реакций, сопровождающихся выделением NO⁻ и названным недавно циклом NO⁻ [5]. Оказалось, что NO⁻ образуется из гидроксиламина в присутствии миоглобина и пероксида водорода, при действии каталазы или из нитрата и нитрита с помощью ксантинооксидредуктазы.

Как фактор иммунной защиты NO⁻ реализует свою антимикробную активность также с помощью образуемых им продуктов — соединений-доноров, транспортирующих и легко отдающих NO⁻, которые являются физиологическими эквивалентами радикала. К ним относятся нитрозотиолы, динитрозильные комплексы железа и нитрозильные производные белков [2].

Таким образом, многообразие химических форм, в которых NO⁻ существует в организме, транспортируется и вызывает биологические эффекты, убедительно свидетельствует о широком спектре его физиологических функций. Полученные к настоящему времени данные показывают, что NO⁻ может оказывать прямое антимикробное действие, участвовать в качестве переносчика сигнала и регулятора метаболизма.

NO⁻ и растения. Физиологи растений до недавнего времени изучали в основном загрязнение атмосферы выбросами NO⁻ и NO₂. Поглощение NO⁻ листьями, его последующая метаболизация и фитотоксичность хорошо известны [6]. Оказалось, что растения не только поглощают атмосферный NO⁻, но и образуют значительные его количества. Наличие NO⁻ у растений сомнений не вызывает. Его синтез осуществляется с помощью фермента NO⁻-сингтазы, или он образуется как побочный продукт при фиксации атмосферного азота и дыхании. В большинстве случаев образование NO⁻ в растительных тканях связано с накоплением NO₂. Оксид азота образуется из NO₂ неферментативным путем в результате превращения каротиноидов под действием света [7], либо с помощью фермента НАДФН-нитратредуктазы [8]. NO⁻ выделяется из растений при обычных условиях и в ответ на абиотические стрессы. Считается, что способность продуцировать NO⁻ свойственна большинству растений.

Существование у растений NO⁻-сингтазы, которая подобна NO⁻-сингтазе у млекопитающих, обнаружено в 1996 г. [9]. NO⁻-сингтазная активность была обнаружена в корнях и клубеньках бобовых растений, где ее индуцировали липополисахариды бактерий семейства *Rhizobium*. Полагают, что NO⁻ участвует в установлении симбиоза и азотфиксации, связываясь с белками, содержащими гемовое и негемовое железо. Однако функция NO⁻ в установлении симбиоза до конца не ясна. С одной стороны, получены данные, что NO⁻ препятствует фиксации азота вследствие своего взаимодействия с лег-гемоглобином, с другой — варьирование уровней NO⁻ приводит к изменению числа образующихся клубеньков [10].

Влияние на рост растений. Имеется немало свидетельств того, что NO⁻ является модулятором роста и развития растений. NO⁻ индуцирует, например, рост листьев и корней у различных растений [11]. Низкие концентрации (0–20 ppM) усиливают рост растений салата [6] и гороха [12], тогда как высокие концентрации (40–80 ppM) подавляют рост томатов. Недавно было показано, что NO⁻ может обратимо подавлять транспорт электронов и синтез АТФ в хлоропластах [13]. Поскольку источником образования NO⁻ может быть нитрит, авторы предположили, что в условиях ограниченного восстановления нитрита НАДФН-нитратредуктазой образующийся NO⁻ мог ингибировать фотосинтез. Это подтвердилось в экспериментах с трансгенными растениями табака [14]. Оказалось, что трансформанты с НАДФН-нитратредуктазой в антисмысловой последовательности отличались повышенным содержанием NO⁻ и угнетением роста.

В ряде работ показано влияние NO⁻ на элонгацию гипокотиляй и междуузлий. Так, доноры NO⁻ подавляли рост гипокотиляй и повышали содержание хлорофилла у растений картофеля, салата и *Arabidopsis* [15]. NO⁻ также повышал содержание хлорофилла в замыкающих клетках

листьев гороха [12] и снижал потери хлорофилла в листьях картофеля, инфицированных *Phytophthora infestans* [16]. Положительное влияние NO[·] на сохранение хлорофилла связано, по-видимому, с его влиянием на доступность железа, которая повышается в присутствии NO[·] [17]. Дефицит железа, как известно, приводит к хлорозу. Обработка донорами NO[·] уменьшала развитие хлороза у растений обычной кукурузы и компенсировала дефицит железа у мутантных линий [17].

