

## ФІЗІОЛОГІЯ І БІОХІМІЯ РОСЛИН

УДК 581.138.1

### ВЛИЯНИЕ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ НА АКТИВНОСТЬ НАДФН-ОКСИДАЗЫ В КОРНЯХ ЭТИОЛИРОВАННЫХ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА (*PISUM SATIVUM* L.)

© 2012 г. А. К. Глянько, А. А. Ищенко, Г. Г. Васильева

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки*

*Сибирский институт физиологии и биохимии растений*

*Сибирского отделения Российской академии наук*

*(Иркутск, Россия)*

Изучали влияние ионов кальция на активность НАДФН-оксидазы в микросомальной фракции корней этиолированных проростков гороха. Показаны флуктуации активности фермента на среде с экзогенным источником  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{CaCl}_2$ , 100 мкМ), проявляющиеся в ее повышении (через 5 и 20 мин) и снижении (через 10 и 30 мин). Хелатор кальция (ЭГТА, 100 мкМ) способствовал снижению активности фермента на фоне экзогенного кальция. Ризобияльная инокуляция в 3,9 раза увеличивала активность фермента через 5 мин по сравнению с контролем (без инокуляции). Активатор  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов амиодарон (300 мкМ) и блокатор  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов хлорид лантана (400 мкМ) снижали активность фермента на фоне ризобияльной инокуляции до уровня контроля (без инокуляции). Сделан вывод об участии  $\text{Ca}^{2+}$  в регуляции активности мембранной НАДФН-оксидазы в корнях проростков гороха.

**Ключевые слова:** *Pisum sativum* L., ионы кальция, НАДФН-оксидаза, ризобияльная инокуляция, хелатор ионов  $\text{Ca}^{2+}$  ЭГТА, активатор  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов амиодарон, блокатор  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов хлорид лантана

В настоящее время кальций ( $\text{Ca}^{2+}$ ) рассматривается как вездесущий регулятор обменных процессов и изменение его уровня в клетке служит триггером для многих физиологических ответов организма. Ему свойственен широкий спектр физиолого-биохимических функций в растениях: участие в регуляции ионных потоков и биоэлектрических явлений, проницаемости мембран, активности ферментов, секреции, деления клеток, трансдукции гормональных сигналов, запрограммированной клеточной смерти, устойчивости к стрессовым воздействиям и др. (Медведев, 2005; Колупаев, 2007). Кратковременное повышение концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме – одна из самых ран-

них реакций клетки на различные стрессовые воздействия, которое затем сменяется колебаниями его уровня в цитоплазме, что проявляется в виде осцилляций (спайков – calcium spiking) и распространяющихся по клетке  $\text{Ca}^{2+}$ -волн. Эти процессы осуществляются за счет мембранного транспорта, активации вторичных посредников ( $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаз, киназ, белков-сенсоров) и других биохимических реакций (Медведев, 2010). Особую роль в этом выполняют кальмодулин и протеинкиназы, зависящие от кальция и осуществляющие фосфорилирование белков – факторов регуляции транскрипции (Тарчевский, 2002).

Кроме ионов  $\text{Ca}^{2+}$  сигнальную роль в организмах играют активные формы кислорода (АФК) и азота (АФА) – такие как супероксидный анион-радикал ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), пероксид водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), оксид азота (NO).  $\text{Ca}^{2+}$  как вторичный мессенджер связан в растениях с АФК и АФА в

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

сигнальном трансдукционном пути (Sama et al., 2004). Показано, что АФК активируют  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы, которые являются сигнальным механизмом, ведущим к полярному росту корневого волоска (Mori, Schroeder, 2004). Участие  $\text{Ca}^{2+}$  и АФК в сигналинге растений подтверждается и другими исследованиями (Foreman et al., 2003; Kwak et al., 2003; Колупаев, Карпец, 2010).

Одним из важных источников генерации АФК в растениях является НАДФН-оксидазная ферментная система, локализованная на плазматической мембране клетки. Ингибирование активности НАДФН-оксидазы ведет не только к уменьшению генерации АФК, но и к торможению образования инфекционных нитей при симбиотических взаимоотношениях люцерны и *Sinorhizobium meliloti* (Peleg-Grossman et al., 2007; Cardenas et al., 2008). В связи с этим следует отметить, что усиление  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала происходит в том числе и за счет его взаимодействия с различными белками, которые после этого способны осуществлять ионный транспорт, регуляторные и другие функции, поддерживать определенный уровень кальция в структурах и органеллах клетки.

