

УДК 581.1.036.2:577.15

ВЛИЯНИЕ АНТАГОНИСТОВ КАЛЬЦИЯ НА ГЕНЕРАЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И РАЗВИТИЕ ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТИ КОЛЕОПТИЛЕЙ ПШЕНИЦЫ, ИНДУЦИРУЕМЫЕ ДОНОРОМ NO

Ю.В. КАРПЕЦ, Ю.Е. КОЛУПАЕВ, А.И. ОБОЗНЫЙ, Т.О. ЯСТРЕБ

*Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева
62483 Харьков, п/о «Коммунист-1»
e-mail: plant_biology@mail.ru*

Исследовали влияние донора оксида азота (NO) нитропруссид натрия (НПН) и его комбинаций с антагонистами кальция на генерацию супероксидных анион-радикалов ($O_2^{\bullet-}$) колеоптилями пшеницы и их устойчивость к повреждающему прогреву. Под влиянием обработки НПН в колеоптилях увеличивалось содержание эндогенного NO. Обработка донором оксида азота усиливала генерацию $O_2^{\bullet-}$ поверхностью колеоптилей. Этот эффект частично угнетался хелатором внешнего кальция ЭГТА, ингибитором фосфатидилинозитолспецифичной фосфолипазы С неомицином и ингибитором АДФ-рибозилциклазы никотинамидом. Указанные соединения в той или иной степени нивелировали эффект повышения теплоустойчивости колеоптилей пшеницы, индуцируемый обработкой НПН. Сделано заключение о роли кальция, поступающего в цитозоль из внешних и внутриклеточных компартментов, в вызываемом донором NO усилении генерации активных форм кислорода (АФК) колеоптилями пшеницы и индуцировании их теплоустойчивости.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., оксид азота, активные формы кислорода, НАДФН-оксидаза, кальций, блокаторы кальциевых каналов, теплоустойчивость.

Оксид азота (NO) в настоящее время считается важным компонентом сигнальной сети клеток растений и животных [16]. За последние полтора десятилетия получены сведения о его участии в регуляции клеточного цикла [21], передаче гормональных сигналов в растительных клетках [14, 20], формировании симбиотических отношений бобовых с ризобиями [1], развитии реакций растений на заражение патогенами [16]. Накапливаются сведения о роли оксида азота в адаптации растений к действию абиотических стрессоров [9, 19].

Установлено, что физиологические эффекты NO в растительных клетках реализуются в тесной связи с другими сигнальными посредниками, в частности, с ионами кальция и АФК. Так, в культуре тканей корней женьшеня донор оксида азота вызывал активацию НАДФН-оксидазы и усиление генерации супероксидного анион-радикала ($O_2^{\bullet-}$) [20]. Под влиянием донора NO нитропруссид натрия усиливалась генерация $O_2^{\bullet-}$ клетками колеоптилей пшеницы, зависящая от НАДФН-оксидазы [3]. При обработке НПН также повышалось содержание пероксида водорода в корнях пшеницы [2]. Антиоксиданты и ингибитор НАДФН-оксидазы имидазол препятствовали как индуцируемому доно-

© Ю.В. КАРПЕЦ, Ю.Е. КОЛУПАЕВ, А.И. ОБОЗНЫЙ, Т.О. ЯСТРЕБ, 2015

ром NO усилению генерации АФК, так и развитию теплоустойчивости растительных объектов, что свидетельствует об участии АФК как сигнальных посредников в реализации физиологических эффектов экзогенного оксида азота [2, 3].

Известно, что под влиянием экзогенного NO в растительных клетках происходит транзиторное повышение концентрации цитозольного кальция. Предполагается, что в таком эффекте могут быть задействованы разные пулы кальция и различные типы кальциевых каналов, поскольку он подавлялся в той или иной степени обработкой растительных клеток хелатором внешнего кальция ЭГТА, блокаторами кальциевых каналов, чувствительных к инозитол-1,4,5-фосфату (ИФ₃), и кальциевых каналов, регулируемых цАДФ-рибозой [10].

