

УДК 577.13:581.1

РОЛЬ МОДИФИКАЦИИ СИНТЕЗА NO В РЕАЛИЗАЦИИ ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ ПУТРЕСЦИНА НА ПРОРОСТКИ ПШЕНИЦЫ ПРИ ТЕПЛОВОМ СТРЕССЕ

© 2021 г. Ю. Е. Колупаев¹, *, А. И. Кокорев¹, М. А. Шкляревский¹,
А. А. Луговая¹, Ю. В. Карпец¹, О. Е. Иванченко¹

¹Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева, Харьков, 62483 Украина

²Днепропетровский государственный аграрно-экономический университет, Днепр, 49600 Украина

*e-mail: plant.biology.knau@gmail.com

Поступила в редакцию 27.08.2020 г.

После доработки 23.11.2020 г.

Принята к публикации 22.12.2020 г.

Исследовали значение оксида азота и его функциональных связей с активными формами кислорода (АФК) и кальцием в реализации стресс-протекторных эффектов полиамина путресцина на проростки пшеницы (*Triticum aestivum* L.) при гипертермии. Обработка проростков 1 мМ путресцином в течение 24 ч вызывала быстрое и транзиторное повышение содержания NO в корнях с максимумом через 1 ч после ее начала. При этом отмечалось двукратное увеличение активности диаминооксидазы (ДАО) и снижение активности нитратредуктазы в корнях на 25–30%. Ингибитор ДАО аминогуанидин полностью устранял повышение содержания NO, вызываемое путресцином. Увеличение активности ДАО и содержания NO устранялось и при обработке проростков антагонистами кальция этиленгликоль-бис(2-аминоэтил-эфир)тетрауксусной кислотой (ЭГТА) и неомицином. Скавенджер оксида азота 2-фенил-4,4,5,5-тетраметилимидазолин-1-оксил-3-оксид (РГЮ) полностью нивелировал эффект повышения содержания пероксида водорода в корнях проростков пшеницы при их обработке путресцином. В то же время обработка антагонистом пероксида водорода диметилтиомочевинной лишь немного уменьшала эффект повышения содержания NO в корнях, вызываемый путресцином. Антагонисты NO, АФК и кальция устраняли защитное действие путресцина при тепловом стрессе, определяемое по интенсивности перекисного окисления липидов и выживанию проростков. Сделано заключение о роли оксида азота, синтезирующегося по окислительному пути, и его функционального взаимодействия с АФК и ионами кальция в реализации стресс-протекторного действия путресцина на растительные объекты.

Ключевые слова: путресцин, оксид азота, диаминооксидаза, нитратредуктаза, активные формы кислорода, кальций, теплоустойчивость, *Triticum aestivum*

DOI: 10.31857/S0555109921030065

Полиамины – мультифункциональные физиологически активные вещества, синтез которых характерен для разных групп организмов [1]. У растений их относят к группе стрессовых метаболитов. Во многих работах обнаружено повышение эндогенного содержания полиаминов в ответ на стрессовые воздействия [2–4]. С другой стороны, показана способность экзогенных полиаминов индуцировать устойчивость растений к различным стресс-факторам [1, 3], в том числе к гипертермии [5].

К настоящему времени накоплен определенный объем сведений о механизмах стресс-протекторного действия полиаминов. В клеточной среде полиамины находятся в состоянии органических катионов, что обуславливает их связывание с отрицательно заряженными молекулами белков и

нуклеиновых кислот [2]. Считается, что это способствует формированию функционально эффективной конформации макромолекул и их защите от действия гидролитических ферментов [6]. Показана также способность полиаминов ингибировать активность ДНКаз, РНКаз и протеаз [7]. Мембраностабилизирующее действие полиаминов обусловлено их связыванием с фосфолипидными головками [8]. Также полиамины в клетках могут оказывать прямое антиоксидантное действие, обусловленное связыванием свободных радикалов [9]. Показано, что полиамины обладают способностью модулировать изменение экспрессии отдельных генов непосредственно или путем влияния на процесс фосфорилирования транскрипционных факторов [8].

В последние годы однако феномены защитного действия полиаминов ассоциируют уже не только

с прямым влиянием на макромолекулы и клеточные структуры, а и с их вовлечением в сигнальные процессы [8]. Так, полиамины оказывают влияние на состояние ионных каналов различных типов. Имеются сведения об их способности ингибировать калиевые и неспецифические потенциал-независимые катионные каналы [10]. В то же время, показано, что путресцин может вызывать повышение концентрации цитозольного кальция в растительных клетках [11].

Катаболизм полиаминов с участием ди- и полиаминоксидаз приводит к образованию пероксида водорода в апопласте и пероксисомах [10]. Пероксид водорода является относительно долгоживущей активной формой кислорода с большим сигнальным потенциалом [12]. Его эффекты обусловлены вовлечением в редокс-регуляцию состояния многих белков, влиянием на функционирование ионных каналов и экспрессию ряда генов, важных для защитных реакций [13, 14].

Еще одним сигнальным посредником, вовлеченным в реализацию действия полиаминов, является оксид азота (NO). Показано повышение его содержания в проростках арабидопсиса [15] и каллусной культуре сои [16] при действии экзогенных полиаминов. Однако механизмы усиления генерации NO растениями под влиянием полиаминов пока изучены очень слабо. Предполагают, что NO может образовываться при их деградации с участием ди- и полиаминоксидаз. Так, в корнях растений арабидопсиса, нокаутных по Си-аминоксидазе 1, в ответ на обработку путресцином образовывалось меньшее количество NO, чем у растений дикого типа [17]. Однако в семядолях и листьях таких различий не выявлено. С другой стороны, показана способность экзогенных путресцина, спермина и спермидина ингибировать (по крайней мере, временно) активность нитратредуктазы (НР) в листьях пшеницы [18]. Также показано снижение экспрессии гена НР у растений померанца (*Citrus aurantium*) при действии на них путресцина на фоне солевого стресса, что, в свою очередь, приводило к уменьшению количества нитрозилированных белков [19]. В последние годы получены сведения о значительном вкладе в синтез оксида азота именно пути восстановления нитратов с участием НР [20]. Таким образом, сведения о модификации синтеза NO у растений в присутствии полиаминов пока достаточно противоречивы. Тем более остается открытым вопрос о роли изменений NO-статуса растений в индуцировании их устойчивости к стрессорам экзогенными полиаминами.

