

## ФІЗІОЛОГІЯ І БІОХІМІЯ РОСЛИН

УДК 581.138.1

### АКТИВНОСТЬ НАДФН-ОКСИДАЗЫ В КОРНЯХ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА ПРИ РИЗОБИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ДЕЙСТВИЯ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ ФАКТОРОВ

© 2008 г. А. К. Глянько, Г. Г. Васильева, А. А. Ищенко,  
Н. В. Миронова, Т. Е. Путилина

*Сибирский институт физиологии и биохимии растений*

*Сибирского отделения Российской академии наук*

*(Иркутск, Россия)*

Изучали активность НАДФН-оксидазы в корнях 3-х и 4-х суточных этиолированных проростков гороха (*Pisum sativum* L., сорт Аксайский усатый) в зависимости от инокуляции растений *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (штамм СИАМ 1026) и действия неблагоприятных факторов – низкой температуры (8 °С), высокой дозы минерального азотного удобрения, нитропруссид натрия. Показано, что все три экзогенных фактора увеличивали активность микросомальной НАДФН-оксидазы, особенно низкая температура. Ризобияльная инфекция снимала активирующее влияние экзогенных факторов на НАДФН-оксидазу только в случае высокой дозы азота в среде. Результаты обсуждаются в связи с ролью НАДФН-оксидазы и активных форм кислорода в бобово-ризобияльном симбиозе.

**Ключевые слова:** *Pisum sativum* L., *Rhizobium leguminosarum*, НАДФН-оксидаза, активные формы азота, бобово-ризобияльный симбиоз, низкая температура, высокая доза азота, нитропруссид натрия

НАДФН-оксидаза (КФ 1.6.99.6) – ферментный комплекс, восстанавливающий с участием НАДФН молекулярный кислород ( $O_2$ ) с образованием супероксидного анион-радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ). В фагоцитарных клетках до 90 % потребляемого клетками  $O_2$  может расходоваться на образование  $O_2^{\cdot-}$  (окислительный взрыв). Образующийся супероксидный анион-радикал может служить исходным соединением для синтеза других активированных соединений: пероксида водорода ( $H_2O_2$ ), пероксинитрита ( $ONOO^-$ ), синглетного кислорода ( $^1O_2$ ), гидроксильного радикала ( $OH^{\cdot}$ ) и пр. [12, 15].

НАДФН-оксидаза локализована в основном на плазматической мембране и ее активность усиливается при действии на организмы абиотических и биотических факторов [22, 31]. Доказано, что этот фермент играет важную роль в генерации активных форм кислорода (АФК), в регуляции защитных реакций растительных клеток [22, 27]. НАДФН-оксидаза – стартовый фермент НАДФН-оксидазной сигнальной системы [17], связывающий, по крайней мере, два звена системы: генерацию АФК и потоки кальция [13, 31].

НАДФН-оксидазный ферментный комплекс – основной генератор АФК при действии на растительные клетки патогенных бактерий или их элиситоров [30, 35]. АФК, образовавшиеся в результате активации НАДФН-оксидазы, защищают растение от патогенов путем участия в СВЧ-реакции, системной приоб-

Адрес для корреспонденции: Глянько Анатолий Константинович. Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, а/я 317, Иркутск, 664033, Россия;  
e-mail: [akglyanko@sifibr.irk.ru](mailto:akglyanko@sifibr.irk.ru)

