

АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА И СТРЕССОВЫЙ СИГНАЛИНГ У РАСТЕНИЙ

Ю. Е. КОЛУПАЕВ, Ю. В. КАРПЕЦ

Харьковский национальный аграрный университет им. В. В. Докучаева, Украина;
e-mail: plant_biology@mail.ru

В обзоре обобщены данные об основных процессах и компартментах, участвующих в образовании активных форм кислорода (АФК) в растительных клетках. Охарактеризованы особенности строения и регуляции NADPH-оксидазы как одного из основных энзиматических продуцентов АФК. В качестве возможных сенсоров редокс-сигналов в растительных клетках рассмотрены двухкомпонентные гистидинкиназы, АФК-чувствительные транскрипт-факторы, АФК-чувствительные протеинкиназы и редоксрегулируемые ионные каналы. Также обсуждается взаимодействие между АФК и другими сигнальными посредниками, в особенности оксидом азота и ионами кальция. Проанализирована роль АФК как сигнальных посредников в развитии устойчивости растений к гипертермии, осмотическому шоку и другим абиотическим стрессорам.

К л ю ч е в ы е с л о в а: активные формы кислорода, NADPH-оксидаза, сенсоры редокс-сигналов, кальций, оксид азота, абиотические стрессоры, растительные клетки.

В последние десятилетия получено немало экспериментальных данных о роли сигнальных молекул и ионов в формировании адаптивных реакций растений на действие стрессоров. К ним, в частности, относятся ионы кальция, монооксид азота (NO), cAMP, активные формы кислорода (АФК) [1–3]. АФК в настоящее время рассматриваются как «двойные агенты». Они или непосредственно инициируют интенсивный окислительный стресс, сопровождающийся повреждением или гибелью клеток и организма, или действуют как сигнальные молекулы, индуцирующие физиолого-биохимические реакции, которые способствуют повышению устойчивости организма [4–7].

Под АФК подразумевают совокупность взаимно превращающихся реакционноспособных форм кислорода, большинство из которых существует короткое время. Среди них выделяют свободнорадикальные частицы – супероксидный анион-радикал ($O_2^{\cdot-}$), гидроксильный радикал (OH^{\cdot}), пероксидные радикалы ($RO_2^{\cdot-}$ и др.) и нейтральные молекулы, такие как пероксид водорода (H_2O_2), синглетный кислород (1O_2) и пр.

[2]. АФК образуются в реакциях одно-, двух- и трехэлектронного восстановления кислорода в результате спонтанного и энзиматического окисления различных субстратов, а также в фотоиндуцируемых реакциях.

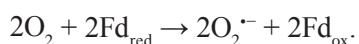
Баланс между образованием и утилизацией АФК жестко регулируется большой сетью генов, которые активируются при действии стрессоров [8–10].

Несмотря на стремительное накопление экспериментальных данных об участии АФК в трансдукции клеточных сигналов [11], представления об их роли в стрессовом сигналинге у растений до сих пор фрагментарные [12]. В частности, неясно, как активируются АФК-генерирующие системы стрессовыми сигналами, открытым остается вопрос о взаимодействии сигналов, формируемых с участием АФК, в различных клеточных компартментах, отсутствуют четкие представления о ключевых сенсорах АФК, их связи с другими сигнальными посредниками. Систематизация полученных в последние годы сведений по этим вопросам и явилась целью настоящего обзора.

Образование АФК в растительных клетках

Генерация АФК у растений происходит в клеточных стенках, плазматической мембране, хлоропластах, митохондриях, пероксисомах и, возможно, в других компартментах [13] (рис. 1).

Процесс фотосинтеза является одним из основных источников образования АФК в клетках зеленых растений. Супероксидный анион-радикал является главным первичным продуктом восстановления молекулярного кислорода в хлоропластах при функционировании фотосистемы (ФС) I. Фотоиндуцированная генерация АФК в основном зависит от условий внешней среды и от физиологического состояния фотосинтетического аппарата [14]. При ограничении фиксации CO_2 в условиях засухи, засоления, высоких температур и других стрессоров пул NADPH расходуется слабо, вследствие этого происходит «утечка» электрона от ферредоксина к молекулярному кислороду в реакции Мелера (Mehler):



ФС II рассматривается в качестве основного источника синглетного кислорода. Он образуется в результате перехода хлорофилла P680 в триплетное состояние в реакционных центрах ФС II и/или в светособирающем комплексе. Вероятность образования синглетного кислорода увеличивается при «перевосстановленности» электронтранспортной цепи в результате поглощения света высокой интенсивности или действия других стресс-факторов [7].