В ряде работ показано, что NO[·] может предупреждать старение. Обработка донорами NO[·] листьев гороха в условиях их ускоренного старения приводит к уменьшению образования этилена, гормона старения, за счет подавления его синтеза [18]. Вместе с тем в обработанных газообразным NO[·] листьях *Arabidopsis* уровень содержания этилена, напротив, повышался [19]. Более того, подавление синтеза NO[·] не влияло на образование этилена. Созревание фруктов — процесс также регулируемый этиленом — может замедляться под воздействием NO[·]. Усиление образования этилена при созревании бананов и клубники совпадало с уменьшением выделения ими NO[·] [18, 20]. Кроме того, обработка овощей и фруктов NO[·] замедляла процессы старения и существенно продлевала их послеуборочное хранение.

NO[·] может стимулировать прорастание семян у различных видов растений. Обработка донорами NO[·] выводила семена салата из состояния покоя. Этот эффект ингибировался в присутствии перехватчика NO[·] ФТИО (2-(4-карбоксифенил)-4,4,5,5-тетраметилимидазолин-3-оксид-1-оксил) [15]. В ранних работах сообщалось о влиянии нитрита на прорастание семян различных видов растений. Теперь понятно, что это было связано с образованием NO[·]. Отсюда вытекает важный практический вывод, что уровень содержания нитритов в почве является одним из факторов, влияющих на прорастание семян. Недавно получены убедительные данные о влиянии NO[·] на образование корней. Обработка донорами NO[·] стимулировала образование корней у растений огурца, а стимулирование их образования ауксином обратимо подавлялось перехватчиками NO[·] [21].

Устойчивость к абиотическим стрессам. Известно, что различные абиотические стрессы

(засуха, низкие и высокие температуры, УФ-облучение, озон) могут индуцировать окислительный взрыв — образование АФК [22]. Отличительной чертой АФК является зависящий от их количества дифференциальный эффект: малые количества АФК индуцируют синтез антиоксидантных ферментов, например, глутатион S-трансферазы, тогда как большие количества ведут к запуску опосредованной R-генами реакции сверхчувствительности [23]. АФК играют важную роль в защитных механизмах растений. Они оказывают прямое антимикробное действие, катализируют механическое упрочнение клеточных стенок, являются вторичными мессенджерами в супероксидсингаптазной сигнальной системе и запускают программированной клеточной гибели [24]. NO[·] взаимодействует с АФК различными путями. Например, NO[·] влияет на образование супероксидамиона [25] и подавляет перекисное окисление липидов [26], что свидетельствует о его антиоксидантной роли. Вместе с тем избыток NO[·] приводит к нитроксильному стрессу [2], поэтому для клетки очень важно оптимальное соотношение между АФК и NO[·]. Многие растения страдают от засухи, снижающей их продуктивность. Оказалось, что совместное действие NO[·] и пероксида водорода регулирует закрывание устьиц [27]. Имеются сведения, что NO[·] и АФК могут взаимодействовать для индуцирования синтеза фитогормона абсцизовой кислоты (АБК). Так, в условиях засухи у проростков пшеницы отмечалось повышение NO[·]-сингаптазной активности, а накопление АБК подавлялось ингибиторами NO[·]-сингаптазы [28]. У растений кукурузы под воздействием засухи АБК индуцировала активность НАДФН-оксидазы, что приводило к увеличению образования АФК [29]. Сложные взаимодействия между уровнями NO[·], АБК и АФК мог бы прояснить анализ мутантов, у которых нарушен их синтез. К сожалению, такого рода генетические подходы еще не разработаны.

NO[·] участвует в ответных реакциях растений и на другие типы стрессов. Так, обработка NO[·] растений томатов, пшеницы, кукурузы повышала их устойчивость к действию низких температур [30]. Это также связано, по-видимому, с антиоксидантными свойствами NO[·] — способ-

нностью подавлять высокие уровни образующихся АФК.

Известно, что УФ-В облучение вызывает у растений накопление фенилпропаноидов, выполняющих роль защитного экрана [31]. Оказалось, что индуцированная УФ-В облучением экспрессия халконсигнатазы (фермента, участвующего в синтезе фенилпропаноидов) зависит от фермента, похожего на NO-сигнатазу [32]. Кроме того, предварительная обработка клубней картофеля донорами NO⁻ снижала на 50 % повреждающее действие УФ-облучения [30]. Обработка озоном растений *Arabidopsis* индуцировала NO-сигнатазную активность, которая предшествовала накоплению салициловой кислоты и гибели клеток [33]. Обработка этих же растений NO⁻ приводила к увеличению индуцированного озоном образования этилена и повреждению листьев.