Ранее было показано зависимое от образования пероксида водорода индуцирование антиоксидантной системы проростков пшеницы и их теплоустойчивости экзогенным путресцином [21]. При этом эффекты транзитного по-

вышения содержания пероксида водорода и последующего увеличения активности супероксиддисмутазы, каталазы и пероксидазы в корнях проростков, обработанных путресцином, оказались зависимыми от поступления кальция в цитозоль [22]. Как известно, NO как сигнальный посредник находится в тесном функциональном взаимодействии с активными формами кислорода (АФК) и ионами кальция [23].

Цель работы – изучить влияние путресцина на синтез оксида азота по окислительному и восстановительному путям и возможное участие NO в развитии теплоустойчивости проростков, индуцируемой обработкой этим полиамином. Также исследовали влияние кальциевого гомеостаза на синтез NO в корнях проростков и возможные связи между изменениями содержания NO и пероксида водорода при действии путресцина.

МЕТОДИКА

Семена пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Досконала обеззараживали 6%-ным пероксидом водорода в течение 30 мин и проращивали в темноте в течение 4 сут на очищенной водопроводной воде при температуре 18–20°C. Затем в среду инкубации корней добавляли путресцин (в конечной концентрации 1 мМ) и выдерживали проростки в течение 24 ч. Оптимальная концентрация путресцина, при которой наблюдалось максимальное повышение теплоустойчивости проростков, была выбрана ранее [21].

При изучении влияния скавенджера NO РТЮ (2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide – 0.1 мМ), ингибитора диаминоксидазы (ДАО) аминоганидина (1 мМ) [24], ингибитора НР вольфрамата натрия (2 мМ) [23], скавенджера пероксида водорода диметилтиомочевина (ДМТМ – 0.15 мМ) [23], а также 0.5 мМ этиленгликоль-бис(2-аминоэтил-эфир)тетрауксусной кислоты (ЭГТА – хелатор внеклеточного кальция) и 0.2 мМ неомицина – ингибитора образования инозитол-1,4,5-фосфата в реакции, катализируемой фосфолипазой С [22], инкубация корней в растворах составляла 26 ч. При оценке комбинированного действия путресцина и антагонистов сигнальных посредников последние вносили в среду инкубации корней за 2 ч до введения в нее путресцина. Концентрации указанных соединений, максимально модулирующие изучаемые эффекты, но не проявляющие видимого токсического действия, выбирали на основании предварительных опытов.

Биохимические показатели определяли в корнях проростков, поскольку они более чувствительны по сравнению с другими органами проростка к действию экзогенных соединений и повреждающего прогрева [21, 22].

Содержание оксида азота в корнях определяли с использованием реактива Грисса по методу, описанному в работе [25], с незначительными модификациями, подробно изложенными ранее [26].

Содержания пероксида водорода определяли с использованием ферроцианидного метода [27].

Активность ДАО (КФ 1.4.3.6) в корнях определяли по количеству Δ^1 пирролина, образующегося при окислении путресцина, с использованием нингидринового метода [28] с некоторыми модификациями. Растительный материал гомогенизировали на льду в 0.05 М К, Na-фосфатном буфере, рН 7.8. Гомогенат центрифугировали в течение 15 мин при 10000 g на центрифуге MPW 350R ("MPW MedInstruments", Польша) при температуре 2–4°C. В пробирку вносили 3.0 мл реакционной смеси, содержащей 10 мкМ путресцин и 0.1 мкМ пиридоксальфосфат, приготовленные на 0.05 мМ фосфатном буфере, рН 7.8. Реакцию начинали добавлением 0.5 мл супернатанта растительного материала, смесь инкубировали в водяном термостате при 37°C в течение 1 ч. Реакцию останавливали добавлением 0.5 мл 10%-ной ТХУ, смесь снова центрифугировали в течение 7 мин при 10000 g. В реакционные пробирки вносили по 1 мл супернатанта, добавляли по 1 мл нингидринового реактива, содержащего 250 мг нингидрина и 37.6 мг гидриндантина, растворенных в 10 мл смеси из ледяной уксусной кислоты и 6 М о-фосфорной кислоты в соотношении 3:2. После этого в смесь добавляли по 1.5 мл ледяной уксусной кислоты, перемешивали и кипятили на водяной бане в течение 30 мин для проявления окрашивания. Смесь затем охлаждали и измеряли оптическую плотность (ОП) на спектрофотометре СФ-46 ("ЛОМО", Россия) при 510 нм. Измерения проводили относительно контрольной пробы с идентичным набором реактивов и супернатантом, предварительно инактивированным 10-минутным нагревом на кипящей водяной бане. Активность фермента выражали в мкмоль Δ^1 пирролина/(г сырой массы × ч).

Активность НР (КФ 1.7.1.1) определяли *in vitro* по количеству образующегося продукта реакции нитрита [29]. Растительный материал гомогенизировали на льду в 0.05 М К, Na-фосфатном буфере, рН 7.8, гомогенат центрифугировали в течение 15 мин при 4000 g при температуре 2–4°C. К 3 мл супернатанта добавляли по 0.5 мл 0.1 М KNO_3 и 5 мМ НАДН. В контрольную пробу вместо НАДН добавляли 0.5 мл дистиллированной воды. Реакцию проводили при 25°C в течение 30 мин, после чего останавливали добавлением 0.5 мл ледяной уксусной кислоты. Для осаждения белков пробы центрифугировали 10 мин при 8000 g. К 3 мл супернатанта добавляли 3 мл 1%-ного реактива Грисса в 12%-ной уксусной кислоте. Через 30 мин измеряли ОП раствора при 527 нм. Активность

фермента выражали в мкмоль нитрита/(г сырой массы ч).