Одним из таких белков является фермент НАДФН-оксидаза (КФ 1.6.3.1), который связывает, по крайней мере, два звена в метаболизме растения: генерацию АФК и потоки  $\text{Ca}^{2+}$  (Sagi, Fluhr, 2006). Предполагается, что АФК и  $\text{Ca}^{2+}$  являются основными сигнальными элементами механизма регуляции активности мембранной НАДФН-оксидазы у растений (Глянько и др., 2009). Растительная НАДФН-оксидаза, локализованная на плазмалемме клеток корня, активируется при действии на растение абиотических и биотических стрессоров (Глянько и др., 2010). Образовавшиеся в результате активации этого фермента АФК защищают растение от патогенов путем участия в реакции сверхчувствительности клеток, системной приобретенной и индуцированной устойчивости, в укреплении клеточной стенки как механического барьера на пути инфекции (Sagi, Fluhr, 2001). Роль АФК при симбиотических взаимоотношениях организмов неоднозначна, что, по-видимому, связано с функционированием защитно-регуляторных механизмов при формировании бобово-ризобияльного симбиоза (Глянько и др., 2007). Как отмечают Marino et al. (2012), НАДФН-оксидаза может быть ключевым компонентом в молекулярных механизмах регуляции симбиотических и патогенных взаимоотношений.

Нерешенным вопросом является познание механизма регуляции функциональной активности НАДФН-оксидазы растений. Как уже отмечалось, важную роль в этом может играть  $\text{Ca}^{2+}$  (Sagi, Fluhr, 2006). Этим растительная НАДФН-оксидаза отличается от животной, так как содержит на цитозольном N-терминальном участке  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающие мотивы (EF-рука) (Глянько и др., 2009). Это обеспечивает непосредственное стимулирование активности фермента с помощью ионов кальция, выход которых из внеклеточного пространства в цитоплазму инициируется экзо- и эндогенными факторами.

В настоящей работе предпринята попытка выявить регулируемую роль ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в функциональной активности НАДФН-оксидазы и определить влияние биотического фактора (ризобияльной инокуляции) на этот процесс. В работе применяли экзогенный кальций в виде  $\text{CaCl}_2$ , а интенсивность потока в клетках эндогенного  $\text{Ca}^{2+}$  изменяли путем действия на проростки гороха активатора и блокатора  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, а также хелатора кальция.

## **МЕТОДИКА**

Объектом исследований служили проростки гороха посевного (*Pisum sativum* L.), сорт Ямальский, выращенные в пластмассовых кюветах на влажной фильтровальной бумаге при 22°C. Для поддержания заданной температуры использовали электрический термостат с водяной рубашкой ЗЦ-1125М (Россия), с точностью до  $\pm 0,5^\circ\text{C}$ . Перед замачиванием семена трижды промывали теплой проточной водой с мылом и обеззараживали 3% раствором  $\text{H}_2\text{O}_2$  в течение 15 мин. После этого семена заливали дистиллированной водой (60°C) и помещали в термостат для набухания при 22°C на 3-4 ч. Затем семена перекладывали в кювету на влажную фильтровальную бумагу и проращивали при 22°C в течение 48 ч. Полученные таким образом исходные проростки использовали для дальнейших исследований, для чего выбирали проростки с примерно одинаковыми размерами корней. Контролем служили растения, выращенные на дистиллированной воде.

Для опытов использовали 48-часовые растения, которые инкубировали на соответствующих средах в течение 5, 10, 20 и 30 мин. В опытах с действием на проростки гороха биотического фактора – ризобияльной инфекции, проростки инокулировали клубеньковыми бактериями *Rhizobium leguminosarum* bv *viceae*

## ВЛИЯНИЕ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ

эффективного производственного штамма 1060 в концентрации  $2 \cdot 10^8$  клеток /мл (1 мл/проросток). Штамм получен из Всероссийского НИИ сельскохозяйственной микробиологии РАСХН (Санкт-Петербург, Россия). В качестве экзогенного источника  $\text{Ca}^{2+}$  использовали 100 мкМ раствор  $\text{CaCl}_2$  (Россия). Активатор кальциевых каналов амиодарон (Sigma-Aldrich, США) применяли в концентрации 300 мкМ, а блокатор кальциевых каналов хлорид лантана (Россия) – в концентрации 400 мкМ. В качестве поглотителя (хелатора) ионов кальция применяли ЭГТА (Sigma-Aldrich, США) (100 мкМ).