При уменьшении фиксации CO_2 и «перевосстановленности» электронтранспортной цепи активируется фотодыхание, в ходе которого происходит регенерация NADP^+ . Часть реакций фотодыхания происходит в пероксисомах, которые являются еще одним источником АФК. Окисление гликолевой кислоты, образующейся в хлоропластах, гликолатоксидазой в пероксисомах приводит к образованию H_2O_2 (рис. 1). Также пероксид водорода в пероксисомах может образовываться при β -окислении жирных кислот [7].

Митохондрии, как и хлоропласты, содержат большое количество переносчиков электронов. Окислительно-восстановительный потенциал тех из них, которые образуют начальные и средние участки цепи, часто оказывается отрицательнее, чем $-0,3 \text{ В}$ (потенциал пары $\text{O}_2/\text{O}_2^{\cdot-}$).

Это означает, что случайное взаимодействие данных переносчиков с молекулярным кислородом может привести к одноэлектронному восстановлению O_2 до $\text{O}_2^{\cdot-}$. Основными сайтами утечки электронов у растений, как и у животных, считаются комплексы I и III [15]. В изолированных митохондриях генерация АФК (H_2O_2 или $\text{O}_2^{\cdot-}$) может варьировать в широких пределах (от 0,2 до 30 нмоль/(мин·мг протеина)) [16]. Скорость генерации АФК в митохондриях животных клеток зависит прежде всего от степени восстановленности электронтранспортной цепи и мембранного потенциала. Диссипация мембранного потенциала происходит при окислительном фосфорилировании ADP. Поэтому, если в митохондриях достаточно ADP и он активно фосфорилируется, диссипация протонного градиента снижает мембранный потенциал и вероятность генерации $\text{O}_2^{\cdot-}$ [15].

У растений взаимосвязь между транспортом электронов, окислительным фосфорилированием и генерацией АФК более сложная, чем у животных в связи с наличием альтернативной оксидазы, катализирующей окисление убихинона и восстановление молекулярного кислорода до воды. При этом предотвращается вероятность образования $\text{O}_2^{\cdot-}$ вследствие утечки электрона от комплекса III. Наряду с этим транспорт электронов в обход комплекса III, цитохрома c и комплекса IV уменьшает перевосстановление митохондрий, их мембранный потенциал и, как следствие, вероятность образования АФК [17]. Таким образом, альтернативную оксидазу митохондрий можно рассматривать как компонент антиоксидантной системы.

В целом, считается, что дыхательная цепь митохондрий менее мощный источник АФК по сравнению с электронтранспортной цепью хлоропластов. Однако в темноте или в незеленых тканях митохондрии могут вносить существенный вклад в генерацию АФК [16].

Несмотря на то, что наибольший пул АФК образуется в хлоропластах и митохондриях, при «окислительном взрыве», являющемся активной реакцией растений на патогены и элиситоры, в качестве основных источников АФК в растительных клетках рассматриваются окислительно-восстановительные энзиматические системы плазмалеммы и апопласта [18]. С другой стороны, в настоящее время накапливается все больше экспериментальных данных, свиде-