## АКТИВНОСТЬ НАДФН-ОКСИДАЗЫ

ретенной и индуцированной устойчивости, в укреплении клеточной стенки как механического барьера на пути инфекции. В отличие от патогенного воздействия на растительный организм, роль АФК в мутуалистических взаимодействиях, в т.ч. при бобово-ризобиальном симбиозе, до конца не ясна [8]. Поскольку начальные этапы взаимодействия растений с патогенными и симбиотическими микроорганизмами имеют много общего [34], можно предположить, что изменения в активности НАДФН-оксидазы являются одним из механизмов регуляции образования АФК на начальных этапах бобово-ризобиального симбиоза. Так, накопление транскриптов НАДФН-оксидазы в корнях люцерны коррелирует с изменением содержания  $H_2O_2$  в первые часы после заражения проростков ризобиями [23]. Однако, по данным Shaw, Long [32], синтетический ризобиальный Nod-фактор уменьшал на 60% уровень  $H_2O_2$  в корнях проростков люцерны спустя 20-30 мин после обработки растений, в то время как обработка проростков патогенным элиситором увеличивала уровень пероксида водорода на 200%. По данным этих же авторов, ингибитор активности НАДФН-оксидазы дифенилен иодониум (diphenylene iodonium) снижал активность фермента, что выразилось в уменьшении уровня  $H_2O_2$  до 20% от контроля как в случае обработки проростков ризобиальным Nod-фактором, так и патогенным элиситором. На примере проростков гороха установлено, что неодинаковое изменение активности НАДФН-оксидазы в зонах корня связано с уровнем генерации АФК [2]. Этими же авторами установлено, что ризобиальная инфекция оказывает влияние на активность данного фермента в зависимости от чувствительности зон корня к восприятию клубеньковых бактерий.

Таким образом, на основании данных литературы можно предполагать об участии НАДФН-оксидазного ферментного комплекса в процессах связанных с инфекцией и нодуляцией при бобово-ризобиальном симбиозе. Однако в естественных условиях бобово-ризобиальный симбиоз подвергается влиянию различных факторов и их действие на симбиоз может быть более значительным, чем суммарный эффект обоих партнеров [6]. В число этих факторов входят, в частности, пониженная температура почвы в начале вегетации растений, а также высокие дозы азотных минеральных удобрений, вносимых в почву. Как известно, эти и многие другие неблагоприятные факторы вызывают усиление генерации растениями АФК

[8, 14, 19], что, как можно предполагать, связано с увеличением активности НАДФН-оксидазы. Однако влияние этих факторов при бобово-ризобиальном симбиозе на активность НАДФН-оксидазы практически не изучено. В уже цитируемой работе Shaw, Long [32] установлено, что предобработка корней синтетическим Nod-фактором уменьшала генерацию пероксида водорода корнями растений, вызванную действием на растения элиситора патогена. В наших экспериментах установлено, что инокуляция проростков гороха эффективным штаммом клубеньковых бактерий в 2 раза снижала накопление  $H_2O_2$  в корнях, вызванное обработкой растений экзогенной салициловой кислотой [11]. Инокуляция ризобиями также смягчала отрицательное действие на рост растений гороха экзогенным  $H_2O_2$ . Показано, что ризобиальный Nod-фактор способен супрессировать накопление у бобовых растений салициловой кислоты и АФК [18, 25].

На основании этих данных можно заключить, что ризобиальная инфекция бобовых существенным образом модифицирует обмен веществ растения-хозяина. Эти изменения, по-видимому, направлены на создание оптимальных условий для инфекции и нодуляции. В этой связи представляет интерес изучение влияния различных неблагоприятных факторов на физиологические процессы, играющие существенную роль в установлении бобово-ризобиального симбиоза. К таким процессам, по-видимому, относится и функциональная активность НАДФН-оксидазы, роль которой связана с генерацией АФК.

Цель работы – выяснить как внешние, неблагоприятные для бобово-ризобиального симбиоза, факторы влияют на активность НАДФН-оксидазного ферментного комплекса.

## МЕТОДИКА

Опыты проводили с горохом посевным (*Pisum sativum* L.) сорта Аксайский усатый. Семена перед проращиванием промывали в теплой мыльной воде и поверхностно стерилизовали 3%-ным пероксидом водорода в течение 15 мин. Семена проращивали при температуре 22°C в термостате в кюветах на влажной фильтровальной бумаге в течение двух суток. Для опытов использовали 3-х и 4-х суточные проростки. Инокуляцию корней проростков проводили суспензией клеток эффективного производственного штамма CIAM 1026 *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* (1 мл / проросток) в концентрации  $2 \cdot 10^8$  клеток/мл. Штамм получен

из ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии РАСХН, Санкт-Петербург, Россия. Инокулированные и неинокулированные (контроль) проростки помещали для дальнейшего роста в термостат либо с низкой температурой, либо с оптимальной.

$KNO_3$  в концентрации 60 мМ и нитропруссид натрия в концентрации 4 мМ вносили в растворы с инокулированными или неинокулированными проростками.