НАДФН-оксидаза, которая рассматривается как один из основных генераторов сигнальных АФК клеточной поверхностью, относится к кальцийзависимым ферментам [5]. В настоящее время получены экспериментальные данные, свидетельствующие о существовании как минимум двух механизмов кальцийзависимой активации НАДФН-оксидазы. Один из них связан с влиянием кальция на протеинкиназу, активирующую НАДФН-оксидазу [22], другой — с прямым взаимодействием Ca²⁺ с каталитической субъединицей этого фермента [18].

Ранее на модели, чувствительной к действию донора оксида азота — отрезках колеоптилей пшеницы — было показано снятие вызываемого НПН усиления генерации АФК предварительной обработкой растительного материала неспецифическим блокатором кальциевых каналов разных типов хлоридом лантана [3]. В то же время неясно, из каких именно компартментов поступает кальций, задействованный в NO-индуцированном усилении генерации АФК колеоптилями пшеницы. Также неизвестно, имеют ли отношение различные пулы внутриклеточного кальция к выявленному ранее индуцированию теплоустойчивости растительных клеток донором NO. Следует отметить, что в литературе есть указания, что далеко не все зарегистрированные физиологические эффекты экзогенного оксида азота реализуются с участием кальция [8]. Так, индуцированные действием НПН деполяризация мембран клеток табака и активация 42 кД протеинкиназы не угнетались антагонистами кальция [10].

В связи с изложенным целью работы было исследование участия кальция, поступающего в цитозоль из внешних и внутриклеточных компартментов, в вызываемом донором NO индуцировании генерации АФК клетками колеоптилей пшеницы и развитии их теплоустойчивости.

Методика

Объектом исследования были отрезки колеоптилей (базальные части), отделенные от 4-суточных этиолированных проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Элегия [3].

Колеоптили инкубировали на простерилизованном 2 %-м растворе сахарозы с добавлением пенициллина (Na-соль, 100 000 ед.) (контроль). В качестве донора NO использовали НПН в концентрациях 0,5 и 2 мМ. На растворах НПН колеоптили инкубировали в течение 24 ч. Один из вариантов опыта включал обработку колеоптилей неактивным структурным аналогом НПН ферроцианидом калия (ФЦК) концентрацией 0,5 мМ. В случае предобработки антагонистами кальция — ЭГТА

(50 мкМ), неомицином (40 мкМ) или никотинамидом (1 мМ) — эти соединения вносили в среду инкубации колеоптилей за 2 ч до добавления в нее НПН. Концентрации указанных соединений были выбраны на основании результатов предварительных опытов.

Содержание оксида азота в колеоптилях определяли с использованием реактива Грисса по методу, описанному авторами работы [23], с модификациями [2]. Генерацию супероксидных анион-радикалов интактными колеоптилями определяли по восстановлению нитросинего тетразолия (НСТ) по методике, подробно описанной ранее [3]. Для проверки специфичности генерации $O_2^{\bullet-}$ в специальных опытах в пробы добавляли супероксиддисмутазу (50 ед/мл), которая ингибировала генерацию супероксидных анион-радикалов не менее чем на 90 %. При этом полагали, что количество восстановленного НСТ определяется генерацией $O_2^{\bullet-}$. Супероксидпродуцирующую активность оценивали как изменение оптической плотности реакционной смеси за 1 ч инкубации в расчете на один отрезок. За 100 % принимали величину в контрольном варианте в первой временной точке наблюдений.

После инкубации колеоптилей на растворах исследуемых соединений часть отрезков каждого варианта подвергали потенциально летальному прогреву в водяном ультратермостате в марлевых мешочках путем погружения в стаканы со стерильной дистиллированной водой на 10 мин при температуре $43 \pm 0,1$ °С. Затем отрезки помещали в чашки Петри с простерилизованным 2 %-м раствором сахарозы с добавлением пенициллина. Через 3 сут после прогрева оценивали их повреждения по потере тургора и появлению специфического оттенка, обусловленного инфильтрацией тканей.