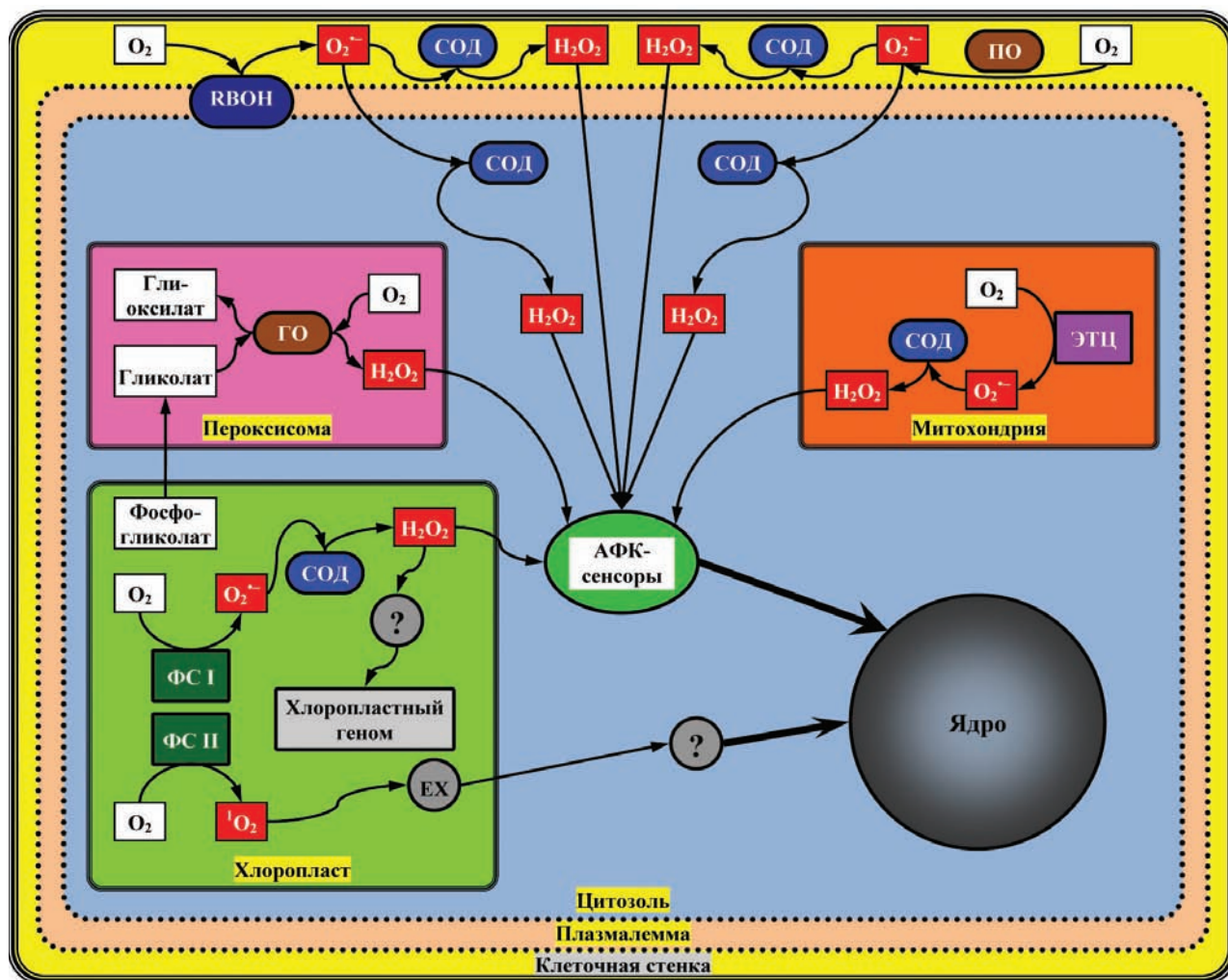


Рис. 1. Общая схема образования АФК и трансдукции редокс-сигналов в растительных клетках.