Для определения продуктов пероксидного окисления липидов (ПОЛ), реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (преимущественно малоновый диальдегид, МДА), через 1 сут после повреждающего прогрева проростков в водяном ультратермостате при температуре $45.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ в течение 10 мин, корни гомогенизировали в реакционной среде, содержащей 0.25%-ную 2-тиобарбитуровую кислоту в 10%-ной ТХУ. Гомогенат помещали в кипящую баню на 30 мин, затем охлаждали и центрифугировали 15 мин при 10000 g. ОП супернатанта определяли при 532 нм (максимум поглощения МДА) и 600 нм (для поправки на неспецифическое поглощение) [30].

Для определения теплоустойчивости проростки всех вариантов после повреждающего прогрева переносили на очищенную водопроводную воду. Через 3 сут оценивали относительное количество выживших проростков, к которым относили проростки, не имеющие признаков некроза на листьях и сохраняющие способность к росту.

Эксперименты проводили в 4-кратной биологической повторности. На рисунках приведены средние величины и их стандартные ошибки. Кроме случаев, оговоренных специально, обсуждаются различия между вариантами, достоверные при $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Обработка проростков пшеницы путресцином вызывала значительное повышение содержания оксида азота в корнях уже через 0.5 ч после ее начала (рис. 1). Через 1 ч количество NO в варианте с путресцином превышало соответствующую величину контроля на 73%. Однако уже к 2 ч инкубации в присутствии путресцина содержание оксида азота в корнях проростков опытного варианта заметно снижалось, а через 4 и 24 ч не отличалось от контроля.

Одним из возможных ферментов, задействованных в синтезе NO по окислительному пути, считается ДАО [31]. Добавление путресцина в среду приводило к быстрому увеличению активности ДАО в корнях проростков (рис. 2а), заметный эффект наблюдался уже через 15 мин действия полиамина. Максимальные значения активности фермента, которые превышали величины контроля почти в 2 раза, наблюдались через 1 ч после начала обработки проростков путресцином. В дальнейшем активность ДАО в корнях опытного варианта постепенно снижалась, однако и через 24 ч несколько превышала значения в контроле.

В качестве основного фермента, который может катализировать образование NO по восстановительному пути, рассматривается НР [20]. Одна-

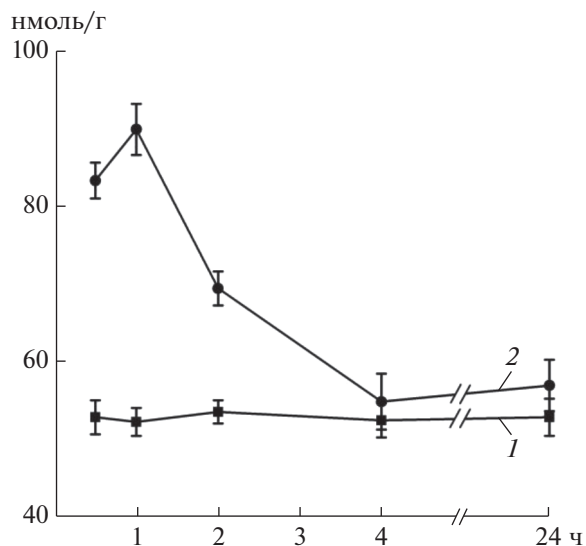


Рис. 1. Динамика содержания оксида азота (нмоль/г сырой массы) в корнях проростков пшеницы при действии путресцина. 1 – контроль; 2 – путресцин (1 мМ).

ко обработка проростков путресцином вызывала снижение активности НР (рис. 2б). Существенный эффект отмечался через 1–4 ч после начала инкубации на среде с добавлением полиамина, а через 24 ч значения активности фермента приближались к величинам контроля.

Обработка проростков ингибитором ДАО аминоксидом уменьшала активность фермента и полностью нивелировала ее повышение, вызываемое путресцином (рис. 3). Поскольку, как отмечалось, оксид азота, АФК и ионы кальция находятся

в тесных функциональных связях друг с другом [23], исследовали влияние сквенджера пероксида водорода ДМТМ и кальциевых антагонистов на активность ДАО в корнях проростков пшеницы, обработанных путресцином. Установлено, что обработка ДМТМ лишь незначительно уменьшала происходящее под влиянием путресцина повышение активности ДАО (рис. 3). В то же время под влиянием как ЭГТА, так и неомицина, отмечалось полное устранение вызываемого путресцином повышения активности ДАО (рис. 3).

Характер изменения содержания NO в корнях проростков пшеницы под влиянием исследуемых модуляторов совпадал с таковым для ДАО. Обнаружено, что обработка проростков аминоксидом, ингибирующим ДАО и NO-синтазу (ферменты окислительного пути синтеза NO), вызвала уменьшение содержания оксида азота в корнях (рис. 4). При комбинированном действии на проростки путресцина и аминоксидина этот ингибитор полностью устранял повышение содержания NO, вызываемое действием полиамина. Обработка проростков ингибитором НР вольфраматом натрия почти не влияла на количество оксида азота в корнях и очень слабо уменьшала вызываемый путресцином эффект усиления генерации NO клетками корней (рис. 4).

Антагонисты кальция ЭГТА и неомицин сами по себе практически не влияли на содержание оксида азота в корнях, однако полностью устраняли эффект увеличения количества NO в корнях в присутствии путресцина (рис. 4).