Опыты проводили трижды в 3—4-кратной биологической повторности. При оценке выживаемости колеоптилей одна повторность включала не менее 30 отрезков для каждого варианта. На рисунках приведены средние величины и их стандартные погрешности. Кроме специально оговоренных случаев, обсуждены различия, достоверные при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Обработка колеоптилей пшеницы 0,5 мМ НПН в течение 24 ч привела к относительно небольшому (приблизительно на 22 %), но достоверному повышению содержания эндогенного NO в тканях отрезков (рис. 1). Эффект обработки колеоптилей НПН в более высокой концентрации (2 мМ) практически не отличался от величин, наблюдаемых при действии 0,5 мМ НПН. Следует отметить, что при определении количества NO в колеоптилях после более коротких их экспозиций на растворах НПН (2 и 4 ч) достоверного повышения его эндогенного содержания выявить не удалось.

Как было показано нами ранее, обработка колеоптилей пшеницы 0,5 мМ НПН существенно повышала их устойчивость к повреждающему прогреву и индуцировала ферментативную антиоксидантную систему [3]. При этом скавенджер оксида азота метиленовый синий устранял позитивные физиологические эффекты НПН, что дает основание связывать его действие на колеоптили с образованием NO, а не с другими возможными эффектами. В последнее время в литературе появляются сведения, согласно которым физиологические эффекты NO определяют

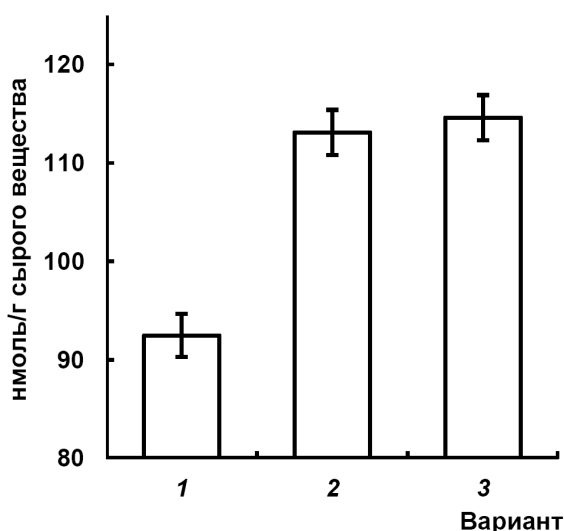


Рис. 1. Содержание оксида азота (нмоль/г сырого вещества) в coleoptилях пшеницы после 24-часовой обработки растворами нитропрусида натрия:

1 — контроль; 2, 3 — обработка НПН концентрацией соответственно 0,5 и 2 мМ

рядом систем гомеостатирования, в частности, связыванием NO с несимбиотическим гемоглобином, взаимодействием с глутатионом с образованием нитрозоглутатиона и последующим восстановлением до аммиака с участием фермента нитрозоглутатионредуктазы [17]. Также возможны неферментативное окисление NO до нитрита и нитрата, взаимодействие с супероксидным анион-радикалом и другие процессы его элиминации. Не исключено, что эти процессы препятствовали значительному накоплению NO в тканях coleoptилей при их обработке НПН. Заметим, что в экспериментах с использованием интактных корней проростков пшеницы повышение содержания NO под влиянием НПН было более существенным, чем в coleoptилях пшеницы и составляло 50—60 % [2]. По-видимому, выраженность эффектов изменения содержания NO в растительных тканях под влиянием доноров оксида азота зависит от особенностей органов растений.

Под влиянием НПН отмечалось усиление генерации супероксидного анион-радикала coleoptилями пшеницы, эффект достигал максимума через 2 ч после начала инкубации и сохранялся без существенных изменений до момента окончания наблюдений (24 ч) (рис. 2). В связи с этим в экспериментах по выяснению участия кальция в индуцированном НПН усилении генерации АФК coleoptилями пшеницы продукцию $O_2^{\cdot-}$ определяли через 2 и 24 ч после начала обработки НПН.

Ранее в экспериментах с coleoptилями пшеницы было показано, что вызываемое донором NO усиление генерации супероксидных анион-радикалов практически полностью угнеталось ингибитором НАДФН-оксидазы имидазолом, но не ингибитором пероксидазы салицилгидроксамовой кислотой [3]. Как уже отмечалось, НАДФН-оксидаза относится к ферментам, активируемым кальцием. В связи с этим мы исследовали влияние различных антагонистов кальция на стимулируемую донором

ся не столько общим содержанием в клетках, сколько локальным изменением его количества в отдельных компартментах [16]. Не исключено, что в условиях наших экспериментов повышение содержания NO в отдельных компартментах при обработке донором оксида азота было более существенным по сравнению с изменением общего содержания NO в тканях coleoptилей.