Активность НАДФН-оксидазы определяли по модифицированному методу, основанному на работах (Pinton et al., 1994; Shen et al., 2000; Cuevas et al., 2004). Выделение микросомальной клеточной фракции осуществляли путем дифференциального центрифугирования на препаративной центрифуге “SORVALL® DISCOVERY™ 90SE by HITACHI” (Япония-США). Для этого корни отмывали в дистиллированной воде, взвешивали и гомогенизировали в предварительно охлажденной ступке в буферном растворе (50 мМ HEPES-KOH, pH 7,8), содержащем сахарозу (250 мМ) и ЭДТА (0,1 мМ) (Cuevas et al., 2004). Для измерения pH растворов использовали иономер универсальный ЭВ-74 (Россия) с точностью до  $\pm 0,1$  ед. pH.

Перед началом центрифугирования гомогенат фильтровали через капроновую ткань и центрифугировали при 600 g в течение 15 мин для осаждения тяжелых органелл и компонентов клетки. Надосадочную жидкость переносили в пробирки и центрифугировали при 42000 g в течение 20 мин для осаждения митохондрий. Полученный супернатант вновь центрифугировали при 140000 g в течение 1 ч. После этого супернатант (цитозольную фракцию) отделяли, а осадок (микросомальную фракцию, включающую в себя плазмалемму, тонопласт, мембраны аппарата Гольджи и эндоплазматический ретикулум) суспендировали в том же буфере, который использовали для гомогенизации корней. В полученной микросомальной фракции определяли НАДФН-оксидазную активность. Для этого к реакционной среде, состоящей из 0,8 мл буферного раствора (50 мМ HEPES-KOH, pH 7,8), 0,1 мМ ЭДТА и 1 мкМ KSCN добавляли 0,2 мл растительной пробы и предынкубировали 1 мин при 30°C. Реакцию инициировали добавлением 100 мкМ НАДФН, скорость окисления которого регистрировали на

спектрофотометре Specord S-100 (Германия) по уменьшению величины  $D_{340}$  в течение 5 мин и рассчитывали с коэффициентом экстинкции  $6,22 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ . Активность фермента выражали в нмоль НАДФН/(мин·мг белка).

Содержание белка определяли по методу с красителем амидочерным (Бузун и др., 1982).

Средние значения и их стандартные ошибки вычислены из трех независимых экспериментов, каждый из которых состоял из трех аналитических повторений. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На фоне экзогенного источника кальция ( $\text{CaCl}_2$ , 100 мкМ) наблюдались флуктуации в активности НАДФН-оксидазы (рис. 1). Так, активность фермента значительно повышалась через 5 и 20 мин (на 56 и 80% соответственно), а через 10 и 30 мин, наоборот, снижалась: в первом случае до уровня контроля, во втором – на 40% ниже контрольного уровня. Эти данные, очевидно, свидетельствуют о наличии в растительных клетках механизма, регулирующего активность НАДФН-оксидазы при изменении концентрации ионов кальция. При этом первая фаза, по-видимому, связана с притоком  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазму и вызывает активацию фермента, а вторая – обусловлена накоплением  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме и ведет к снижению активности фермента. Возможные механизмы влияния кальция на активность НАДФН-оксидазы описаны в статьях (Sagi, Fluhr, 2001; Wong et al., 2007). Так, по мнению Wong et al. (2007) основным фактором, модулирующим активность НАДФН-оксидазного ферментного комплекса, является концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме растительной клетки, регулирующей взаимодействие между субъединицами фермента – цитозольной Ras-GTPase и мембранной субъединицей  $\text{gp91}^{\text{phox}}$ , гомологичной субъединице НАДФН-оксидазы (NOX2) из животных клеток. Однако, по данным Sagi, Fluhr (2001), растительная НАДФН-оксидаза может продуцировать  $\text{O}_2^{\cdot-}$  и в отсутствие цитозольного компонента Ras-GTPase.