Через 1 и 2 сут после начала опыта из корней выделяли субклеточные фракции (цитозольную и микросомальную) методом дифференциального центрифугирования [33]. Для этого свежие корни (4-5 г) тщательно промывали дистиллированной водой, нарезали и гомогенизировали в предварительно охлажденной во льду ступке с 50 мМ HEPES-KOH буфером (рН 7,8), содержащим 250 мМ сахарозу и 1 мМ ЭДТА. Гомогенат фильтровали через капроновую ткань для удаления нерастертых фрагментов и центрифугировали при 600 g 15 мин для осаждения тяжелых органелл и компонентов клетки. Надосадочную жидкость центрифугировали при 42000 g в течение 20 мин для осаждения митохондрий. Полученный супернатант центрифугировали в течение 1 ч при 140000 g для разделения на цитозольную (супернатант) и микросомальную (осадок) фракции. Осадок суспендировали в буфере, использованном для гомогенизации корней.

В полученных фракциях – цитозольной и микросомальной – определяли НАДФН-оксидазную активность по методу [29]. Для этого к реакционной среде, состоящей из 0,8 мл буфера (50 мМ HEPES-KOH, рН 7,8); 0,1 мМ ЭДТА и 1 мкМ KCN, добавляли 0,2 мл растительной пробы и прединкубировали 1 мин при 30°C. Реакция инициировалась добавлением 100 мкМ НАДФН, скорость окисления которого регистрировали на спектрофотометре "Specord S-100 (Analytik Jena, Германия) по уменьшению в адсорбции при 340 нм ( $A_{340}$ ) в течение 5 мин. Для расчетов использовали коэффициент экстинкции  $6,22 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ .

Содержание белка во фракциях определяли по методу [1].

Средние арифметические значения и их стандартные ошибки вычисляли из трех независимых экспериментов, каждый из которых включал три биологические повторности. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Низкая температура.** Известно, что эффективный симбиоз может проявляться лишь в ограниченном интервале температур, а при температурах выше или ниже определенных значений, особенно в ризосфере, азотфиксация снижается или прекращается [5]. В табл. 1 представлены данные по определению активности НАДФН-оксидазы в цитозольной и микросомальной фракциях корней неинокулированных проростков гороха, выращенных при низкой температуре. Низкая температура повышала активность фермента в микросомальной фракции как у 3-х, так и 4-х дневных проростков гороха на 169 и 206 % соответственно ( $P > 0,99$ ). В цитозольной фракции, где активность НАДФН-оксидазы ниже в несколько раз, низкая температура по сравнению с оптимальной (22°C) не оказала влияния на активность фермента у 3-х суточных проростков, но достоверно увеличила её у 4-х суточных растений (на 120%).

В варианте с инокуляцией растений ризобиями при оптимальной температуре активность НАДФН-оксидазы не изменялась в микросомальной фракции, но достоверно повышалась в цитозольной фракции по сравнению с вариантом без инокуляции растений (на 121 и 147 %) (табл. 2).

При низкой температуре инокуляция достоверно не влияла на активность НАДФН-оксидазы по сравнению с вариантом без инокуляции при 8°C как в микросомальной, так и в цитозольной фракциях корней (табл. 2).

Таким образом, наибольшее влияние на фермент (независимо от инокуляции) оказала низкая температура, увеличивая его активность в микросомальной фракции в 1,5 – 2,0 раза (табл. 1). Влияние ризобий на фермент в условиях низкой температуры не прослеживается. Однако следует обратить внимание на активность цитозольной НАДФН-оксидазы при оптимальной температуре выращивания растений, когда активность фермента достоверно увеличивалась при инокуляции (табл. 2).