EX – протеин EXECUTER; RBOH – каталитическая субъединица NADPH-оксидазы; ПО – пероксидаза; СОД – различные формы супероксиддисмутазы; ГО – гликолатоксидаза; ФС – фотосистемы; ЭТЦ – электронтранспортная цепь. Пояснения к схеме. В апопласте супероксидные анион-радикалы образуются с участием NADPH-оксидазы и пероксидазы и превращаются в H_2O_2 под влиянием СОД либо спонтанно. ФС I генерирует $O_2^{\cdot -}$, превращающийся в H_2O_2 , который может влиять на экспрессию хлоропластных генов либо проникать в цитозоль. ФС II образует синглетный кислород, который при посредничестве протеинов EX может изменять экспрессию ядерных генов. При усилении фотодыхания фосфогликолат, поступающий из хлоропластов в пероксисомы, превращается в гликолат, а затем в глиоксилат с образованием H_2O_2 . Супероксидный анион-радикал, образующийся в ЭТЦ митохондрий, с участием СОД превращается в H_2O_2 . Пероксид водорода, проникающий в цитоплазму из апопласта, хлоропластов, пероксисом и митохондрий или образующийся в ней за счет дисмутации $O_2^{\cdot -}$, поступающего из апопласта, изменяет состояние АФК-сенсоров – двухкомпонентных гистидинкиназ, редоксчувствительных транскрипт-факторов, АФК-чувствительных протеинкиназ и протеинфосфатаз, редоксрегулируемых ионных каналов и др. (локализация АФК-сенсоров отображена условно). Изменение состояния АФК-сенсоров прямо и/или опосредованно влияет на экспрессию ядерных генов.

тельствующих об участии NADPH-оксидазы и пероксидаз в реакции растений на абиотические стрессоры, а также в реализации физиологических эффектов экзогенных (а возможно и эндогенных) сигнальных молекул и фитогормонов [18–21].

Таким образом, $O_2^{\cdot-}$ может образовываться в растительных клетках за счет энзиматических реакций в апопласте и при функционировании электронтранспортных систем хлоропластов и митохондрий (рис. 1). Супероксидный анион-радикал является относительно короткоживущей АФК с периодом полужизни до 4 мкс. Соответственно он имеет очень небольшой радиус диффузии при нейтральных значениях pH [7]. Считается, что супероксид-радикал практически не проникает через биомембраны. Хотя известно, что при низких значениях pH $O_2^{\cdot-}$ протонируется и в форме гидропероксил-радикала HO_2^{\cdot} может проходить через мембранные барьеры [22]. Анализ генной экспрессии, проведенный с использованием ДНК-микрочипов, позволил получить некоторые доказательства сигнальной функции супероксидного анион-радикала, отличной от сигнала пероксида водорода [23]. В то же время данных об участии супероксидного анион-радикала в клеточном сигналинге недостаточно, а роль $O_2^{\cdot-}$, образующихся в апопласте, в регуляции экспрессии ядерных генов не доказана.

Синглетный кислород также отличается коротким временем жизни, поэтому, вероятно, выполняет сигнальные функции за счет вовлечения других сигнальных компонентов, к которым, в частности, относятся протеины EXECUTER 1 и 2 (EX1, EX2) [24].

Молекулярно-генетическими методами показано участие синглетного кислорода в регуляции экспрессии ядерных генов, а также взаимодействие сигналов синглетного кислорода и пероксида водорода. В частности, мутантная линия арабидопсиса *flu*, усиленно продуцирующая синглетный кислород, полностью теряла устойчивость к параквату при трансформации, вызывающей сверхэкспрессию гена пластидной аскорбатпероксидазы [25]. В то же время при такой же трансформации у растений арабидопсиса дикого типа устойчивость к гербициду изменялась слабо. Это свидетельствует о взаимодействии сигналов синглетного кислорода и пероксида водорода.

В целом сигнальная роль супероксидного анион-радикала и синглетного кислорода пока исследована недостаточно. Несомненно, значительно больший потенциал для участия в клеточном сигналинге имеют молекулы H_2O_2 – наиболее стабильные из АФК. Пероксид водорода обладает способностью распространяться в клетках на значительные расстояния. Это связано с его относительно невысокой реакционной способностью и проникновением через мембраны благодаря отсутствию заряда [26]. Кроме того, в настоящее время появляются доказательства возможности облегченной диффузии H_2O_2 при помощи аквапоринов [27, 28].

Пероксид водорода в растительных клетках может образовываться в тех же компартментах, в которых генерируется супероксидный радикал за счет его дисмутации – спонтанной либо с участием супероксиддисмутазы (СОД).

СОД представлена значительным количеством молекулярных форм. Cu/Zn-СОД локализована в разных компартментах – в хлоропластах, митохондриях, пероксисомах и апопласте [29–31]. Значительное количество Cu/Zn-СОД выявлено в цитозоле. Цитозольная форма энзима обнаружена на тонопласте или возле него, а также в ядре [32]. Mn-СОД содержится в матриксе митохондрий [30] и пероксисомах [33]. Fe-СОД локализована в клетках растений преимущественно в хлоропластах как в строме, так и на мембранах тилакоидов [29].