Можно предполагать, что увеличение образования АФК в результате активации НАДФН-оксидазы вызывает вторую фазу накопления кальция в цитоплазме путем стимулирования открытия  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов на плазматической мембране, что является причиной ингибирования активности фермента.

Присутствие в среде экзогенного  $\text{Ca}^{2+}$  при экспозиции 20 мин усиливало активность фермента на 80% по сравнению с контролем. Этот эффект элиминировался добавлением в среду с  $\text{CaCl}_2$  хелатора кальция – ЭГТА, что выразилось в снижении активности НАДФН-оксидазы до уровня контроля (рис. 2). При этом сама ЭГТА при той же экспозиции не вызывала достоверных изменений активности фермента по сравнению с контролем. Таким образом, связывание кальция хелатором ведет к снижению активности фермента, что свидетельствует о вовлечении кальция в регуляцию активности НАДФН-оксидазы корней проростков гороха. В этих вариантах действие  $\text{Ca}^{2+}$  проявляется как в увеличении, так и в снижении активности изучаемого фермента.

В следующих экспериментах изучали влияние ризобияльной инокуляции на активность НАДФН-оксидазы. Из полученных данных (рис. 3) следует, что инокуляция проростков клубеньковыми бактериями через 5 мин приводила к увеличению активности фермента в 3,9 раза по сравнению с контролем (растения без инокуляции). Возможный механизм активации фермента может быть также связан с  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостазом. По данным Shaw, Long (2003), спустя 1-5 мин после ризобияльной инокуляции наблюдался быстрый приток ионов кальция в цитоплазму. Предполагается, что цитозольные потоки кальция активируют  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые протеинкиназы, которые фосфорилируют N-терминальный участок НАДФН-оксидазы и тем самым активируют фермент

(Kobayashi et al., 2007). Влияние ризобий на  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы, по-видимому, обусловлено взаимодействием бактериального Nod-фактора (NF) и растительного рецептора (LysM RLK), что ведет к деполяризации мембраны и оттоку хлора и калия из цитоплазмы во внеклеточное пространство клеток корневого волоска и сопровождается открыванием  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов и усилением притока кальция в цитоплазму (Radutoiu et al., 2003; Ferguson et al., 2010).

Чтобы проверить предположение об активации НАДФН-оксидазы ризобияльной инокуляцией путем ее влияния на поток  $\text{Ca}^{2+}$  из внеклеточного пространства в цитоплазму, были проведены опыты с амиодароном – активатором  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в дрожжевых клетках (Courchesne, Ozturk, 2003), и неселективным блокатором  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов – хлоридом лантана (Huetter et al., 1998). Представленные на рис. 3 данные свидетельствуют о том, что амиодарон в концентрации 300 мкМ сам по себе стимулировал активность фермента на 30 % по сравнению с контролем, а в сочетании с ризобияльной инокуляцией снимал стимулирующее влияние ризобияльной инфекции на активность фермента до уровня контроля, уменьшая активность фермента в 3,4 раза. Таким образом, стимуляция активности НАДФН-оксидазы под влиянием амиодарона в испытываемой концентрации (300 мкМ) свидетельствует об участии ионов кальция в функционировании фермента. Снижение активности НАДФН-оксидазы под влиянием амиодарона на фоне ризобияльной инокуляции, возможно, связано с избыточным по-