Хотя вклад цитозольной НАДФН-оксидазы в генерацию АФК, вероятно, гораздо меньший, чем мембранной, тем не менее активация фермента под влиянием ризобияльной инфекции представляет интерес для познания механизмов бобово-ризобияльного симбиоза, особенно на начальных этапах. В этом плане представляет также интерес отсутствие влияния

## АКТИВНОСТЬ НАДФН-ОКСИДАЗЫ

Таблица 1

**Влияние экзогенных факторов на активность НАДФН-оксидазы  
в клеточных фракциях корней неинкулированных проростков гороха**

Возраст проростков, сут	Активность фермента, мкмоль/(мин•мг белка)		% к контролю: ЦФ/МФ
	цитозольная фракция (ЦФ)	микросомальная фракция (МФ)	
Контроль (22°C)			
3	66,0 ± 3,4	315,7 ± 13,7	100 / 100
4	53,0 ± 1,3	264,4 ± 16,4	100 / 100
Низкая температура (8°C)			
3	59,6 ± 2,7	532,7 ± 45,4	90 / 169**
4	63,9 ± 2,5	546,1 ± 66,4	120* / 206**
Высокая доза минерального азота			
3	80,3 ± 4,5	484,4 ± 13,3	121 / 155**
4	82,3 ± 14,0	299,6 ± 25,0	155 / 113
Нитропруссид натрия			
3	63,2 ± 0,3	410,0 ± 0,1	96 / 130**
4	60,4 ± 5,7	337,2 ± 16,6	114 / 127*

**Примечание.** \* Различие достоверно при P > 0,95; \*\* Различие достоверно при P > 0,98, n=6.

Таблица 2

**Влияние экзогенных факторов на активность НАДФН-оксидазы  
в клеточных фракциях корней инокулированных проростков гороха**

Возраст проростков, сут	Время действия инокулянта и неблагоприятного фактора, ч	Активность фермента, мкмоль/(мин•мг белка)		% к контролю (неинкулированные растения), ЦФ/МФ
		цитозольная фракция (ЦФ)	микросомальная фракция (МФ)	
Оптимальная температура (22°C)				
3	24	80,1 ± 0,7	316,1 ± 28,7	121* / 100
4	48	78,2 ± 0,7	283,7 ± 36,9	147** / 107
Низкая температура (8°C)				
3	24	70,9 ± 5,6	465,0 ± 44,4	119 / 87
4	48	67,8 ± 4,2	580,7 ± 52,2	106 / 106
Высокая доза минерального азота				
3	24	89,2 ± 3,6	282,8 ± 28,8	111 / 58**
4	48	88,0 ± 21,2	265,8 ± 20,2	107 / 89
Нитропруссид натрия				
3	24	71,9 ± 2,7	423,7 ± 31,8	114* / 103
4	48	58,8 ± 4,5	412,6 ± 36,3	97 / 122

\* Обозначения как в табл. 1.

ризобиальной инфекции на активность НАДФН-оксидазы при низкой температуре. Возможное участие цитозольной НАДФН-оксидазы в термоустойчивости растений обсуждается в обзоре [28].

Предполагается, что активность НАДФН-оксидазы (по крайней мере при фитопатогезе) регулируется системой киназа-фосфатаза, модуляция которой зависит от связывания бактериальных элиситоров углеводной природы

(олигосахаридов, гликопептидов и др.) с растительным(и) рецептором(ами), с последующей активацией кальциевых каналов и внутриклеточным потоком  $\text{Ca}^{2+}$  [21]. Взаимосвязанная цепь химических сигналов ведет, по-видимому, к экспрессии гена НАДФН-оксидазы. Сходный механизм, вероятно, существует и при бобово-ризобийном симбиозе, когда ризобийный Nod-фактор связывается на плазматической мембране с растительным рецептором (протеинкиназой), вызывая открытие кальциевых каналов, внутриклеточный поток ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и последующие реакции, связанные с инфицированием и нодуляцией [20].

Что касается низкой температуры, то до настоящего времени температурный сенсор не идентифицирован [28]. Предполагается, что первичный эффект восприятия температуры может состоять в изменении текучести (вязкости) мембран [7]. Тем не менее, каскад реакций, последующий за восприятием сенсором низкой температуры, приводит к модификации метаболизма и, в частности, к активизации НАДФН-оксидазы. Однако, конкретный механизм активации низкой температурой НАДФН-оксидазы не известен.