В ответ на поранение растений часто наблюдают повышенное образование NO⁻ и пероксида водорода [34]. Хотя поранение *per se* не вызывает образования NO⁻, обработка растений донорами NO⁻ подавляет генерацию пероксида водорода и индукцию специфических генов, которые экспрессируются в ответ на поранение [35]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что накопление NO⁻ в растительных клетках в ответ на поранение может ингибировать синтез пероксида водорода и активацию защитных реакций. Однако в большинстве случаев NO⁻ стимулирует защитные механизмы растений в ответ на биотический стресс.

Устойчивость к биотическим стрессам. Оказалось, что NO⁻ и, возможно, NO-сигнатаза играют важную роль в индукции защитных реакций. Инфицирование устойчивых, но не восприимчивых, сортов табака ВТМ приводило к увеличению NO-сигнатазной активности [36]. Обработка культуры клеток сои аэвирулентными штаммами *Pseudomonas syringae* pv *glycinea* вызвала быстрый синтез NO⁻, сходный с динамикой образования пероксида водорода [34]. Доноры NO⁻ индуцировали экспрессию генов фенилаланинаммонийлиазы (ФААЛ) и халконсигнатазы, ключевых ферментов фенилпропаноидного метаболизма, а также гибель клеток. Более того, индуцированные заражением экспрессия ФААЛ и гибель клеток сои подав-

лялись ингибиторами NO-сигнатазы. Эти же ингибиторы подавляли индукцию реакции сверхчувствительности (быстрой гибели растительных клеток, в которые проник патоген) в листьях *Arabidopsis* в ответ на инфицирование *P. syringae* pv *maculicola*.

Важной защитной реакцией растительных клеток в ответ на инфицирование является синтез фитоалексинов — индуцированных антибиотических веществ высших растений [37]. Обработка клубней картофеля донорами NO⁻ стимулировала накопление в них фитоалексина ришитина [38], а добавление перехватчика NO⁻ ФТИО подавляло его накопление. Однако в обработанных элиситором клубнях синтез ришитина не изменялся после обработки ФТИО. По-видимому, в результате воздействия биогенного элиситора включаются механизмы синтеза ришитина, в которых эндогенный NO⁻ не участвует. Позже были получены иные результаты. Так, обработка NO⁻ семядолей сои приводила к синтезу в них фитоалексинов [39], а индукция их образования биогенным элиситором подавлялась ингибиторами NO-сигнатазы, что подтверждает участие этого фермента в синтезе фитоалексинов.

Хотя приведенные выше данные свидетельствуют об участии NO-сигнатазы растений в активации защитных реакций, многие вопросы остаются нерешенными. Накопление NO⁻ необходимо для ограничения роста и развития патогена, но неясно, обладает ли NO⁻ непосредственным антимикробным действием, имеются ли у растений специфические кофакторы. У млекопитающих NO-сигнатазная активность, как известно, зависит от кофактора тетрагидробиоптерина [1, 40]. И, наконец, до сих пор гены NO-сигнатазы растений не были клонированы, хотя у *A. thaliana* был идентифицирован гомолог белка, который ингибирует NO-сигнатазу животных [41].

Трансдукция сигнала. Несмотря на участие NO⁻ в индукции защитных реакций растений на различные виды стрессов, о механизмах его взаимодействия с другими сигнальными молекулами для активации этих реакций известно мало. Вряд ли у растительных клеток имеются специальные рецепторы для NO⁻, поскольку это небольшая и быстро диффундирующая молекула. Однако растительные клетки, несомненно, способны воспринимать NO⁻, поскольку

многие клеточные реакции регулируются изменением его концентрации. Важно иметь в виду, что NO^{\cdot} существует в клетке в виде нескольких форм (NO_2 , NO^+ и NO^-), каждая из которых может активировать определенные биохимические реакции. Кроме того, соотношение между этими формами и их нитрозо-производными может изменять протекание многих метаболических процессов.

Несмотря на то, что NO легко диффундирует и участвует в реакциях присоединения, замещения и окисления-восстановления, клетки могут отличаться по своей способности реагировать с ним. В результате сигнальная роль NO⁻ может реализовываться в отдельных клетках или даже в пределах отдельных микродоменов внутри клеток, что соответствует концепции, предложенной для кальциевой сигнальной системы, а также недавно — для пероксида водорода и циклических нуклеотидов [42, 43]. Подвижность и высокая реакционная способность NO позволяют предполагать его непосредственное взаимодействие с белками, регулирующими экспрессию генов, или опосредованное влияние — на протеинкиназы или ферменты, участвующие в синтезе вторичных мессенджеров.