Таким образом, все основные компартменты, генерирующие супероксидный анион-радикал, содержат разные формы СОД, превращающие его в H_2O_2 . Последний в настоящее время рассматривается как «центральный узел» [34] сигнальных потоков в растительных клетках (рис. 1).

NADPH-оксидаза растений

NADPH-оксидаза (КФ 1.6.3.1) считается основным продуцентом АФК в животных и растительных клетках [22, 35, 36]. Этот энзиматический комплекс восстанавливает молекулярный кислород с образованием супероксидного анион-радикала:



В реакции используется цитоплазматический NADPH, электроны от которого с участием

FAD и гема переносятся через мембрану на наружную ее сторону к молекулярному кислороду с образованием супероксидного анион-радикала [36].

NADPH-оксидаза растений отличается от таковой у животных. Так, энзим фагоцитов представляет собой сложную систему, состоящую из шести гетерогенных субъединиц, в т.ч. двух мембраносвязанных (gp91^{phox} – glycoprotein of 91 kDa phagocyte oxidase-specific и p22^{phox}) и четырех цитозольных (p47^{phox}, p40^{phox}, p67^{phox} и Rac1 или Rac2 (GTPases)), которые при активации энзима под действием широкого спектра эффекторов объединяются в комплекс, генерирующий O₂^{•-} [35]. У растений найдены только гомологи мембраносвязанной субъединицы gp91^{phox} (Nox2 – NADPH oxidase) и цитозольная субъединица семейства малых GTPases (Rac-протеинов, которые применительно к растениям чаще называют Rop (Rho-related GTPases from plants)) [36].

Геном арабидопсиса содержит 10 представителей семейства генов мембраносвязанной субъединицы RBOH (Respiratory Burst Oxidase Homologs), обозначаемых как *AtRboh* (A, B, C, D, E, F, G, H, J, L) [37–38]. В геноме риса выявлено девять генов, кодирующих каталитическую субъединицу NADPH-оксидазы. Гены *RBOH* идентифицированы и в геномах ряда других растений [39].

Растительная мембраносвязанная субъединица имеет N-концевой участок, который связывает Ca²⁺. Растительные гомологи NADPH-оксидазы содержат также цитозольный FAD- и NADPH-связывающие домены и шесть трансмембранных спиралей с двумя гемами, необходимыми для транспорта электронов к внеклеточному акцептору молекулярного кислорода [22, 36].

В связи с полученными доказательствами участия NADPH-оксидазы в АФК-сигналинге в последние годы активно исследуются механизмы регуляции активности этого энзима. Показано, что значительная роль принадлежит посттрансляционным модификациям, происходящим путем фосфорилирования, связывания кальция и фосфатидной кислоты [40]. Как эффективные сайты фосфорилирования в N-концевом участке мембраносвязанной субъединицы (RBOH) были идентифицированы несколько остатков серина. Так, с использованием

методов фосфопротеомики было показано фосфорилирование S343 и S347 остатков молекулы AtRBOHD, вызываемое действием патогенных элиситоров на растения арабидопсиса [41]. При этом установлено, что фосфорилирование указанных сайтов необходимо, но недостаточно для полной активации RBOHD. В молекулах другой формы NADPH-оксидазы AtRBOHC выявлены остатки S318 и S322, которые фосфорилируются, и мутация гена по ним вызывает изменения в генерации АФК [42].

Особую роль в регуляции активности NADPH-оксидазы играют ионы кальция. Согласно одной из моделей, кальций активирует Ca²⁺-зависимую протеинкиназу, которая фосфорилирует N-концевой участок мембраносвязанной субъединицы (RBOH) NADPH-оксидазы и вызывает ее конформационные изменения, способствующие связыванию с ней цитозольного компонента – Rop-протеина (GTPases). В результате происходит образование активного димера, приводящее к усилению генерации АФК [20]. Позднее на примере одной из форм мембраносвязанной субъединицы NADPH-оксидазы риса (OsRBOHB) было показано наличие в N-терминальной области EF-рук, указывающих на формирование димера с участием кальция [43]. Таким образом, повышение активности NADPH-оксидазы с участием кальция, по-видимому, связано не только с активацией им протеинкиназы, но и с прямым взаимодействием Ca²⁺ с каталитической субъединицей.