Если считать, что НАДФН-оксидаза – основной источник АФК, то наши данные не согласуются с литературными данными о том, что ризобийная инфекция и Nod-фактор способны снижать содержание АФК. Так, по данным Shaw, Long [32], обработка растений люцерны синтетическим Nod-фактором снижает уровень  $\text{H}_2\text{O}_2$  в корнях на 75% в условиях обработки растений патогенным элиситором. Показано, что инокуляция ризобиями снижает уровень АФК ( $\text{O}_2^-$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) в корнях проростков гороха при воздействии низкой температуры ( $8^\circ\text{C}$ ) в течение 24 и 48 ч [3]. Более длительное воздействие низкой температуры (3-7 сут) повышало уровень АФК в корнях. Возможно, что в этих случаях уменьшение содержания АФК при ризобийной инфекции происходит не за счет снижения активности НАДФН-оксидазы, а в связи с усилением активности скавенгирующих АФК ферментов (например, супероксиддисмутазы, пероксидазы, каталазы) [3, 4].

**Высокая доза азотного удобрения.** Высокие концентрации минерального азота в почве, создаваемые внесением удобрений, ингибируют формирование бобово-ризобийного симбиоза, снижают эффективность или ведут к полному прекращению его функционирования [16]. Физиологические причины отрицательного влияния минерального азота на бобово-

ризобийный симбиоз рассмотрены в обзоре [10]. Однако влияние высоких доз минерального азотного удобрения на активность НАДФН-оксидазы в корнях инокулированных бобовых растений практически не изучено. В табл. 1 и 2 приведены полученные нами результаты.

Высокая доза  $\text{KNO}_3$  (60 мМ) увеличивала активность НАДФН-оксидазы в микросомальной фракции корней в 1,5 раза через 24 ч после обработки растений нитратом калия ( $P > 0,99$ ) (табл. 1). Через 48 ч достоверных изменений в активности фермента в микросомальной фракции не обнаружено. В цитозольной фракции наблюдалась тенденция к увеличению активности фермента на 121 и 155 %, но различия не достоверны (табл. 1).

Инокуляция растений ризобиями на фоне обработки проростков высокой дозой минерального азота уменьшала активность фермента в микросомальной фракции через 24 ч с 484,4 до 282,8 мкмоль/(мин•мг белка), то есть на 42 % ( $P > 0,99$ ) (табл. 2). Через 48 ч достоверной разницы между контролем и опытом не обнаружено. В цитозольной фракции различий в активности фермента при инокуляции на фоне  $\text{KNO}_3$  не наблюдалось.

Таким образом, высокая доза минерального азота независимо от инокуляции инициирует повышение активности НАДФН-оксидазы в микросомальной фракции клеток. Инфицирование растений ризобиями снимает стимулирующий эффект минерального азота на активность фермента, по крайней мере через 24 ч.

Обсуждая эти данные, следует отметить, что высокая доза азота, как и низкая температура, повышает активность НАДФН-оксидазы в микросомальной фракции. По-видимому, реакция фермента на эти неблагоприятные факторы является неспецифической. Однако механизмы активации НАДФН-оксидазы, вероятно, могут быть разными. В случае действия на растения  $\text{KNO}_3$  активация может идти по пути образования активных форм азота ( $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}$ ), которые влияют на сигнальные пути, экспрессирующие гены ферментов [8].

Что касается снятия инокуляцией стимулирующего эффекта высокой дозы азота на активность НАДФН-оксидазы, то такое воздействие, вероятно, каким-то образом связано с ингибированием ризобиями (скорее всего через комплекс Nod-фактор-рецептор) сигнальных путей, активируемых абиотическим стрессором ( $\text{KNO}_3$ ). Некоторую ясность в эти предположе-

## АКТИВНОСТЬ НАДФН-ОКСИДАЗЫ

ния вносят опыты с действием на растения экзогенного оксида азота.

**Нитропруссид натрия.** Нитропруссид натрия – химическое соединение, которое в биологических системах разлагается с выделением оксида азота. Это соединение часто применяют в экспериментах по изучению действия на организмы экзогенного NO. Как известно, NO легко диффундирует через мембраны и является многофункциональной сигнальной молекулой, оказывающей влияние на разные звенья метаболизма. Она является стартовым соединением NO-сигнальной системы [17], может оказывать отрицательное влияние на установление бобово-ризобияльного симбиоза [9].