Кроме того, известно, что содержание NO как сигнальных и весьма токсичных молекул в растительных клетках поддерживает-

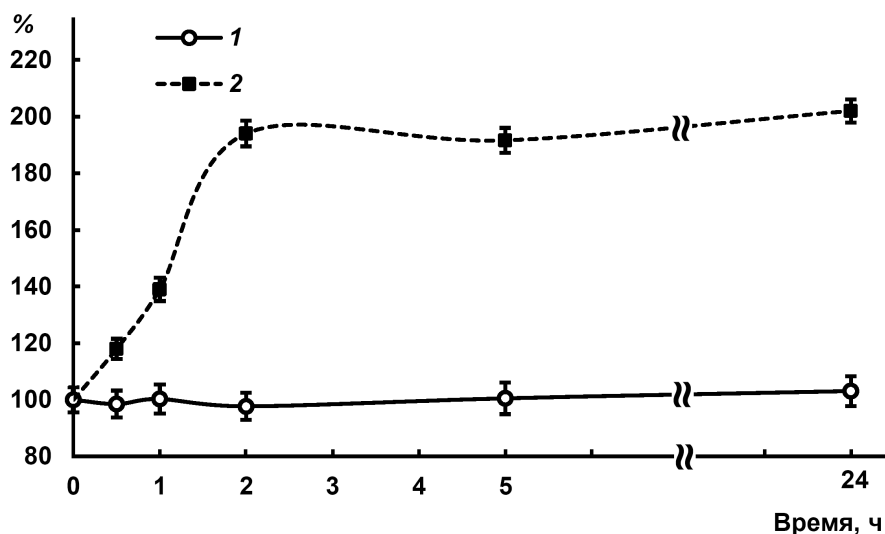


Рис. 2. Динамика генерации супероксидных анион-радикалов coleoptилями пшеницы (% исходной величины в контроле):

1 — контроль; 2 — обработка НПН концентрацией 0,5 мМ

NO генерацию супероксидных анион-радикалов поверхностью клеток coleoptилей пшеницы.

Обработка coleoptилей ЭГТА существенно не влияла на генерацию ими супероксидного анион-радикала, в то же время хелатор кальция частично устранял вызываемый донором оксида азота эффект усиления генерации супероксидных анион-радикалов (рис. 3).

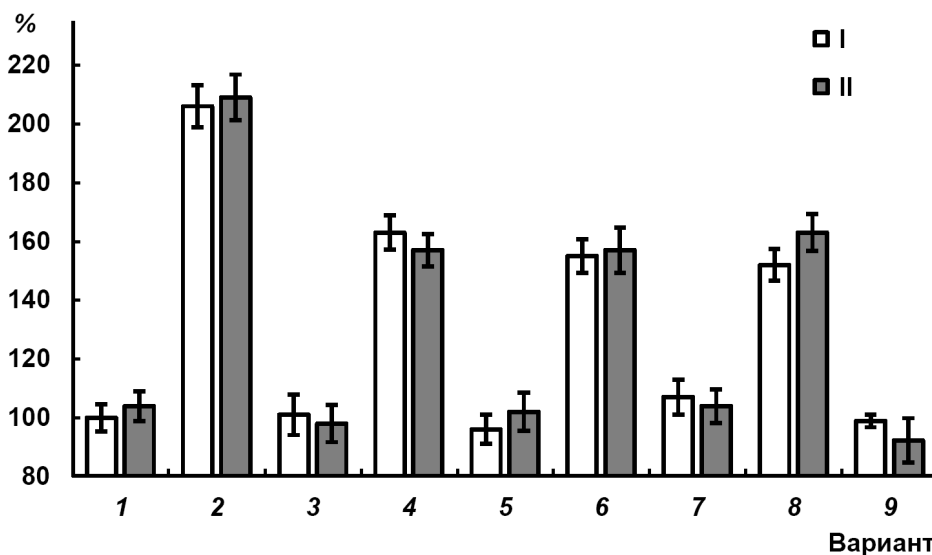


Рис. 3. Влияние нитропруссид натрия и антагонистов кальция на генерацию супероксидного анион-радикала coleoptилями пшеницы (% исходной величины в контроле). I, II — через 2 и 24 ч после начала обработки НПН или ФЦК либо через 4 и 26 ч после начала обработки ЭГТА, неомицином или никотинамидом. Здесь и на рис. 4:

1 — контроль; 2 — НПН, 0,5 мМ; 3 — ЭГТА, 50 мкМ; 4 — НПН, 0,5 мМ + ЭГТА, 50 мкМ; 5 — неомицин, 40 мкМ; 6 — НПН, 0,5 мМ + неомицин, 40 мкМ; 7 — никотинамид, 1 мМ; 8 — НПН, 0,5 мМ + никотинамид, 1 мМ; 9 — ФЦК, 0,5 мМ

В качестве другого антагониста кальция мы использовали неомицин, который, связывая фосфатидилинозитолбифосфаты, способен угнетать фосфатидилинозитолспецифичную фосфолипазу С (ФИФЛ С) [13] и таким образом препятствовать накоплению продукта реакции ИФ₃, который влияет на поступление кальция в цитозоль из внутриклеточных компартментов и тем самым активирует многие кальцийзависимые процессы [12]. Сам по себе неомицин не оказывал существенного влияния на генерацию супероксидного анион-радикала колеоптилями пшеницы (см. рис. 3). В то же время предобработка колеоптилей этим соединением заметно угнетала усиление образования O₂^{•-}, вызываемое НПН.

Концентрация цитозольного кальция может повышаться не только в результате его поступления через кальциевые каналы, чувствительные к ИФ₃, но и с участием кальциевых каналов, регулируемых цАДФ-рибозой и локализованных преимущественно в вакуолях [6]. Для изучения их возможного вклада в индуцирование донором оксида азота образования АФК колеоптилями пшеницы использовали антагонист синтеза цАДФ-рибозы (ингибитор АДФ-рибозилциклазы) никотинамид [11]. Под его влиянием отмечалась тенденция к небольшому (недостовверному при $p \leq 0,05$) усилению генерации O^{•-} колеоптилями. При этом никотинамид в значительной степени устранял вызываемое НПН усиление генерации O₂^{•-} отрезками колеоптилей.

Действие НПН на генерацию АФК колеоптилями пшеницы, по-видимому, было специфичным и определялось прежде всего эффектами NO: используемый в качестве дополнительного контроля структурный аналог НПН ФЦК не вызывал увеличения продукции супероксидных анион-радикалов колеоптилями пшеницы (см. рис. 3). Также ФЦК, в отличие от НПН, не оказывал влияния на устойчивость колеоптилей пшеницы к повреждающему прогреву (рис. 4).

Антагонисты кальция в той или иной степени снижали положительное влияние донора NO на выживаемость колеоптилей пшеницы после повреждающего прогрева (см. рис. 4). При этом сами по себе ЭГТА, нео-