В клетках млекопитающих наиболее хорошо изученной реакцией NO^- является активация фермента гуанилаткиназы (ГЦ), катализирующей реакцию превращения ГТФ в циклический ГТФ (цГТФ). Наличие цГМФ у растений подтверждено с помощью масс-спектрометрии. Показано, что цГМФ может индуцировать активацию защитных генов, кодирующих халконсингтазу и ферредоксин-НАДФ $^{+}$ -оксидоредуктазу, а также стимулировать синтез антицианов в клетках сои [44]. Обработка NO^- вызывала быстрое кратковременное повышение содержания эндогенного цГМФ в клетках табака, что указывает на возможную его роль как вторичного мессенджера. Кроме того, активация с помощью NO^- экспрессии гена *ФААЛ* подавлялась обработкой ингибиторами ГЦ. По-видимому, цГМФ участвует в индукции образования транскриптов *ФААЛ* и халконсингтазы в обработанных NO^- клетках культуры сои [34]. Следует отметить, что в отличие от клеток животных, у растений не были клонированы гены, кодирующие ГЦ либо фосфодиэстеразу, расщепляющую цГМФ, хотя и обна-

ружена фосфодиэстеразная активность по отношению к циклическим нуклеотидам [45].

Существует более длинный сигнальный путь цГМФ, включающий стимуляцию образования циклической формы АДФ-рибозы (цАДФР), которая открывает Ca^{2+} каналы внутриклеточных кальциевых депо, в результате чего повышается концентрация Ca^{2+} в цитозоле [46]. Было показано участие цАДФР в сигнальном пути АБК у томатов и *A. thaliana*. цАДФР высвобождала Ca^{2+} у *Vicia faba*, изменяя проводимость кальциевых каналов вакуоли [47]. Хотя роль цАДФР в большинстве защитных реакций, связанных с Ca^{2+} , не ясна, оказалось, что она индуцирует экспрессию *FA-AL* и *PR-1* в клетках табака, и эта экспрессия подавляется ингибиторами Ca^{2+} -каналов [36]. Интересно отметить, что при активации экспрессии этих двух генов цГМФ и цАДФР скорее всего действуют синергично.

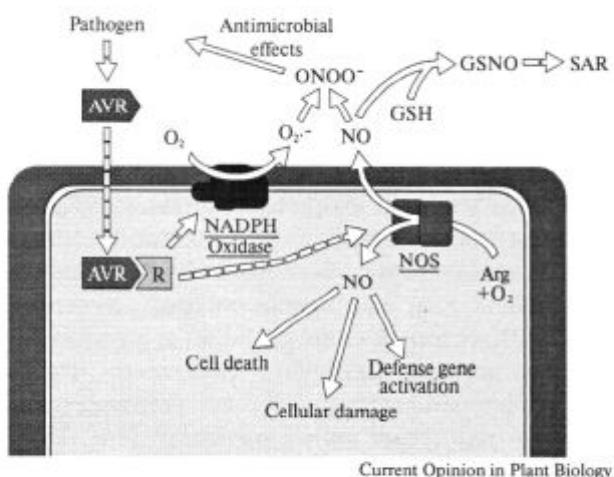
Обсуждается участие NO-сигнальной системы в индуцировании системной устойчивости у растений, т.е. когда активация «локальных» защитных реакций в месте инфицирования может сопровождаться индуцированием устойчивости у всего растения. Для развития системной устойчивости необходимо передвижение мобильного сигнала по флоэме от места инфицирования. Вначале предполагали, что таким сигналом является салициловая кислота (СК) [48]. Однако появилось немало данных, что это не так. Например, первичные листья огурца, инфицированные *P. syringae*, удаляли через 6 ч после инокуляции, когда СК еще не накапливалась во флоэме, и это не сказывалось на последующем системном увеличении содержания СК или экспрессии генов, связанных с системной устойчивостью [49].