Установлен эффект синергизма в активирующем действии Ca²⁺-ионофора иономицина и ингибитора протеинфосфатаз каликулина А на NADPH-оксидазу арабидопсиса [44]. Предполагается, что фосфорилированная каталитическая субъединица AtRBOHD, присоединяя кальций в области EF-рук, претерпевает более глубокие конформационные изменения, чем нефосфорилированная, в результате этого происходит более существенная активация энзима при одновременном действии кальциевого ионофора и ингибитора фосфатаз. Недавно было показано, что ингибитор протеинкиназ K-252a угнетал вызываемую Ca²⁺ активацию AtRBOHD и AtRBOHF [45]. Авторами предложена модель, согласно которой фосфорилирование RBOHD и RBOHF у арабидопсиса предшествует процессу связывания кальция. При этом фосфорилирование RBOH само по себе вызывает активацию эн-

зима, что приводит к усилению генерации АФК, участвующих в открывании кальциевых каналов. Поступление кальция в цитозоль вызывает дополнительную активацию NADPH-оксидазы. В то же время не исключается и усиление фосфорилирования каталитической субъединицы за счет активации кальцийзависимой протеинкиназы. В целом предполагается, что любые воздействия, вызывающие изменения концентрации цитозольного кальция, могут потенциально влиять на активность NADPH-оксидазы [39].

Еще один механизм регуляции активности NADPH-оксидазы состоит в связывании с каталитической субъединицей фосфатидной кислоты [40], которая является продуктом превращения мембранных липидов с участием фосфолипазы D. Так, показано, что мутация по остатку аргинина в N-терминальном участке субъединиц AtRBOHD и AtRBOHF приводит к потере их способности связывать фосфатидную кислоту и активироваться под ее влиянием [46].

Вполне естественно, что активность NADPH-оксидазы, как и большинства других энзимов, может регулироваться концентрацией субстрата (NADPH), содержание которого зависит от окислительно-восстановительных процессов в цитозоле и от процессов, происходящих в хлоропластах и митохондриях [13]. В частности, перевосстановленность электрон-транспортных цепей в указанных органеллах может способствовать увеличению общего пула NADPH и активации NADPH-оксидазы (см. ниже). Наконец, в последнее время показано, что NADPH-оксидаза может активироваться самими АФК (молекулами пероксида водорода), образуемыми соседними клетками [47].

Возможные сенсоры АФК-сигналов в растительных клетках

Механизмы рецепции и трансдукции АФК-сигналов в клетках растений описаны пока еще схематически. Выделяют следующие потенциальные сенсоры АФК: 1) двухкомпонентные гистидинкиназы; 2) АФК-чувствительные транскрипт-факторы, такие как NPR1 (Nonexpressor of Pathogenesis-Related Genes1) или факторы теплового шока; 3) АФК-чувствительные протеинкиназы и протеинфосфатазы; 4) редоксрегулируемые ионные каналы [39, 48].

Трансмембранные автофосфорилирующие гистидинкиназы считаются одним из древних

консервативных типов мембранных рецепторов. Предполагается их участие в восприятии клеткой АФК. В экспериментах с *Synechocystis* показано, что мутации по генам гистидинкиназ Hik34, Hik16, Hik41 и Hik33 предотвращают индукцию набора генов, стимулируемых экзогенным H_2O_2 [49]. Установлено, что перечисленные гистидинкиназы регулируют у цианобактерий 26 из 77 генов, индуцируемых пероксидом водорода [50].