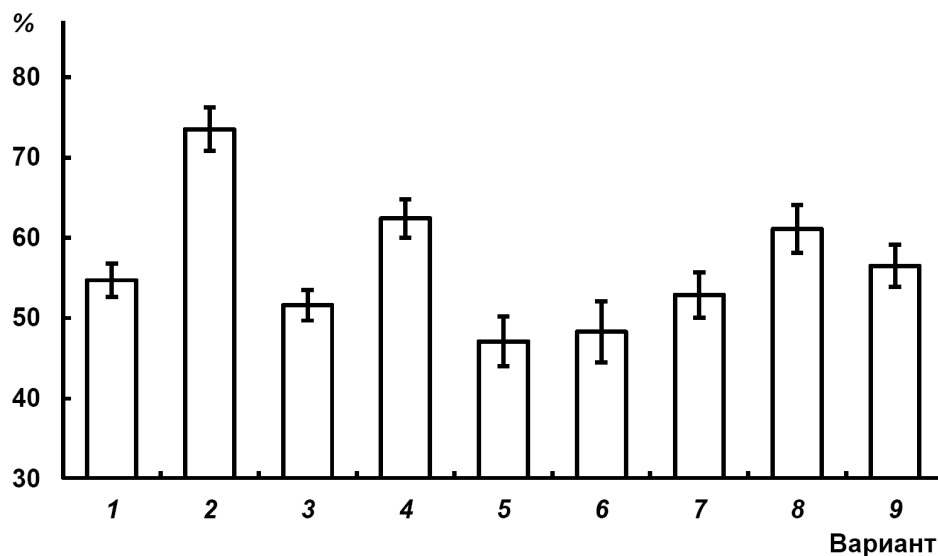


Рис. 4. Выживаемость колеоптилей пшеницы (%) после повреждающего прогрева (43 °С, 10 мин)

мицин и никотинамид не оказывали достоверного влияния на устойчивость coleoptилей к повреждающему прогреву.

Наиболее существенное нивелирующее действие на проявление эффектов NO оказывал неомицин. Это соединение ингибирует ФИФЛ С, которая катализирует образование ИФ₃ и диацилглицерола [13]. Считается, что ИФ₃ открывает определенные внутриклеточные кальциевые каналы, хотя гомологи таких каналов в растительных клетках до сих пор не выявлены [12]. Результатом действия неомицина может быть не только нарушение поступления кальция в цитозоль, но и угнетение процесса образования фосфатидной кислоты, которая синтезируется из диацилглицерола [7]. В последнее время показано, что фосфатидная кислота является одним из активаторов НАДФН-оксидазы [15]. Следует отметить, что стимулируемая экзогенным NO генерация супероксидных анион-радикалов в coleoptилях пшеницы частично угнеталась не только неомицином (см. рис. 3), но и бутанолом-1 — ингибитором фосфолипазы D, образующей фосфатидную кислоту [4]. В связи с этим участие фосфатидной кислоты в NO-стимулируемом образовании АФК coleoptилями пшеницы представляется весьма вероятным, однако требует специального экспериментального подтверждения.

Положительное влияние донора NO на теплоустойчивость coleoptилей пшеницы заметно нивелировала и обработка другими антагонистами кальция — ЭГТА и никотинамидом.

Как уже отмечалось, все исследуемые антагонисты кальция угнетали и стимулируемое донором NO усиление генерации супероксидных анион-радикалов coleoptилями (см. рис. 3). Возможно, что поступление кальция в цитозоль через внутриклеточные кальциевые каналы, регулируемые цАДФ-рибозой и (или) ИФ₃, необходимо для активации НАДФН-оксидазы. В этом процессе, вероятно, задействовано и поступление кальция из внешних компартментов, поскольку NO-стимулируемое усиление образования O₂^{•-} частично угнеталось ЭГТА (см. рис. 3).

Кальцийзависимое усиление генерации АФК, происходящее под влиянием донора NO, по-видимому, участвует в формировании сигнала, индуцирующего защитные реакции клеток coleoptилей, в частности, активацию антиоксидантной системы [3]. На участие кальция в NO-стимулируемом формировании адаптивных реакций клеток указывает устранение положительного влияния донора NO на теплоустойчивость coleoptилей различными антагонистами кальция: ЭГТА, связывающим внешний кальций; никотинамидом, ингибирующим образование цАДФ-рибозы, которая открывает соответствующие внутриклеточные кальциевые каналы; неомицином, угнетающим образование ИФ₃ и диацилглицерола. Следует отметить, что неомицин, в отличие от других исследованных антагонистов кальция, полностью устранял положительное влияние НПН на теплоустойчивость coleoptилей. Возможно, что поступление кальция в цитозоль, связанное с процессами, опосредованными ФИФЛ С, является особенно важным для реализации стресс-протекторных эффектов экзогенного NO. Как уже отмечалось, неомицин может влиять не только на кальциевый гомеостаз клеток, но и нарушать процессы липидного сигналинга. Вопрос о возможной роли его компонентов (в частности, фосфатидной кислоты [7]) в реализации физиологических эффектов NO в рамках использованной нами модели требует специальных исследований.