В связи с этим интересно было выявить влияние NO на активность НАДФН-оксидазы у инокулированных и инокулированных растений гороха. Воздействие на проростки гороха нитропруссид натрия в концентрации 4 мМ ( $\approx$  4 мкМ NO) существенно (на 130 и 127%) повышало активность НАДФН-оксидазы в микросомальной фракции через 24 и 48 ч после инокуляции. (Разница достоверна при  $P > 0,95$  и 0,98 соответственно) (табл. 1). Инокуляция растений ризобиями, как и в варианте с низкой температурой, не оказала достоверного влияния на изменение активности фермента как в микросомальной, так и цитозольной фракциях (табл. 2).

Таким образом, все три изученных фактора – низкая температура, высокая доза азота и оксид азота, оказали активирующее влияние на активность НАДФН-оксидазы, что, по-видимому, является неблагоприятным для установления симбиоза. И только в варианте с действием высокой дозы азота, ризобияльная инфекция достоверно снимала активирующее влияние стрессового фактора на активность этого фермента в микросомальной фракции. При действии низкой температуры и нитропруссид натрия ризобияльная инфекция не оказала влияния на активированный фермент. Механизм ингибирования активности НАДФН-оксидазы в этом случае предстоит выяснить. Однако, как показали опыты с нитропруссидом натрия, этот механизм, по-видимому, не связан с оксидом азота.

Активация под влиянием стрессовых факторов НАДФН-оксидазы несомненно усиливает образование АФК и АФА, вызывающих окислительный взрыв. В случае фитопатогенеза это защитная реакция растения. При бобово-ризобияльном симбиозе – это нежелательная

для установления симбиоза реакция растительного организма. По-видимому, в ходе бобово-ризобияльного взаимодействия функционируют механизмы, позволяющие в определенных условиях смягчить негативное действие или полностью нейтрализовать вредные для симбиотического взаимодействия соединения. Так, по данным Nagata et al. [26], спустя 4 ч после инокуляции *Lotus japonicus* ризобияльным штаммом *Mesorhizobium loti* в корнях образуется NO и экспрессируется ген гемоглобина класса 1, который, по-видимому, играет роль скавенгера избыточных количеств NO. Таким образом, можно полагать, что, с одной стороны, NO, вероятно, необходим для симбиоза, но с другой стороны, может оказывать негативное влияние на формирование бобово-ризобияльного симбиоза [9]. В этом случае несимбиотический гемоглобин класса 1, вероятно, выполняет роль регулятора уровня NO в клетках. Другие данные литературы также подтверждают возможность ризобияльной инфекции изменять обмен веществ растения-хозяина с целью создания благоприятных условий для установления симбиоза [11, 18, 25, 32]. Дальнейшие исследования могут быть направлены на более детальное выяснение установленных физиологических закономерностей, связанных с влиянием ризобияльной инфекции на сигнальные пути, в которых НАДФН-оксидаза играет, вероятно, существенную роль.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бузун Г.А., Джемухадзе К.М., Милешко Л.Ф. Определение белка в растениях с помощью амидо-черного // Физиология растений. – 1982. – Т. 29, вып. 1. – С. 198-200.
2. Васильева Г.Г., Глянько А.К., Ищенко А.А. и др. Активность НАДФН-оксидазы в зонах корня проростков гороха, различающихся по чувствительности к ризобияльной инфекции // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2007. – Вип. 2 (11). – С. 34-42.
3. Васильева Г.Г., Миронова Н.В., Глянько А.К., Шепотько Л.Н. Генерация супероксидных радикалов в проростках гороха при действии низкой положительной температуры и инокуляции // Физиология и биохимия культ. растений. – 2001. – Т. 33, № 2. – С. 176-181.
4. Васильева Г.Г., Миронова Н.В., Глянько А.К. Влияние низкой положительной температуры и инокуляции клубеньковыми бактериями на содержание пероксида водорода и активность каталазы в проростках гороха // Физиология и биохимия культ. раст.- 2004. – Т. 36, № 6. – С. 534-542.