Может ли NO[·] служить мобильным сигналом для индуцирования системной устойчивости? У животных важными мишениями NO[·] являются тиолы и вторичные амины. В крови он циркулирует в виде S-нитрозопроизводных белков или низкомолекулярных S-нитрозотиолов, таких как, например, нитрозоглутатион ($\Gamma\text{-SNO}$), который является меж- и внутриклеточным переносчиком NO[·]. Оказалось, что $\Gamma\text{-SNO}$ способен выступать в роли активного индуктора защитных генов растений [36]. Поскольку глутатион является основным метабо-

литом во флоэме и может передвигаться по всему растению, заманчиво предположить, что связанный с глутатионом NO⁻ и является мобильным сигналом при индуцировании системной устойчивости. Вместе с тем широко распространенные гемоглобины растений [50] также могли бы служить переносчиками NO⁻ внутри клетки и на дальние расстояния.

Взаимодействие сигнальных путей. NO⁻, АФК и СК привлекли особое внимание исследователей с точки зрения того, как компоненты одной сигнальной системы могут влиять на функционирование другой сигнальной системы, что позволяет говорить о существовании в клетках растений достаточно скординированной сигнальной сети [24, 46]. Каким образом взаимодействуют NO⁻, АФК и СК для активации защитных реакций у растений? Приведенные данные указывают, что такое взаимодействие является, по-видимому, синергичным и осуществляется по механизму усиления сигнала. АФК и NO⁻ стимулируют синтез СК, которая, в свою очередь, усиливает АФК-NO⁻-зависимые ответные реакции. В результате распознавания элизиторов патогена гипотетическим рецептором растительной клетки образуются АФК и NO⁻, а также накапливается СК, которая усиливает первоначальный сигнал и обеспечивает своевременную активацию защитных генов.

Durner и Klessig [40] предложили интересную модель для объяснения сигнальной роли NO⁻ у растений. Распознавание патогена происходит в результате взаимодействия продукта гена авирулентности (AVR) патогена и продукта гена устойчивости (R) растения-хозяина:



Такое взаимодействие инициирует первый этап трансдукции сигнала — образование АФК (O_2^- и H_2O_2), накопление которых приводит к окислительному взрыву. Супероксиданион образуется, вероятно, при участии НАДФ.Н-оксидазы, а NO⁻ образуется при участии NO⁻-сингтазы. Далее в результате взаимодействия NO⁻ и супероксиданиона образуется пероксинитрит (ONOO⁻), который оказывает токсическое действие на патоген. Внутри клетки NO⁻ активирует транскрипцию защитных генов, вызывает нитрозилирование белков, повреждение растительной клетки и индукцию реакции сверхчувствительности. Внутри- и внеклеточный NO⁻ реагирует с глутатионом (Γ -SH) с образованием нитрозоглутатиона (Γ -SNO), который, предположительно, служит мобильным сигналом, передвигающимся по флоэме для индуцирования системной устойчивости.

Существуют и другие модели, согласно которым сигнальный путь при участии NO⁻ и АФК активируется СК по принципу усилителя [51]. В их пользу свидетельствует тот факт, что обработка СК клеток сои приводит к образованию NO⁻ [52]. Способность СК менять активность различных NO⁻-регулирующих ферментов, в том числе акотиназы и каталазы [53], позволяет говорить об альтернативном механизме, в соответствии с которым СК может играть роль посредника и усиливать действие NO⁻. Появились сообщения о том, что у растений имеется гомолог циклооксигеназы, индуцируемый заражением или обработкой СК [54]. Этот фермент представляет собой основную, активируемую NO⁻ мишень в клетках млекопитающих. Таким образом, NO⁻ и СК могут взаимодействовать синергично, активируя транскрипцию или пост-трансляционную модификацию растительной циклооксигеназы.

Методы определения. Описанные в литературе методы определения NO⁻ можно условно разделить на прямые и косвенные. К первым относятся те, с помощью которых осуществляется непосредственная регистрация NO⁻ либо его комплексов. Прежде всего это метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), позволяющий изучать молекулы с неспаренным электроном. Обычно в качестве индикаторов NO⁻ используют нитрозильные железо-содерж-

жащие комплексы, регистрируемые с помощью ЭПР. Более перспективным представляется метод с использованием карбоксигемоглобина в качестве экзогенной спиновой ловушки для оксида азота [1].

Наиболее чувствительным методом определения NO в клетках, несомненно, является электрохимический метод, который основывается на его катализитическом окислении полимерным металлопорфирином (полупроводником *n*-типа). Существует хемилюминесцентный метод, который основан на регистрации фотонов, излучаемых в реакции NO с озоном. Однако несмотря на высокую чувствительность последнего, его применение к биологическим объектам затруднено из-за сложностей доставки радикала в анаэробную газовую fazу.