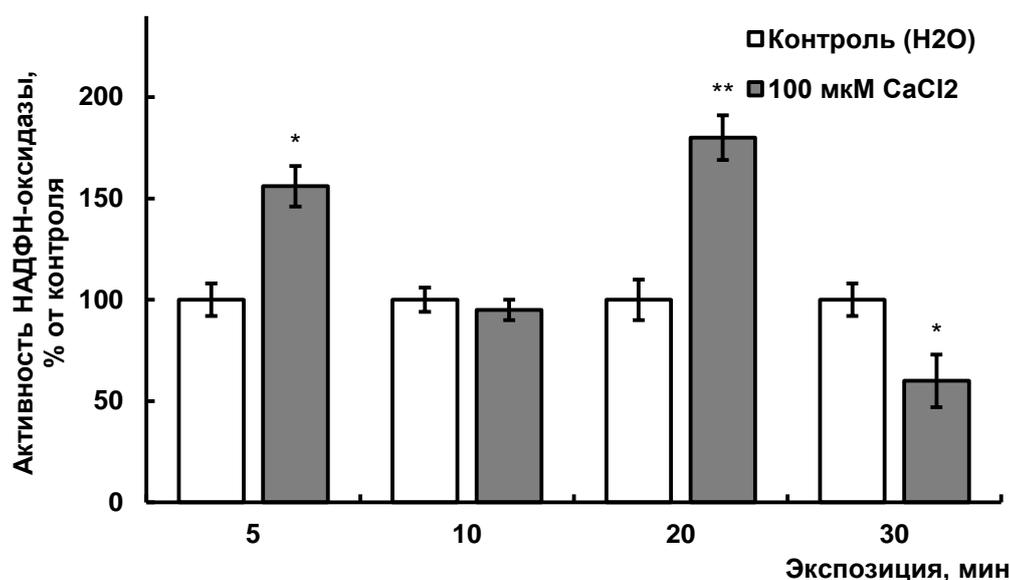


Рис. 1. Динамика активности НАДФН-оксидазы корней проростков гороха на фоне экзогенного источника  $\text{Ca}^{2+}$ . Здесь и на рис. 2: \* \*\* - соответственно различие достоверно при  $P \geq 0,95$  и  $P \geq 0,99$ .

## ВЛИЯНИЕ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ

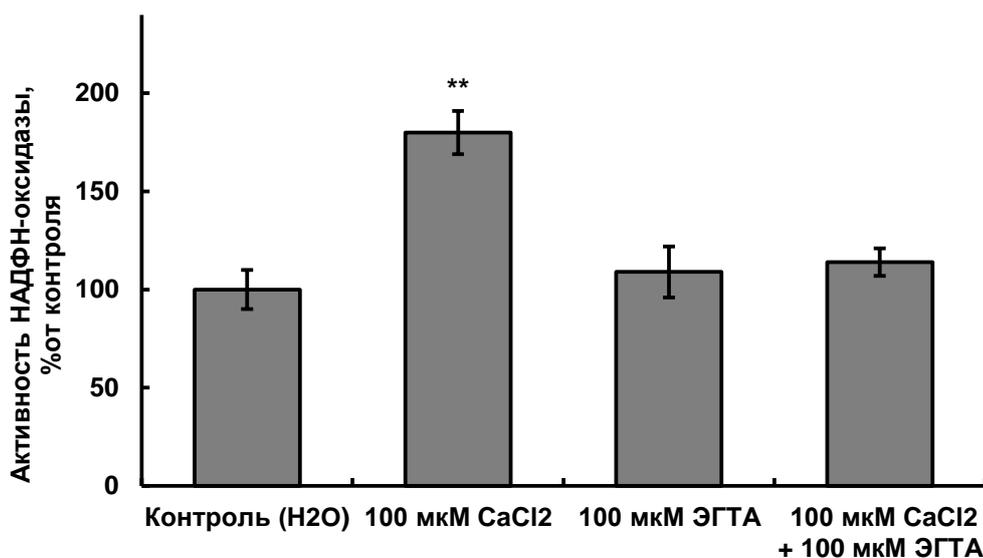


Рис. 2. Влияние хелатора кальция (ЭГТА) на активность НАДФН-оксидазы корней проростков гороха на фоне экзогенного источника кальция (CaCl<sub>2</sub>), экспозиция 20 мин.