Антиоксидант ДМТМ не влиял на содержание оксида азота в корнях и лишь частично снимал вызываемое путресцином повышение количества

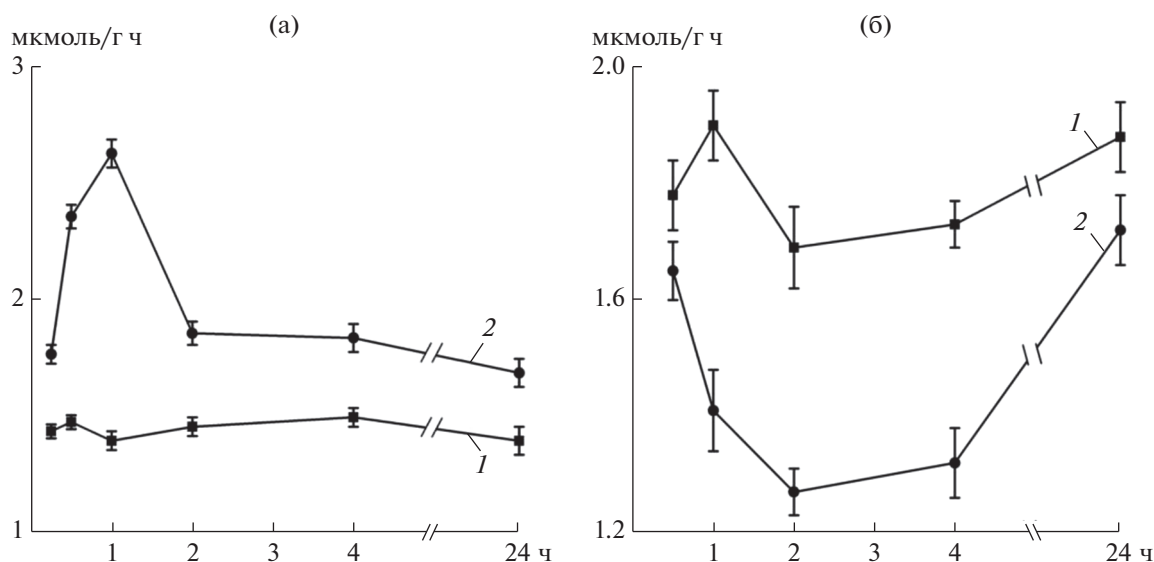


Рис. 2. Динамика активности ДАО ((а), мкмоль Δ¹пирролина/г сырой массы × ч) и НР ((б), мкмоль NO₂⁻/г сырой массы × ч) в корнях проростков пшеницы при действии путресцина. 1 – контроль; 2 – путресцин (1 мМ).

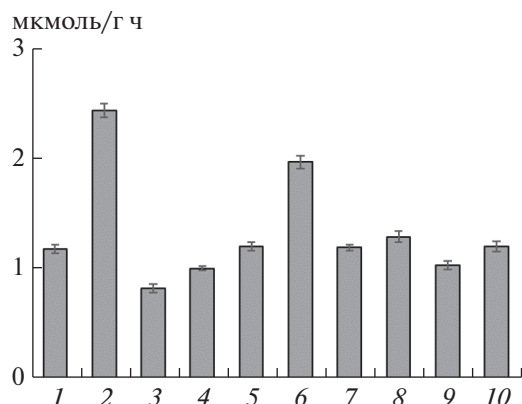


Рис. 3. Активность ДАО (мкмоль Δ^1 пирролина/г сырой массы \times ч) в корнях проростков пшеницы при действии путресцина, аминокуанидина, ДМТМ и модуляторов кальциевого гомеостаза. 1 – контроль; 2 – путресцин (1 мМ); 3 – аминокуанидин (1 мМ); 4 – путресцин (1 мМ) + аминокуанидин (1 мМ); 5 – ДМТМ (0.15 мМ); 6 – путресцин (1 мМ) + ДМТМ (0.15 мМ); 7 – ЭГТА (0.5 мМ); 8 – путресцин (1 мМ) + ЭГТА (0.5 мМ); 9 – неомицин (0.2 мМ); 10 – путресцин (1 мМ) + неомицин (0.2 мМ). Активность ДАО определяли через 1 ч после начала инкубации проростков на среде с путресцином и/или через 3 ч после начала обработки другими соединениями.

НО в корнях (рис. 4). В то же время под влиянием сквенджера оксида азота РГЮ происходило практически полное устранение эффекта повышения содержания пероксида водорода в корнях проростков в присутствии путресцина (рис. 5). В варианте с обработкой корней только РГЮ содержание H_2O_2 почти не отличалось от контроля. Таким образом, происходящее при обработке проростков путресцином повышение содержания пероксида водорода в корнях зависело от их НО-статуса. Ранее в идентичных экспериментальных условиях было обнаружено устранение эффектов вызываемого путресцином повышения содержания H_2O_2 в корнях проростков при их обработке антагонистами кальция – ЭГТА и неомицином [22].

Обработка путресцином индуцировала развитие теплоустойчивости, что выражалось в уменьшении проявления окислительного стресса, регистрируемого по накоплению продукта ПОЛ МДА, и повышению выживания проростков через 3 сут после повреждающего воздействия (рис. 6). Воздействие на проростки РГЮ не оказывало влияния на уровень ПОЛ и теплоустойчивость, но полностью снимало защитные эффекты путресцина. При обработке проростков ингибитором ДАО и НО-синтазы аминокуанидином существенных изменений содержания МДА в корнях проростков после теплового стресса не наблюдали. При этом аминокуанидин частично снимал эффект защиты от окислительного стресса, вызываемый