1. Глянько А.К., Васильева Г.Г. Активные формы кислорода и азота при бобово-ризобийном симбиозе (обзор) // Прикл. биохимия и микробиология. — 2010. — **46**, № 1. — С. 21—28.
2. Карпец Ю.В., Колунаев Ю.Е., Вайнер А.А. Функциональное взаимодействие оксида азота и пероксида водорода при формировании индуцированной теплоустойчивости проростков пшеницы // Физиология растений. — 2015. — **62**, № 1. — С. 72—78.
3. Карпец Ю.В., Колунаев Ю.Е., Ястреб Т.О. Влияние нитропруссид натрия на теплоустойчивость coleoptилей пшеницы: связь эффектов с образованием и обезвреживанием активных форм кислорода // Там же. — 2011. — **58**, № 6. — С. 883—890.
4. Карпец Ю.В., Колунаев Ю.Е., Ястреб Т.О., Дмитриев А.П. Возможные пути индуцирования теплоустойчивости растительных клеток экзогенным оксидом азота // Цитология и генетика. — 2012. — **45**, № 6. — С. 28—35.
5. Колунаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Активные формы кислорода и стрессовый сигналинг у растений // Ukr. Biochem. J. — 2014. — **86**, N 4. — P. 18—35.
6. Allen G.J., Muir S.R., Sanders D. Release of Ca^{2+} from individual plant vacuoles by both INSP(3) and cyclic ADP-ribose // Science. — 1995. — **268**. — P. 735—737.
7. Arisz S.A., Wijk R., Roels W. et al. Rapid phosphatidic acid accumulation in response to low temperature stress in *Arabidopsis* is generated through diacylglycerol kinase // Frontiers Plant Sci. — 2013. — **4**. doi: 10.3389/fpls.2013.00001.
8. Courtois C., Besson A., Dehan J. et al. Nitric oxide signalling in plants: interplays with Ca^{2+} and protein kinases // J. Exp. Bot. — 2008. — **59**. — P. 155—163.
9. Gould K.S., Lamotte O., Klinguer A. et al. Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response? // Plant Cell Environ. — 2003. — **26**. — P. 1851—1862.
10. Lamotte O., Courtois C., Dobrowolska G. et al. Mechanisms of nitric-oxide-induced increase of free cytosolic Ca^{2+} concentration in *Nicotiana plumbaginifolia* cells // Free Radical Biol. Med. — 2006. — **40**. — P. 1369—1376.
11. Leckie C.P., Mcainsh M.R., Allen G.J. et al. Abscisic acid-induced stomatal closure mediated by cyclic ADP-ribose // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1998. — **95**. — P. 15837—15842.
12. Lee Y., Lee Y. Roles of phosphoinositides in regulation of stomatal movements // Plant Signal. Behav. — 2008. — **3**. — P. 211—213.
13. Liu H.T., Huang W.D., Pan Q.H. et al. Contributions of PIP2-specific phospholipase C and free salicylic acid to heat acclimation-induced thermotolerance in pea leaves // J. Plant Physiol. — 2006. — **163**. — P. 405—416.
14. Lu D., Zhang X., Jiang J. et al. NO may functionate in pathway of H_2O_2 decrease for ABA induced stoma closure in *Vicia faba* // J. Plant Physiol. and Mol. Biol. — 2005. — **31**. — P. 62—70.
15. Marino D., Dunand C., Puppo A., Pauly N. A burst of plant NADPH oxidases // Trends Plant Sci. — 2012. — **17**. — P. 9—15.
16. Mur L.A.J., Mandon J., Persijn S. et al. Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge // AoB Plants. — 2013. — 5: pls052; doi: 10.1093/aobpla/pls052/
17. Neill S., Bright J., Desikan R. et al. Nitric oxide evolution and perception // J. Exp. Bot. — 2008. — **59**. — P. 25—35.
18. Ogasawara Y., Kaya H., Hiraoka G. et al. Synergistic activation of the *Arabidopsis* HADPH oxidase AtrbohD by Ca^{2+} and phosphorylation // J. Biol. Chem. — 2008. — **283**. — P. 8885—8892.
19. Song L., Ding W., Zhao M. et al. Nitric oxide protects against oxidative stress under heat stress in the calluses from two ecotypes of reed // Plant Sci. — 2006. — **171**. — P. 449—458.
20. Tewari R.K., Hahn E.J., Paek K.Y. Function of nitric oxide and superoxide anion in the adventitious root development and antioxidant defence in *Panax ginseng* // Plant Cell Rep. — 2008. — **27**. — P. 563—573.
21. Wilson I.D., Neill S.J., Hancock J.T. et al. Nitric oxide synthesis and signalling in plants // Plant Cell Environ. — 2008. — **31**. — P. 622—631.
22. Wong H.L., Pinontoan R., Hayashi K. et al. Regulation of rice NADPH-oxidase by Rac GTPase to its N-terminal extension // Plant Cell. — 2007. — **19**. — P. 4022—4034.
23. Zhou B., Guo Z., Xing J., Huang B. Nitric oxide is involved in abscisic acid-induced antioxidant activities in *Stylosanthes guianensis* // J. Exp. Bot. — 2005. — **56**. — P. 3223—3228.