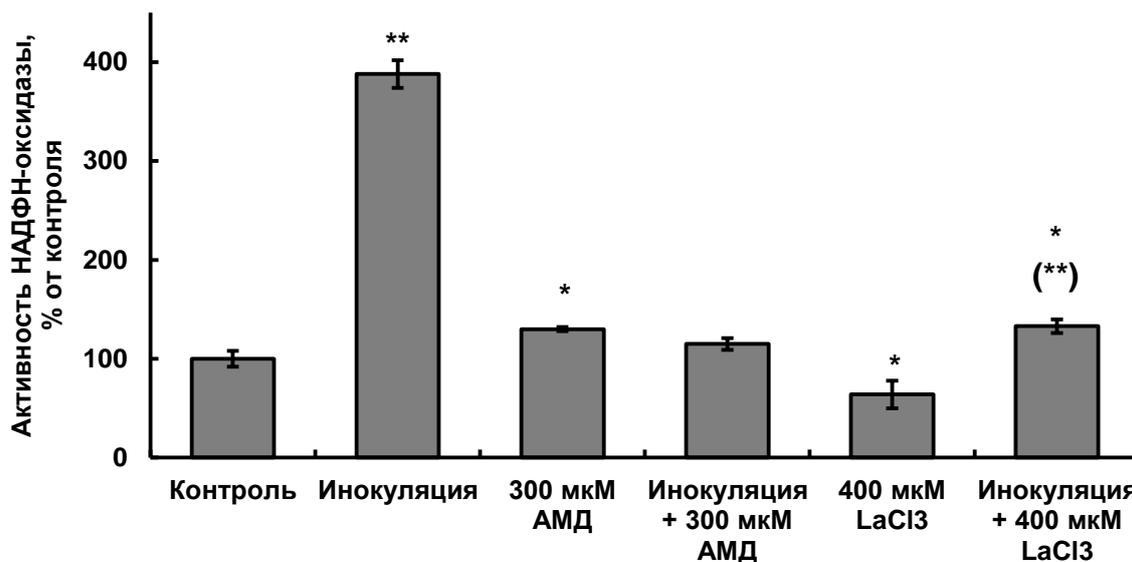


Рис. 3. Влияние ризобияльной инокуляции, амиодарона (АМД) и хлорида лантана (LaCl<sub>3</sub>) на активность НАДФН-оксидазы корней проростков гороха, экспозиция 5 мин.

\* \*\* - соответственно различие достоверно при  $P \geq 0,95$  и  $P \geq 0,99$ ; в скобках указана достоверность по сравнению с вариантом с инокуляцией.

ступлением Ca<sup>2+</sup> в цитоплазму, вызванным активирующим действием амиодарона на Ca<sup>2+</sup>-каналы.

Неселективный блокатор кальциевых каналов хлорид лантана, как и амиодарон, снимал стимулирующее влияние ризобияльной инфекции на активность фермента, что проявилось в снижении активности фермента в 2,9 раза. Однако, в отличие от эффектов амиодарона, уменьшение активности фермента в этом вари-

анте, вероятно, связано с недостаточным содержанием ионов кальция в цитоплазме для активации фермента. В варианте опыта с влиянием только одного хлорида лантана наблюдалось снижение активности НАДФН-оксидазы на 36 % по сравнению с контролем (без инокуляции).

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют об участии Ca<sup>2+</sup> в функционировании НАДФН-оксидазы – генератора АФК (O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). При этом следует отметить, что ак-

тивность изученного фермента зависит как от концентрации ионов кальция в цитоплазме, так и уровня АФК, влияющих на поток кальция через  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы на плазмалемме. В этом аспекте подтверждается предположение Sagi, Fluhr (2001) о том, что регуляция активности НАДФН-оксидазы происходит по принципу самоусиливающейся петли, в которую вовлечены  $\text{Ca}^{2+}$  и АФК.

Авторы выражают благодарность Т. Е. Путилиной, В.А. Галиченко и О.И. Грабельных за техническую помощь при проведении экспериментов.