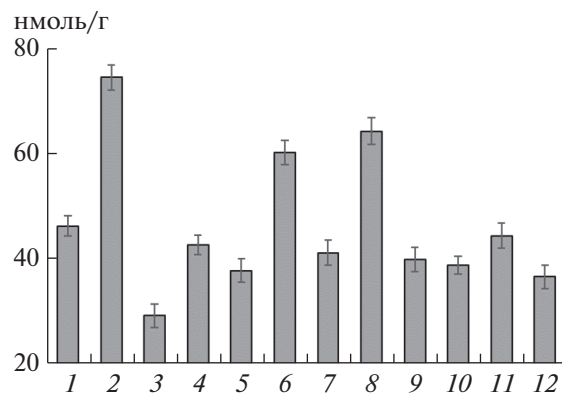


Рис. 4. Содержание оксида азота (нмоль/г сырой массы) в корнях проростков пшеницы при действии путресцина, аминокуанидина, вольфрамата натрия, ДМТМ и модуляторов кальциевого гомеостаза. 1 – контроль; 2 – путресцин (1 мМ); 3 – аминокуанидин (1 мМ); 4 – путресцин (1 мМ) + аминокуанидин (1 мМ); 5 – вольфраMAT натрия (2 мМ); 6 – путресцин (1 мМ) + вольфраMAT натрия (2 мМ); 7 – ДМТМ (0.15 мМ); 8 – путресцин (1 мМ) + ДМТМ (0.15 мМ); 9 – ЭГТА (0.5 мМ); 10 – путресцин (1 мМ) + ЭГТА (0.5 мМ); 11 – неомицин (0.2 мМ); 12 – путресцин (1 мМ) + неомицин (0.2 мМ). Содержание NO определяли через 1 ч после начала инкубации проростков на среде с путресцином и/или через 3 ч после начала обработки другими соединениями.

путресцином. Выживание проростков в вариантах с аминокуанидином и его комбинацией с путресцином не отличалось от контроля (рис. 6). Таким образом, этот ингибитор устранял стресс-протекторное действие путресцина. Под влиянием ингибитора НР вольфрамата натрия содержание МДА в корнях проростков, как и их выживание после повреждающего нагрева, не изменялось.

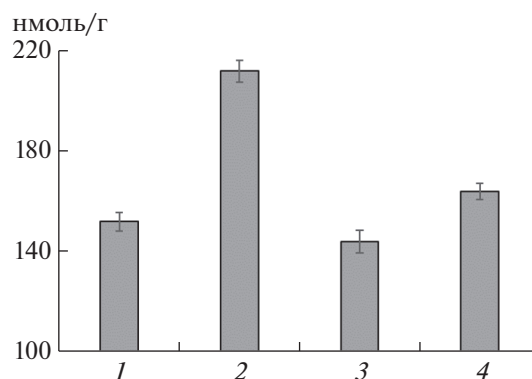


Рис. 5. Содержание пероксида водорода (нмоль/г сырой массы) в корнях проростков пшеницы при действии путресцина и РГЮ. 1 – контроль; 2 – путресцин (1 мМ); 3 – РГЮ (0.1 мМ); 4 – путресцин (1 мМ) + РГЮ (0.1 мМ). Содержание H_2O_2 определяли через 2 ч после начала инкубации проростков на среде с путресцином и/или через 4 ч после начала обработки РГЮ.

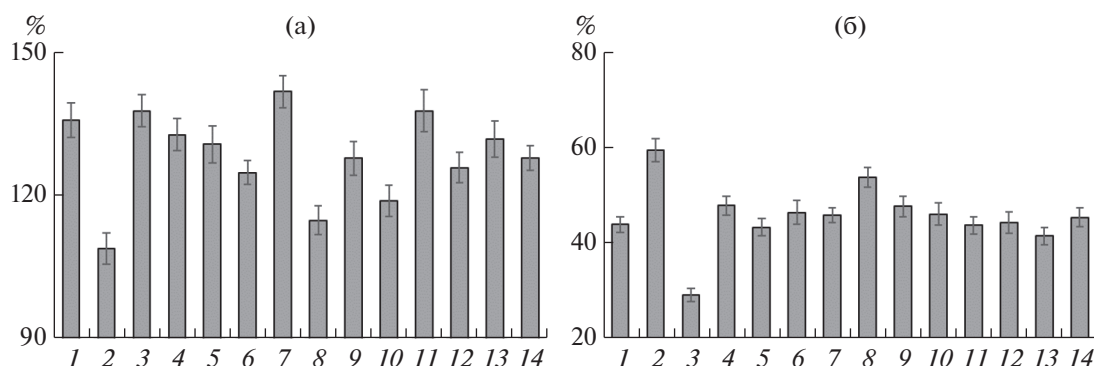


Рис. 6. Содержание МДА (% к контролю без прогрева) в корнях (а) и выживание (%) проростков пшеницы (б) после повреждающего прогрева: 1 – контроль; 2 – путресцин (1 мМ); 3 – РТЮ (0.1 мМ); 4 – путресцин (1 мМ) + РТЮ (0.1 мМ); 5 – амингуанидин (1 мМ); 6 – путресцин (1 мМ) + амингуанидин (1 мМ); 7 – вольфрамат натрия (2 мМ); 8 – путресцин (1 мМ) + вольфрамат натрия (2 мМ); 9 – ДМТМ (0.15 мМ); 10 – путресцин (1 мМ) + ДМТМ (0.15 мМ); 11 – ЭГТА (0.5 мМ); 12 – путресцин (1 мМ) + ЭГТА (0.5 мМ); 13 – неомицин (0.2 мМ); 14 – путресцин (1 мМ) + неомицин (0.2 мМ). Содержание МДА определяли через 24 ч, выживание проростков – через 3 сут после повреждающего прогрева.

При этом в присутствии указанного ингибитора в значительной степени сохранялись эффекты защиты от окислительного стресса и повышения выживания проростков после повреждающего прогрева, вызываемые путресцином (рис. 6).

Обработка антиоксидантом ДМТМ сама по себе немного уменьшала вызываемое прогревом накопление МДА в корнях проростков, хотя этот эффект не был достоверным при $P \leq 0.05$ (рис. 6). Также в присутствии ДМТМ, по крайней мере частично, сохранялся эффект защиты клеток корней от окислительного стресса, индуцированный путресцином. При этом, однако, ДМТМ, не влияя сам по себе на выживание проростков после теплового стресса, полностью устранял положительный эффект путресцина (рис. 6).