Среди непрямых методов определения NO наиболее распространенным методом оценки его синтеза является реакция на нитрит-анион с использованием реагента Грисса [2], которая дает окрашенный диазопродукт с максимумом поглощения при 548 нм.

Высокую чувствительность имеет метод, основанный на фотометрии метгемоглобина, образующегося в результате окисления оксигемоглобина NO. Применение двухволновой спектрофотометрии дает возможность определять до 2 нМ оксида азота. В качестве субстратов также могут быть использованы дезокси- и карбоксигемоглобин. Существенным недостатком, ограничивающим применение этих методик, является необходимость очистки исследуемого объекта от эндогенного гемоглобина, а также от соединений, способных его окислять.

Как известно, NO образуется из L-аргинина в эквимолярном соотношении с L-цитруллином. На этом основан радиометрический метод определения по появлению L-цитруллина, меченного радиоактивной меткой, происходящей из L-аргинина.

Другим необходимым компонентом синтеза является НАДФН⁺. Разница в скорости его окисления в присутствии и в отсутствие ингибитора NO-синтазы может служить показателем синтеза NO. Подобный метод применяется в гистохимии, где регистрируется НАДФН⁺-зависимаяdiaфоразная активность NO-синтазы в присутствии и в отсутствие ее ингибиторов [55].

Заключение. Итак, недавно опубликованный материал свидетельствует о том, что эндогенный NO регулирует самые различные процессы у растений. Его сигнальная роль связана с образованием цГМФ, цАДФР и увеличением концентрации цитозольного кальция. Вместе с тем в большинстве случаев молекулярные механизмы, лежащие в основе биохимических реакций растительной клетки на NO, пока неизвестны. Сходство ответных реакций на NO у разных, далеко отстоящих друг от друга организмов позволяет предполагать, что многие биологические функции NO имеют древнее происхождение.

Для выяснения механизмов влияния NO на морфогенез и индуцирование защитных реакций у растений необходимо выяснение локализации его образования в клетках, разработка методов его количественного определения и более полное знание о ферментах, участвующих в синтезе и деградации оксида азота.

SUMMARY. Discovery of nitric oxide (NO) as a key endogenous molecule, which regulates metabolism among very distantly related organisms, stimulated intensive research related to its multiple functions in plants. NO exerts its cellular effects as toxic agent, metabolism regulator, second messenger during elicitation of different defense responses. It can induce various processes in plants, including programmed cell death, stomatal closure, seed germination and root development. Currently, elucidation of NO signaling role in regulation of cellular responses is a «hot spot» of modern cell biology.

РЕЗЮМЕ. Відкриття оксиду азоту (NO) як універсальної ендогенної сполуки, що регулює метаболізм у організмів на різних ступенях еволюційного розвитку, стимулювало потік робіт, направлених на вивчення його багаточисельних функцій у рослин. NO може виступати як токсичний агент, регулятор метаболізму та вторинний месенджер при трансдукції сигналу для активізації експресії захисних генів. Він індукує програмовану загибель клітин, закриття продихів, проростання насіння та ріст кореня. З'ясування ролі цієї сигнальної молекули в регуляції цитофізіологічних процесів є «гарячою» точкою сучасної клітинної біології.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Проскуряков С.Я., Коноплянников А.Г., Иванников А.И., Скворцов В.Г. Биология оксида азота // Усп. совр. биологии. — 1999. — 119. — С. 380—395.
2. Проскуряков С.Я., Бикетов С.И., Иванников А.И. и др. Оксид азота в механизмах патогенеза внутриклеточных инфекций // Иммунология. — 2000. — 4. — С. 9—20.