Получено 22.04.2015

ВПЛИВ АНТАГОНІСТІВ КАЛЬЦІЮ НА ГЕНЕРУВАННЯ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ І РОЗВИТОК ТЕПЛОСТІЙКОСТІ КОЛЕОПТИЛІВ ПШЕНИЦІ, ІНДУКОВАНІ ДОНОРОМ NO

Ю.В. Карпець, Ю.Є. Колупаєв, О.І. Обозний, Т.О. Ястреб

Харківський національний аграрний університет ім. В.В. Докучаєва

Досліджували вплив донора оксиду азота (NO) нітропрусиду натрію (НПН) і його комбінацій з антагоністами кальцію на генерування супероксидного аніон-радикала ($O_2^{\bullet-}$) колеоптилями пшениці та їх стійкість до ушкоджувального прогрівання. Під впливом обробки НПН у колеоптилях збільшувався вміст ендogenous NO. Обробка донором оксиду азоту посилювала генерування $O_2^{\bullet-}$ поверхнею колеоптилів. Цей ефект частково пригнічувався хелатором зовнішнього кальцію EGTA, інгібітором фосфатидилінозитолспецифічної фосфоліпази C неоміцином та інгібітором АДФ-рибозилциклази нікотинамідом. Зазначені сполуки тією чи іншою мірою нівелювали ефект підвищення теплостійкості колеоптилів пшениці, індукований обробкою НПН. Зроблено висновок про роль кальцію, що надходить у цитозоль із зовнішніх і внутрішньоклітинних компартментів, у спричинюваних донором NO посиленні генерування активних форм кисню (АФК) колеоптилями пшениці та індукуванні їх теплостійкості.

INFLUENCE OF CALCIUM ANTAGONISTS ON GENERATION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES INDUCED BY NO DONOR AND DEVELOPMENT OF HEAT RESISTANCE OF WHEAT COLEOPTILES

Yu.V. Karpets, Yu.E. Kolupaev, O.I. Oboznyi, T.O. Yastreb

V.V. Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University
p/o «Kommunist-1», Kharkiv, 62483, Ukraine

The influence of nitric oxide (NO) donor sodium nitroprusside (SNP) and its combinations with calcium antagonists on the generation of superoxide anion-radical ($O_2^{\bullet-}$) by wheat coleoptiles and their resistance to damaging heating have been investigated. Under the treatment with SNP the content of endogenous NO in coleoptiles increased. The treatment with donor of nitric oxide intensified generation of $O_2^{\bullet-}$ by surface of coleoptiles. This effect was partially suppressed with the chelator of external calcium EGTA, inhibitor of phosphatidylinositol-specific phospholipase C neomycin and inhibitor of ADP-ribosylcyclase nicotinamide. These substances to some extent levelled the effect of increase of heat resistance of wheat coleoptiles, invoked by the treatment with SNP. The conclusion is made about the role of calcium, incoming into cytosol from external and endocellular compartments, in the intensifying of ROS generation by wheat coleoptiles caused by NO donor and in the induction of their heat resistance.

Key words: *Triticum aestivum* L., nitric oxide, reactive oxygen species, NADPH oxidase, calcium, blockers of calcium channels, heat resistance.