Антагонисты кальция ЭГТА и неомицин, сами по себе не оказывая влияния на накопление продукта ПОЛ МДА при тепловом стрессе, частично снимали эффект предотвращения развития окислительного стресса, вызываемый путресцином. Также эти антагонисты полностью устраняли повышение выживания проростков, обработанных путресцином. При этом сами по себе антагонисты кальция существенного влияния на теплоустойчивость проростков не оказывали (рис. 6).

Таким образом, полученные результаты свидетельствовали об участии NO как сигнального посредника в развитии теплоустойчивости проростков пшеницы под влиянием экзогенного путресцина. На это указывало транзитное увеличение содержания оксида азота в корнях при их инкубации в присутствии путресцина и устранение его стресс-протекторного действия сквенджером NO РТЮ. Есть основания полагать, что одной из основных причин повышения содержания NO в клетках корней в присутствии путресцина является увеличение активности ДАО, которое

было особенно заметным в течение первого часа после начала воздействия полиамина (рис. 2). Механизм образования NO в клетках растений под влиянием ДАО остается не известным [8]. Однако этот фермент рассматривается в качестве одной из составляющих ферментативной системы синтеза оксида азота в растительных клетках [31]. Вызываемое путресцином повышение содержания оксида азота устранялось ингибитором ДАО амингуанидином (рис. 4). Как уже отмечалось, амингуанидин обладает способностью наряду с ДАО ингибировать NO-синтазу [24]. Наличие этого фермента у высших растений не доказано молекулярно-генетическими методами. Предполагается, что наземные растения во время эволюции утратили ген, гомологичный NO-синтазе животных [32]. Однако не исключено, что у высших растений в пероксисомах имеются белки, отличные от NO-синтазы, но способные генерировать NO, используя L-аргинин в качестве субстрата. Следует отметить, что в качестве основных субстратов для образования NO в окислительном пути в настоящее время рассматривают не только L-аргинин, но и полиамины, в том числе диамин – путресцин, окисление которого катализируется ДАО [33]. Таким образом, данные ингибиторного анализа в нашем случае позволяют говорить об основном вкладе окислительного пути синтеза NO, который угнетается амингуанидином.

С другой стороны, активность НР в корнях проростков в условиях наших экспериментов под влиянием путресцина не только не повышалась, а заметно снижалась (рис. 2б). Это указывало на перераспределение в присутствии экзогенного путресцина вклада окислительного и восстановительного путей синтеза NO в пользу первого. Как отмечалось, в работе [18] была установлена способность различных полиаминов ингибировать

активность НР. Такой эффект полиаминов имеет сходство с действием одного из основных субстратов окислительного пути синтеза NO у растений – L-аргинина. Ранее был показан эффект угнетения зависящего от экзогенных нитратов синтеза NO в корнях проростков пшеницы при их обработке L-аргином [34]. Данные настоящей работы, также полученные на корнях проростков пшеницы, указывают на сходство ингибирующего влияния L-аргинина и путресцина на активность НР и, как следствие, на образование NO по восстановительному пути. При этом путресцин оказывает сильное активирующее влияние на ДАО и, возможно, другие ферментативные системы, обеспечивающие образование оксида азота по окислительному пути и увеличение его количества в корнях.

Следует отметить, что модулировать содержание оксида азота могут различные полиамины, при этом их влияние на ферментативные системы, синтезирующие NO, может быть достаточно специфичным. Например, на растениях томатов показано повышение содержания NO в листьях в условиях гипотермии под влиянием спермина и спермидина, но не путресцина [35]. При этом повышение содержания оксида азота при обработке растений спермином и спермидином было связано с увеличением активности НР.

Другим важным участником сигнальной сети, задействованной в реализации эффектов экзогенных полиаминов, является пероксид водорода. Ранее было показано, что при обработке проростков скавенджером H_2O_2 ДМТМ не происходило активации антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы и гваяколпероксидазы), вызываемой путресцином [21]. В настоящей работе установлено, что вызываемое путресцином усиление синтеза пероксида водорода в значительной степени зависит от наличия в клетках оксида азота и угнетается его скавенджером РТЮ (рис. 5). С другой стороны, образование NO, усиливающееся при обработке проростков путресцином, лишь частично уменьшалось в присутствии скавенджера пероксида водорода ДМТМ. Динамика увеличения содержания NO и H_2O_2 в корнях проростков пшеницы была похожей. Повышенное количество обоих посредников отмечалось в течение первых двух часов после начала инкубации корней в присутствии путресцина. Однако максимум содержания NO был зарегистрирован через 1 ч (рис. 1), а пероксида водорода через 2 ч после начала воздействия путресцина [21]. Можно полагать, что образование двух посредников взаимозависимое, но не исключено, что оксид азота в сигнальном пути все же находится выше пероксида водорода. H_2O_2 может быть продуктом реакции окисления путресцина под действием ДАО. Ранее было показано уменьшение содержания

пероксида водорода в корнях, обработанных путресцином, в присутствии аминогуанидина. С другой стороны, стимулированное путресцином накопление пероксида водорода угнеталось и ингибитором НАДФН-оксидазы имидазолом [21]. Возможно, что при обработке корней путресцином сначала происходила активация ДАО, за счет которой формируется начальный, необходимый для запуска сигнальных процессов пул пероксида водорода. В начальный период такого воздействия, усиливалась и генерация NO. Не исключено, что поддержание достаточно высокого пула H_2O_2 при действии путресцина в дальнейшем может быть обусловлено повышением активности НАДФН-оксидазы. Известно, что активность этого фермента может повышаться под влиянием NO [36], причем такой эффект может быть опосредован NO-индуцированным изменением концентрации кальция в цитозоле [13].