## ЛИТЕРАТУРА

- Бузун Г.А., Джемухадзе К.М., Милешко Л.Ф. Определение белка в растениях с помощью амидо черного // Физиология растений. – 1982. – Т. 29, № 1. – С. 198-200.
- Глянько А.К., Акимова Г.П., Соколова М.Г., Макарова Л.Е., Васильева Г.Г. Защитно-регуляторные механизмы при развитии бобово-ризобиального симбиоза // Прикл. биохимия и микробиология. – 2007. – Т. 43, № 3. – С. 289-297.
- Глянько А.К., Ищенко А.А., Митанова Н.Б., Васильева Г.Г. НАДФН-оксидаза растений // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2009. – Вип. 2 (17). – С. 6-18.
- Глянько А.К., Васильева Г.Г., Ищенко А.А., Митанова Н.Б., Алексеенко А.Л. Активность НАДФН-оксидазы в корнях проростков гороха при ризобиальной инфекции в зависимости от действия абиотических и биотических факторов // Прикл. биохимия и микробиология. – 2010. – Т. 46, № 4. – С. 479-485.
- Колупаев Ю.Е. Кальций и стрессовые реакции растений // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2007. – Вип. 1 (10). – С. 24-41.
- Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров. – Киев: Основа, 2010. – 350 с.
- Медведев С.С. Кальциевая сигнальная система растений // Физиология растений. – 2005. – Т. 52, № 2. – С. 283-305.
- Медведев С.С. Кальциевая сигнальная система растительной клетки. // Клеточная сигнализация / Отв. ред. А.Н. Гречкин. – Казань: ФЭН, 2010. – С. 26-36.
- Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. – М.: Наука, 2002. – 295 с.
- Cardenas L., Martinez A., Sanchez F. Fast, transient and specific intracellular ROS changes in living root hair cells responding to Nod factors (NF) // Plant J. – 2008. – V. 56, № 5. – P. 802-813.
- Courchesne W.E., Ozturk S. Amiodarone induces a caffeine-inhibited, MIDI-dependent rise in free cytoplasmic calcium in *Saccharomyces cerevisiae* // Mol. Microbiol. – 2003. – V. 47, № 1. – P. 223-234.
- Cuevas J.C., Sanchez D.H., Marina M. Do polyamines the *Lotus glaber* NADPH oxidation activity induced by the herbicide methyl viologen // Funct. Plant Biol. – 2004. – V. 31, № 9. – P. 921-928.
- Ferguson B.J., Indrasumunar A., Hayashi S., Lin Y-H., Reid D.E., Gresshoff P.M. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation // J. Integr. Plant Biol. – 2010. – V. 52, № 1. – P. 61-76.
- Foreman J., Demidchik V., Bothwell J.H., Torres M.A., Linstead P., Brownlee C., Jones J.D.G., Davies J.M., Dalan L. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth // Nature. – 2003. – V. 422, № 6930. – P. 442-446.
- Huetter J.E., Stack E., Wilding T.J. Antagonism of neuronal kainite receptors by lanthanum and gadolinum // Neuropharmacology. – 1998. – V. 37, № 10-11. – P. 1239-1247.
- Kwak J.M., Mori I.C., Pei Z.M., Leonhardt N., Torres M.A., Dangl J.L., Bloom R.E., Jones J.D.G., Schroeder J.I. NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis // EMBO J. – 2003. – V. 2, № 11. – P. 2623-2633.
- Kobayashi M., Ohura I., Kawakita K., Yokota N., Fujiwara M., Shimamoto K., Doke N., Yoshioka H. Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase // Plant Cell. – 2007. – V. 19, № 3. – P. 1065-1080.
- Marino D., Dunand C., Puppo A., Pauly N. A burst of plant NADPH oxidases // Trends Plant Sci. – 2012. – V. 17, № 1. – P. 9-15.
- Mori I.C., Schroeder J.I. Reactive oxygen species activation of plant  $\text{Ca}^{2+}$  channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction // Plant Physiol. – 2004. – V. 135, № 2. – P. 702-708.
- Peleg-Grossman S., Volpin H., Levine A. Root hair curling and Rhizobium infection in *Medicago truncatula* are mediated by phosphatidylinositol-regulated endocytosis and reactive oxygen species // J. Exp. Bot. – 2007. – V. 58, № 7. – P. 1637-1649.
- Pinton R., Cakmak I., Marschner H. Zinc deficiency enhanced NAD(P)H-dependent superoxiden radical production in plasma membrane vesicles isolated from roots of bean plants // J. Exp. Bot. – 1994. – V. 45, № 270. – P. 45-50.
- Radutoiu S., Madsen L.H., Madsen E.B., Felle H.H., Umehara Y., Gronlund M., Sato S., Nakamura Y., Tabata S., Sandal N., Stougaard J. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-

## ВЛИЯНИЕ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ

- like kinases // *Nature*. – 2003. – V. 425, № 6958. – P. 585-592.
- Sagi M., Fluhr R.* Superoxide production by plant homologues of the gp91 (phox) NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection // *Plant Physiol.* – 2001. – V. 126, № 3. – P. 1281-1290.
- Sagi M., Fluhr R.* Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidase // *Plant Physiol.* – 2006. – V. 141, № 2. – P. 336-340.
- Sama J., Baluska F., Menzel D.* New signaling molecules regulating root hair tip growth // *Trends Plant Sci.* – 2004. – V. 9, № 5. – P. 217-220.
- Shaw S.L., Long S.R.* Nod factor inhibition of reactive oxygen efflux in host legume // *Plant Physiol.* – 2003. – V. 131, № 3. – P. 976-984.
- 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.
- Wong H.L., Pinontoan R., Hayashi K., Tabata R., Yaeno T., Hasegawa K., Kojima C., Yoshioka H., Iba K., Kawasaki T., Shimamoto K.* Regulation of rice NADPH oxidase by binding of Rac GTPase to its N-terminal extension // *Plant Cell.* – 2007. – V. 19, № 12. – P. 4022-4034.