5. Воробьев В.А. Симбиотическая азотфиксация и температура. Новосибирск: Наука, 1998. – 126 с.
6. Генетика симбиотической азотфиксации с основами селекции / Ред. И.А. Тихонович, Н.А. Проворов. – СПб: Наука, 1998. – 194 с.
7. Гималов Ф.Р., Чемерис А.В., Вахитов В.А. О восприятии растением холодового сигнала // Успехи соврем. биологии. – 2004. – Т. 124, № 2. – С. 185-196.
8. Глянько А.К., Васильева А.К. Особенности действия активных форм кислорода и азота при бобово-ризобиальном симбиозе // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2007. – Вип. 3 (12). – С. 27-41.
9. Глянько А.К., Митанова Н.Б., Васильева Г.Г. Влияние оксида азота и других азотных соединений на адгезию и проникновение клубеньковых бактерий в ткани корней и рост этиолированных проростков гороха // Прикл. биохим. и микробиол. – 2008. – Т. 44, № 4. – С. 438-441.
10. Глянько А.К., Митанова Н.Б. Физиологические механизмы отрицательного влияния высоких доз минерального азота на бобово-ризобиальный симбиоз // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2008. – Вип. 2 (14). – С. 26-41.
11. Глянько А.К., Макарова Л.Е., Васильева Г.Г., Миронова Н.В. Возможное участие перекиси водорода и салициловой кислоты в бобово-ризобиальном симбиозе // Известия РАН. Сер. биол. – 2005. – Т. 32, № 3. – С. 300-305.
12. Клюбин И.В., Гамалей И.А. НАДФН-оксидаза – специализированный ферментный комплекс для образования метаболитов кислорода // Цитология. – 1997. – Т. 39, № 4/5. – С. 320-340.
13. Колупаев Ю.Е. Кальций и стрессовые реакции растений // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2007. – Вип.1 (10). – С. 24-41.
14. Лукаткин А.С. Вклад окислительного стресса в развитие холодового повреждения в листьях теплолюбивых растений // Физиология растений. – 2002. – Т. 49, № 5. – С. 697-702.
15. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К. Свойства и функции НАДФН-оксидаз клеток млекопитающих // Успехи соврем. биологии. – 2006. – Т. 126, № 1. – С. 97-112.
16. Мишустин Е.Н., Шильникова В.К. Клубеньковые бактерии и инокуляционный процесс. М.: Наука, 1973. – С. 143-145.
17. Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. – М.: Наука, 2002. – 294 с.
18. Bueno P., Soto M.J., Rodriguez-Rosales M.P. et al. Time course of lipoxygenase, antioxidant enzyme activities and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation during the early stages of *Rhizobium*-legume symbiosis // New Phytol. – 2001. – V. 152, Is. 1. – P. 91-96.
19. Doullis A.G., Donahue J.L., Alscer R.G. Differential response to paraquat-induced oxidative injury in a pea (*Pisum sativum* L.) protoplast system // Physiol. Plant. – 1998. – V. 102, № 3. – P. 461-471.
20. Ferguson B.J., Mathesius U. Signaling interactions during nodule development // J. Plant Growth Reg. – 2003. – V. 22, № 1. – P. 47-72.
21. Hahn M.G. Microbial elicitors and their receptors in plants // Annu. Rev. Phytopathol. – 1996. – V. 34. – P. 387-412.
22. Jiang M., Zwang J. Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in abscisic acid and water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings // Planta. – 2002. – V. 215, № 6. – P. 1022-1030.
23. Lamb C., Dixon R.A. The oxidative burst in plant disease resistance // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 1997. – V. 48. – P. 405-410.
24. Lohar D.P., Sharopova N., Endre G. et al. Transcript analysis of early nodulation events in *Medicago truncatula* // Plant Physiol. – 2006. – V. 140, № 1. – P. 221-234.
25. Martinez-Abarca F., Herrera-Cervera J.A., Bueno P. et al. Involvement of salicylic acid in the establishment of the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis // Mol. Plant-Microbe Interact. – 1998. – V. 11, № 2. – P. 153-155.
26. Nagata M., Murakami Ei-ichi, Shimoda Y. et al. Expression of a class 1 hemoglobin gene and production of nitric oxide in response to symbiotic and pathogenic bacteria in *Lotus japonicus* // Mol. Plant-Microbe Interact. – 2008. – V. 21, № 9. – P. 1175-1183.
27. Orozco-Cardenas M.I., Narvaez-Vasquez J., Ryan C.A. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate // Plant Cell. – 2001. – V. 13, № 2. – P. 179-191.
28. Penfield S. Temperature perception and signal transduction in plants // New Phytol. – 2008. – V. 179, № 3. – P. 615-628.
29. Pinton R., Cakmak I., Marschner H. Zinc deficiency enhanced NADPH-dependent superoxide radical production in plasma membrane vesicles isolated from roots of bean plants // J. Exp. Bot. – 1994. – V. 45, № 270. – P. 45-50.