3. Wojtaszek P. Nitric oxide in plants: to NO or not to // *Phytochemistry*. — 2000. — **54**. — P. 1–4.
4. Knowles R.G., Monsada S. Nitric oxide synthesis in presence of different co-factors // *Nat. Med.* — 1994. — **298**. — P. 249–258.
5. Рейтова В.П., Сорокина Е.Г. NO-синтазная и нитритредуктазная компоненты цикла оксида азота // *Биохимия*. — 1998. — **63**. — С. 1029–1040.
6. Hufnig C.A., Besford R.T., Wellburn R.A. Effects of NO ([•]NO₂) pollution on growth, nitrate reductase activities and associated protein contents in glasshouse lettuce grown hydroponically in winter with CO₂ enrichment // *New Phytol.* — 1996. — **133**. — P. 495–501.
7. Cooney R.V., Harwood P.J., Custer LJ, Franke A.A. Light-mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids // *Environ. Health Persp.* — 1994. — **102**. — P. 460–462.
8. Wildt J., Kley D., Rockel A., Rockel P., Segschneider H. Emission of NO from higher plant species // *J. Geophys. Res.* — 1997. — **102**. — P. 5919–5927.
9. Cueto M., Hernandez-Perera O., Martin R. et al. Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules // *FEBS Lett.* — 1996. — **398**. — P. 159–164.
10. Herouart D., Baudouin E., Frendo P. et al. Reactive oxygen species, nitric oxide and glutathione: a key role in the establishment of the legume-*Rhizobium* symbiosis? // *Plant Physiol. Biochem.* — 2002. — **40**. — P. 619–624.
11. Wink D.A., Mitchell J.B. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide // *Free Rad. Biol. Med.* — 1998. — **25**. — P. 434–456.
12. Leshem Y.Y., Haramaty E., Iluz D. et al. Effect of stress nitric oxide (NO): interaction between chlorophyll fluorescence, galactolipid fluidity and lipoxygenase activity // *Plant Physiol. Biochem.* — 1997. — **35**. — P. 573–579.
13. Takahashi S., Yamasaki H. Reversible inhibition of photophosphorylation in chloroplasts by nitric oxide // *FEBS Lett.* — 2002. — **512**. — P. 145–148.
14. Morot-Gaudry Y., Rockel P., Moureaux T. et al. Nitrite accumulation and nitric oxide emission in relation to cellular signalling in nitrite reductase antisense plants // *Planta*. — 2002. — **215**. — P. 708–715.
15. Beligni M.V., Lamattina L. Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants // *Planta*. — 2000. — **210**. — P. 215–221.
16. Laxalt A.M., Beligni M.V., Lamattina L. Nitric oxide preserves the level of chlorophyll in potato leaves infected by *Phytophthora infestans* // *Eur. J. Plant Pathol.* — 2000. — **103**. — P. 643–651.
17. Graziano M., Beligni M.V., Lamattina L. Nitric oxide improves iron availability in plants // *Plant Physiol.* — 2002. — **130**. — P. 1852–1859.
18. Leshem Y. Nitric oxide in plants. London. — UK : Kluwer Acad. Publ., 2001.
19. Magalhaes J.R., Monte D.C., Durzan D. Nitric oxide and ethylene emission in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Physiol. Mol. Biol. Plants*. — 2000. — **6**. — P. 117–127.
20. Leshem Y.Y., Pinchasov Y. Non-invasive photoacoustic spectroscopic determination of relative endogenous nitric oxide and ethylene content stoichiometry during the ripening of strawberries *Fragaria ananassa* and avocados *Persea americana* // *J. Exp. Bot.* — 2000. — **51**. — P. 1471–1473.
21. Pagnussat G.C., Simontacchi M., Puntarulo S. et al. Nitric oxide is required for root organogenesis // *Plant Physiol.* — 2002. — **129**. — P. 954–956.
22. Vranova E., Inze D., Van Breusegem F. Signal transduction during oxidative stress // *J. Exp. Bot.* — 2002. — **53**. — P. 1227–1236.
23. Shirasu K., Schulze-Lefert P. Regulators of cell death in disease resistance // *Plant Mol. Biol.* — 2000. — **44**. — P. 371–385.
24. Дмитриев А.П. Сигнальные системы иммунитета растений // *Цитология и генетика*. — 2002. — **36**, № 3. — С. 58–68.
25. Caro A., Puntarulo S. Nitric oxide decreases superoxide anion generation by microsomes from soybean embryonic axes // *Physiol. Plant.* — 1998. — **104**. — P. 357–364.
26. Boveris A.D., Galatzo A., Puntarulo S. Effect of nitric oxide and plant antioxidants on microsomal content of lipid radicals // *Biol. Res.* — 2000. — **33**. — P. 159–165.
27. Neill S.J., Desikan R., Hancock J.T. Nitric oxide signalling in plants // *New Phytol.* — 2003. — **159**. — P. 11–35.
28. Zhao Z., Chen G., Zhang C. Interaction between reactive oxygen species and nitric oxide in drought-induced abscisic acid synthesis in root tips of wheat seedlings // *Aus. J. Plant Physiol.* — 2001. — **28**. — P. 1058–1061.
29. Jiang M., Zhang J. Involvement of plasma membrane NADPH oxidase in abscisic acid- and water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings // *Planta*. — 2002. — **215**. — P. 1022–1030.
30. Lamattina L., Beligni M.V., Garcia-Mata C., Laxalt A.M. 2001. Method of enhancing the metabolic function and the growing conditions of plants and seeds. US Patent. — 2001. — US 6242384 B1.
31. Дмитриев О.П., Гуца М.І. Вплив УФ-В радіації на цито-фізіологічні реакції у рослин // *Цитология и генетика*. — 2003. — **37**, № 6. — С. 66–77.
32. Mackerness S.H., John C.F., Jordan B. et al. Early signaling components in ultraviolet-B responses: distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide // *FEBS Lett.* — 2001. — **489**. — P. 237–242.
33. Rao M.V., Davis K.R. The physiology of ozone induced cell death // *Planta*. — 2001. — **213**. — P. 682–690.
34. Delledonne M., Xia Y., Dixon R. et al. Nitric oxide signal functions in plant disease resistance // *Nature*. — 1998. — **394**. — P. 585–588.
35. Orozco-Cardenas M.L., Ryan C.A. Nitric oxide negatively modulates wound signaling in tomato plants // *Plant Physiol.* — 2002. — **130**. — P. 487–493.
36. Durmer J., Wendehenne D., Klessig D.F. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP and cyclic ADP ribose // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1998. — **95**. — P. 10328–10333.