Как отмечалось, ионы кальция находятся в тесном функциональном взаимодействии как с NO, так и с АФК. В условиях наших экспериментов эффект повышения содержания оксида азота в корнях проростков, вызываемый путресцином, устранялся двумя используемыми кальциевыми антагонистами – ЭГТА (хелатор внеклеточного кальция) и неомицином (ингибитор фосфолипазы C, с участием которой образуется инозитол-1,4,5-фосфат, открывающий внутриклеточные кальциевые каналы) (рис. 4). Эти же антагонисты кальция снимали эффект активации путресцином ДАО (рис. 3).

Влияние кальция на активность ДАО у растений исследовано слабо. Хотя на ряде растительных объектов зарегистрировано повышение ее активности при обработке экзогенным Ca^{2+} [37, 38]. ДАО локализована в клеточных стенках [39]. Возможно, что в ее активации задействован кальций, попадающий в апопласт при усилении путресцином его выхода из клеток [10]. Кроме того, известна способность полиаминов вытеснять кальций из его комплексов с пектиновыми веществами клеточных стенок [40]. Таким образом, вероятно, как начальные эффекты, вызываемые экзогенным путресцином, так и последующие, обусловленные вовлечением различных посредников, являются кальций-зависимыми. Ранее в идентичных экспериментальных условиях было установлено, что вызываемое путресцином повышение содержания пероксида водорода в корнях пшеницы и последующая активация антиоксидантной ферментативной системы являются кальций-зависимыми процессами [22].

* * *

Результаты, полученные в настоящей работе, позволяют предположить, что наиболее ранними

процессами, развивающимися при действии пу-тресцина на клетки корней, являются изменения кальциевого гомеостаза и связанная с ними активация ДАО. С участием ДАО происходит синтез пероксида водорода и оксида азота. Эти посредники также могут реализовать свои сигнальные эффекты при участии кальция. Есть основания полагать, что активация сигнальных каскадов, главными компонентами которых являются Ca^{2+} , NO и АФК, индуцирует протекторные системы, обеспечивающие развитие теплоустойчивости. Одной из них является антиоксидантная система. Об этом свидетельствуют данные о зависимости индуцируемого путресцином повышения активности антиоксидантных ферментов [21, 22] и снижения окислительных повреждений (рис. 6а) от кальциевого гомеостаза, образования АФК с участием ДАО и НАДФН-оксидазы, а также синтеза NO. Таким образом, биогенные полиамины (в частности, путресцин) следует рассматривать в качестве достаточно мощных модуляторов функционирования сигнальных сетей и активаторов стресс-протекторных реакций растений. В связи с этим в ближайшей перспективе практический интерес может представлять как применение экзогенных полиаминов в растениеводстве, так и трансформация растений генами ферментов синтеза полиаминов [41].

Авторы выражают благодарность за поддержку проекту Czech Republic Development Cooperation “Платформа AgriSciences для развития науки в высших учебных заведениях Украины”, который позволил начать это исследование.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gupta K., Dey A., Gupta B. // *Acta Physiol. Plant.* 2013. V. 35. P. 2015–2036.
- Bouchereau A., Aziz A., Larher F., Martin-Tanguy J. // *Plant Sci.* 1999. V. 140. P. 103–125.
- Gill S.S., Tuteja N. // *Plant Signal. Behav.* 2010. V. 5. № 1. P. 26–33.
- Saha J., Brauer E.K., Sengupta A., Popescu S.C., Gupta K., Gupta B. // *Front. Environ. Sci.* 2015. V. 3. Art. 21. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2015.00021>
- Sagor G.H., Berberich T., Takahashi Y., Niitsu M., Kusano T. // *Transgenic Res.* 2013. V. 22. № 3. P. 595–605.
- Кузнецов Вл.В., Радюкина Н.Л., Шевякова Н.И. // *Физиология растений.* 2006. Т. 53. № 5. С. 658–683.
- Sobieszczuk-Nowicka E., Legocka J. // *Plant Biol. (Stuttg).* 2014. V. 16. № 2. P. 297–305.
- Pal M., Szalai G., Janda T. // *Plant Sci.* 2015. V. 237. P. 16–23.
- Ha H.C., Sirisoma N.S., Kuppusamy P., Zweier J.L., Woster P.M., Casero R.A.Jr. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. 95. № 19. P. 11140–11145.
- Pottosin I., Shabala S. // *Front. Plant Sci.* 2014. V. 5. Art. 154. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00154>
- Bose J., Pottosin I.I., Shabala S.S., Palmgren M.G., Shabala S. // *Front. Plant Sci.* 2011. V. 2. Art. 85. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00085>
- Креславский В.Д., Лось Д.А., Аллахвердиев С.И., Кузнецов Вл.В. // *Физиология растений.* 2012. Т. 59. № 2. С. 163–178.
- Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. // *Ukr. Biochem. J.* 2014. V. 86. № 4. P. 18–35.
- Kohli S.K., Handa N., Gautam V., Bali S., Sharma A., Khanna K., Arora S., Thukral K.A., Ohri P., Karpets Yu., Kolupaev Yu., Bhardwaj R. // *Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation under Abiotic Stress.* / Eds. M.I.R. Khan, N.A. Khan. Singapore: Springer Nature Pte Ltd, 2017. P. 185–214.
- Tun N.N., Santa-Catarina C., Begum T., Silveira V., Handro W., Floh E.I.S., Scherer G.F.E. // *Plant Cell Physiol.* 2006. V. 47. № 3. P. 346–354.
- Yang B., Wu J., Gao F., Wang J., Su G. // *Plant Physiol. Biochem.* 2014. V. 79. P. 41–47.
- Wimalasekera R., Villar C., Beguma T., Scherer G.F.E. // *Mol. Plant.* 2011. V. 4. P. 663–678.
- Rosales E.P., Iannone M.F., Groppa M.D., Benavides M.P. // *Amino Acids.* 2012. V. 42. № 2–3. P. 857–865.
- Tanou G., Ziogas V., Belghazi M., Christou A., Filippou P., Job D., Fotopoulos V., Molassiotis A. // *Plant Cell Environ.* 2014. V. 37. № 4. P. 864–885.
- Mur L.A.J., Mandon J., Persijn S., Cristescu S.M., Moskhov I.E., Novikova G.V., et al. // *AoB Plants.* 2013. V. 5. Art. pls052. <https://doi.org/10.1093/aobpla/pls052>
- Kolupaev Yu.E., Kokorev A.I., Yastreb T.O., Horielova E.I. // *Ukr. Biochem. J.* 2019. V. 91. № 6. P. 103–111.
- Kolupaev Yu.E., Kokorev A.I., Shkliarevskiy M.A. // *Vestnik Tomskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Biologiya. Tomsk State University Journal of Biology.* 2020. V. 51. P. 105–122. <https://doi.org/10.17223/19988591/51/6>
- Глянько А.К., Митанова Н.Б., Степанов А.В. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2012. Т. 48. № 1. С. 95–102.
- Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О., Обозный А.И. // *Физиология растений.* 2016. Т. 63. № 4. С. 521–531.
- Zhou B., Guo Z., Xing J., Huang B. // *J. Exp. Bot.* 2005. V. 56. № 422. P. 3223–3228.
- Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е., Вайнер А.А. // *Физиология растений.* 2015. Т. 62. № 1. С. 72–78.
- Sagisaka S. // *Plant Physiol.* 1976. V. 57. № 2. P. 308–309.
- Naik B.I., Goswami R.G., Srivastava S.K. // *Anal. Biochem.* 1981. V. 111. № 1. P. 146–148.
- Галеева Е.И., Трифонова Т.В., Пономарева А.А., Викторова Л.В., Минабаева Ф.В. // *Биохимия.* 2012. Т. 77. № 4. С. 512–520.
- Фазлиева Э.Р., Киселева И.С., Жуйкова Т.В. // *Физиология растений.* 2012. Т. 59. № 3. С. 369–375.
- Wimalasekera R., Villar C., Begum T., Scherer G.F. // *Mol. Plant.* 2001. V. 4. № 4. P. 663–678.
- Jeandroz S., Wipf D., Stuehr D.J., Lamattina L., Melkonian M., Tian Z. et al. // *Sci. Signal.* 2016. V. 9. № 417.