## АКТИВНОСТЬ НАДФН-ОКСИДАЗЫ

30. Sagi M., Fluhr R. Superoxide production by plant homologues of the gp91phos NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and tobacco mosaic virus infection // Plant Physiol. – 2001. – V. 126, № 3. – P. 1281-1290.
31. Sagi M., Fluhr R. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases // Plant Physiol. – 2006. – V. 141, № 2. – P. 336-340.
32. 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.
33. Shen W., Nada K., Tachibana S. Involvement of polyamines in the chilling tolerance of cucumber cultivars // Plant Physiol. – 2000. – V. 124, № 1. – P. 431-439.
34. Soto M.J., Sanjuan J., Olivares J. Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons // Microbiology. – 2006. – V. 152, Pt 11. – P. 3167-3174.
35. Xing T., Higgins V.J., Blumwald E. Race-specific elicitors of *Cladosporium Fulvum* promote translocation of cytosolic components of NADPH oxidase to the plasma membrane of tomato cells // Plant Cell. – 1997. – V. 9, № 2. – P. 249-259.

Поступила в редакцию  
05.09.2008 г.

## NADPH-OXIDASE ACTIVITY IN ROOTS OF PEA SEEDLINGS AT RHIZOBIAL INFECTION DEPENDING ON ACTION OF UNFAVOURABLE FACTORS

A. K. Glyan'ko, G. G. Vasil'eva, O. O. Ischenko,  
N. V. Mironova, T. E. Putilina

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

NADPH-oxidase activity in roots of 3- and 4-days old etiolated seedlings of pea (*Pisum sativum* L.) cultivar Aksayskiy moustached depending on inoculation of plants by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* (strain CIAM 1026) and action of unfavourable factors (low temperature, a high doze of nitric fertilizer, nitroprusside sodium) were studied. It has been established that all three exogenous factors increase activity NADPH oxidase from microsomal fraction, especially the low temperature. Rhizobial infection removes stimulate exogenous factors on NADPH oxidase activity only in case of a high doze of nitrogen in the environment. Results are discussed in connection with role NADPH-oxidase and reactive oxygen species in legume-rhizobial symbiosis.

**Key words:** *Pisum sativum* L., *Rhizobium leguminosarum*, NADPH-oxidase, legume-rhizobial symbiosis, reactive oxygen species, low temperature, high doze of nitric fertilizer, nitroprusside sodium

## АКТИВНІСТЬ НАДФН-ОКСИДАЗИ В КОРЕНЯХ ПРОРОСТКІВ ГОРОХУ ПРИ РИЗОБІАЛЬНІЙ ІНФЕКЦІЇ ЗАЛЕЖНО ВІД ДІЇ НЕСПРИЯТЛИВИХ ЧИННИКІВ

А.К. Глянько, Г.Г. Васильєва, О.О. Іщенко,  
Н.В. Миронова, Т.Є. Путиліна

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

Вивчали активність НАДФН-оксидази в коренях 3- і 4-добових етіолованих проростків гороху (*Pisum sativum* L., сорт Аксайський вусатий) залежно від інокуляції рослин *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* (штам CIAM 1026) і дії несприятливих чинників – низької температури (8°C), високої дози мінерального азотного добрива, нітропрусиду натрію. Показано, що всі три екзогенні чинники збільшували активність мікросомальної НАДФН-оксидази, особ-



**ГЛЯНЬКО и др.**

ливо низька температура. Ризобіальна інфекція знімала активуючий вплив екзогенних факторів на НАДФН-оксидазу лише у разі високої дози азоту в середовищі. Результати обговорюються у зв'язку з роллю НАДФН-оксидази і активних форм кисню в бобово-ризобіальному симбіозі.

**Ключові слова:** *Pisum sativum L., Rhizobium leguminosarum, НАДФН-оксидаза, активні форми азоту, бобово-ризобіальний симбіоз, низька температура, висока доза азоту, нітропрурид натрію*