37. Дмитриев А.П. Фитоалексины и их роль в устойчивости растений. — Киев : Наук. думка, 1999. — 209 с.
38. Noritake T., Kawakita K., Doke N. Nitric oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissue // Plant Cell Physiol. — 1996. — **37**. — P. 113–116.
39. Modolo L.V., Cunha F.Q., Braga M.R. et al. Nitric oxide synthase-mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* elicitor // Plant Physiol. — 2002. — **130**. — P. 1288–1297.
40. Durner J., Klessig D.F. Nitric oxide as a signal in plants // Curr. Opin. Plant Biol. — 1999. — **2**. — P. 369–374.
41. Jaffrey S.R., Snyder S.H. PIN: an associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase // Science. — 1996. — **274**. — P. 774–777.
42. Neill S.J., Desikan R., Hancock J.T. Hydrogen peroxide signalling // Curr. Opin. Plant Biol. — 2002. — **5**. — P. 388–395.
43. Trewavas A.J., Rodrigues C., Rato C. et al. Cyclic nucleotides: the current dilemma! // Curr. Opin. Plant Biol. — 2002. — **5**. — P. 425–429.
44. Bowler C., Neuhaus G., Yamagata H. et al. Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction // Cell. — 1994. — **77**. — P. 73–81.
45. Reggiani R. Alteration of levels of cyclic nucleotides in response to anaerobiosis in rice seedlings // Plant Cell Physiol. — 1997. — **38**. — P. 740–742.
46. Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. — М.: Наука, 2002. — 294 с.
47. Leckie C.P., McAinsh M.R., Allen G.J. et al. Abscisic acid-induced stomatal closure mediated by cyclic ADP-ribose // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1998. — **95**. — P. 15837–15842.
48. Shulaev V., Leon J., Raskin I. Is salicylic acid a translocated signal of systemic acquired resistance in tobacco? // Plant Cell. — 1995. — **7**. — P. 1691–1701.
49. Durner J., Shah J., Klessig D.F. Salicylic acid and disease resistance in plants // Trends Plant Sci. — 1997. — **2**. — P. 266–274.
50. Arredondo-Peter R., Hargrove M.S., Moran J.F. et al. Plant hemoglobins — update on biochemistry // Plant Physiol. — 1998. — **118**. — P. 1121–1125.
51. Van Camp W., Van Montagu M., Inze D. H₂O₂ and NO: Redox signals in disease resistance // Trends Plant Sci. — 1998. — **3**. — P. 330–334.
52. Klepper L. NOx Evolution by soybean leaves treated with salicylic acid and selected derivatives // Pest Biochem. Physiol. — 1991. — **39**. — P. 43–48.
53. Stamler J. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide // Cell. — 1994. — **78**. — P. 931–936.
54. Sanz A., Moreno J.I., Castresana C. PIOX, a new pathogen-induced oxygenase with homology to animal cyclooxygenase // Plant Cell. — 1998. — **10**. — P. 1523–1537.
55. Chigo D., Priotto C., Migliorino D. et al. Follicular fluid proteins stimulate nitric oxide (NO) synthesis in human sperm: a possible role for NO // J. Cell Physiol. — 1998. — **174**. — P. 99–106.

Поступила 31.03.04