- P. re2.
<https://doi.org/10.1126/scisignal.aad4403>
33. Gupta K.J., Hancock J.T., Petrivalsky M., Kolbert Z., Lindermayr C., Durner J., et al. // *New Phytol.* 2020. V. 225. № 5. P. 1828–1834.
 34. Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е., Луговая А.А., Швиденко Н.В., Ястреб Т.О. // *Физиология растений.* 2018. Т. 65. № 6. С. 472–480.
 35. Diao Q., Song Y., Shi D., Qi H. // *Front. Plant Sci.* 2017. V. 8. Art. 203.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00203>
 36. Tewari R.K., Hahn E.J., Paek K.Y. // *Plant Cell Rep.* 2008. V. 27. № 3. P. 563–573.
 37. Piterková J., Luhová L., Zajoncová L., Šebela M., Petrivalský M. // *Plant Protect. Sci.* 2012. V. 48. № 2. P. 53–64.
 38. Wang K., Xu F., Cao S., Wang H., Wei Y., Shao X., Zhou W., Zheng Y. // *Postharvest Biology and Technology.* 2019. V. 152. № 2. P. 111–117.
 39. Шарова Е.И., Медведев С.С. // *Физиология растений.* 2017. Т. 64. № 1. С. 3–18.
 40. Messiaen J., Van Cutsem P. // *Planta.* 1999. V. 208. № 2. P. 247–256.
 41. Prabhavathi V.R., Rajam V.R. // *Plant Biotechnol.* 2007. V. 24. № 3. P. 273–282.

The Role of NO Synthesis Modification in the Implementation of the Protective Effect on Wheat Seedlings under Heat Stress by Putrescine

Yu. E. Kolupaev^{a, *}, A. I. Kokorev^a, M. A. Shkliarevskiy^a, A. A. Lugovaya^a,
 Yu. V. Karpets^a, and O. E. Ivanchenko^b

^a*Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University, Kharkiv, 62483 Ukraine*

^b*Dnipro State Agrarian and Economic University, Dnipro, 49600 Ukraine*

**e-mail: plant.biology.knau@gmail.com*

The role of nitric oxide and its functional relationships with reactive oxygen species (ROS) and calcium in the realization of stress-protective effects of polyamine putrescine on wheat seedlings during hyperthermia was studied. A 24-hour treatment of seedlings with 1 mM putrescine caused a rapid and transient increase in the NO content in roots with a maximum 1 h after its onset. Wherein, a twofold increase in the activity of diamine oxidase (DAO) and a decrease in the activity of nitrate reductase in roots by 25–30% were noted. The DAO inhibitor aminoguanidine completely eliminated the increase in the NO content caused by putrescine. Treatment of seedlings with calcium antagonists EGTA (Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N',N'-tetraacetic acid) and neomycin also eliminated the increase in DAO activity and NO content. The nitric oxide scavenger PTIO (2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide) completely neutralized the effect of increasing the content of hydrogen peroxide in roots of wheat seedlings when they were treated with putrescine. At the same time, treatment with a hydrogen peroxide antagonist dimethylthiourea only slightly reduced the effect of NO content increasing in roots caused by putrescine. Antagonists of NO, ROS, and calcium eliminated the protective effect of putrescine under heat stress, which was determined by the intensity of LPO and seedling survival. A conclusion was made about the role of nitric oxide synthesized by the oxidative pathway and its functional interaction with ROS and calcium ions in the realization of the stress-protective effect of putrescine on plant objects.

Keywords: putrescine, nitric oxide, diamine oxidase, nitrate reductase, reactive oxygen species, calcium, heat resistance, *Triticum aestivum*