Поступила в редакцию  
27.04.2012 г.

## INFLUENCE IONS OF CALCIUM ON ACTIVITY NADPH OXIDASE IN ROOTS ETIOLATED SEEDLINGS OF PEA (*PISUM SATIVUM L.*)

A. K. Glyan'ko, O. O. Ischenko, G. G. Vasil'eva

*State Federal Budget Institution of Science  
Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry  
Siberian Division of the Russian Academy Sciences  
(Irkutsk, Russia)*

Influence ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) on activity NADPH oxidase in microsomal fraction of roots etiolated seedlings of pea are investigated. Fluctuations in activity of enzyme on environment with exogenous a source  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{CaCl}_2$ , 100  $\mu\text{M}$ ), consisting in increase (through 5 and 20 minute) and decrease (through 10 and 30 minute) are shown. Chelating agent of  $\text{Ca}^{2+}$  (EGTA, 100  $\mu\text{M}$ ) promoted decrease of activity of enzyme on a background exogenous calcium. Rhizobial inoculation in 3,9 time increased activity of enzyme through 5 minute in comparison with the control (without inoculation). The  $\text{Ca}^{2+}$ -channels activator – amiodarone (300  $\mu\text{M}$ ), and  $\text{Ca}^{2+}$ -channels blocker – lanthanum chloride (400  $\mu\text{M}$ ), reduced activity of enzyme on a background rhizobial inoculation up to a level of the control (without inoculation). The conclusion about participation of  $\text{Ca}^{2+}$  in regulation of activity membranes NADPH oxidase in roots of seedlings of peas are made.

**Key words:** *Pisum sativum L.*, ions  $\text{Ca}^{2+}$ , NADPH oxidase, rhizobial inoculation, EGTA, amiodarone, lanthanum chloride

## ВПЛИВ ІОНІВ КАЛЬЦІЮ НА АКТИВНІСТЬ НАДФН-ОКСИДАЗИ В КОРЕНЯХ ЕТІОЛЬОВАНИХ ПРОРОСТКІВ ГОРОХУ (*PISUM SATIVUM L.*)

A. K. Глянько, О. О. Іщенко, Г. Г. Васильєва

*Федеральна державна бюджетна установа науки  
Сибірський інститут фізіології і біохімії рослин  
Сибірського відділення Російської академії наук  
(Іркутськ, Росія)*

Вивчали вплив іонів кальцію на активність НАДФН-оксидази в мікросомальній фракції коріння етіюльованих проростків гороху. Показані флуктуації активності ферменту на середовищі з екзогенним джерелом  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{CaCl}_2$ , 100 мкМ), що виявлялися в її підвищенні (через 5 і 20 хв) та зниженні (через 10 і 30 хв). Хелатор кальцію (ЕГТА, 100 мкМ) сприяв зниженню ак-

## **ГЛЯНЬКО, ИЩЕНКО, ВАСИЛЬЄВА**

тивності ферменту на фоні екзогенного кальцію. Ризобіальна інокуляція в 3,9 раза збільшувала активність ферменту через 5 хв порівняно з контролем (без інокуляції). Активатор  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів амідарон (300 мкМ) і блокатор  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів хлорид лантану (400 мкМ) знижували активність ферменту на фоні ризобіальної інокуляції до рівня контролю (без інокуляції). Зроблено висновок про участь  $\text{Ca}^{2+}$  в регуляції активності мембранної НАДФН-оксидази в коренях проростків гороху.

**Ключові слова:** *Pisum sativum L.*, іони кальцію, НАДФН-оксидаза, ризобіальна інокуляція, хелатор іонів  $\text{Ca}^{2+}$  ЕГТА, активатор  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів амідарон, блокатор  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів хлорид лантану