Известно, что у прокариот H_2O_2 может окислять тиольные группы непосредственно в факторах регуляции транскрипции (например, Oxy R) [4]. У эукариот механизм регуляции транскрипционной активности с участием АФК более сложный и включает комплекс протеинов и пептидов [51–53]. В то же время и в растениях идентифицирован транскрипт-фактор NPR1, опосредованно регулируемый действием АФК [54]. Под его контролем находится реакция сверхчувствительности растений на патогены. У растений чувствительным к пероксиду водорода оказался также транскрипт-фактор теплового шока HSFA4. Гипотетические модели, которыми обосновывается возможность влияния H_2O_2 на этот протеиновый комплекс, предложены Миллером и Митлером [55]. Однако прямых доказательств непосредственной активации транскрипт-факторов теплового шока под действием пероксида водорода в клетках растений недостаточно [56, 57].

Выявлен эффект окисления АФК цистеиновых остатков в протеинкиназах и протеинфосфатазах [58]. Показано также участие H_2O_2 в контроле тирозинового фосфорилирования протеинов растений [59]. При этом, по мнению авторов, эндогенный H_2O_2 влияет как на активность тирозиновых протеинфосфатаз (ингибирует их, окисляя SH-группы каталитического центра), так и на активность тирозиновых протеинкиназ (окисление сульфгидрильных групп активирует эти энзимы).

На разных растительных объектах показана активация MAP-киназ под действием экзогенного H_2O_2 или индукторов его образования [47, 60]. Влияние H_2O_2 на MAP-киназные каскады может быть связано с окислением тиольных остатков в этих протеинах [61]. Предложена даже гипотеза о стабилизирующем влиянии H_2O_2 на киназу MAP-киназы [6].

Разные типы ионных каналов, в т.ч. кальциевых, также рассматриваются в качестве

сенсоров АФК. Так, показано, что у арабидопсиса экзогенный H_2O_2 может активировать Ca^{2+} -проницаемые неселективные катионные каналы [62], участвующие в процессах закрывания устьиц, индуцируемого абсцизовой и жасмоновой кислотами [63]. Также установлено, что гидроксильный радикал может активировать приток кальция в цитозоль через Ca^{2+} -проницаемые неселективные катионные каналы [64]. Этот механизм может быть элементом комплекса реакций, сопровождающих программируемую гибель растительных клеток [65].

Известно, что ионные каналы также могут активироваться с участием G-протеинов. Функционирование последних может изменяться под влиянием многих факторов, вероятно и АФК. Так, в системе *in vitro* показана возможность непосредственной регуляции активности G-протеинов физиологическими концентрациями H_2O_2 , которые вызывают диссоциацию гетеротримерного комплекса с освобождением α -субъединицы [66]. В то же время пока отсутствуют доказательства функционирования такого механизма *in vivo* [39].

Взаимодействие разных пулов АФК

Есть основания полагать, что для реализации многих физиологических реакций необходимо взаимодействие АФК, генерируемых в апопласте и АФК, образующихся в хлоропластах, митохондриях и пероксисомах. Как уже упоминалось, H_2O_2 может проникать из органелл в цитозоль, вероятно, через водные каналы и взаимодействовать с различными редокс-сенсорами, и, как следствие, модифицировать сигналы, передающиеся из апопласта через цитозоль [67].

Хлоропласты, митохондрии и пероксисомы генерируют значительные количества АФК, и процесс их образования зависит от экологических условий, в т.ч. действия стресс-факторов. В связи с этим предполагается, что внутриклеточное расположение этих органелл может влиять на АФК-сигнализацию [67]. В частности, показано, что трансгенные растения табака, накапливающие увеличенное количество цитокининов, в условиях засухи отличались более стабильным АФК-метаболизмом, что может быть связано с более тесной ассоциацией между хлоропластами, пероксисомами и митохондриями [68]. Предполагается также возможность прямого взаимодействия АФК, генерируемых хлоропластами, с

АФК, поступающими из апопласта в цитозоль через плазматическую мембрану [67].

В редокс-взаимодействии клеточных компартментов могут принимать участие и восстановители. Например, NADPH, образующийся в цитозоле при окислении различных субстратов, а также транспортирующийся в везикулах из хлоропластов и митохондрий к месту локализации NADPH-оксидазы (к плазматической мембране), может вызывать усиление генерации супероксидного анион-радикала этим ферментом [13]. Как отмечалось, таким путем «перевосстановленность» электронтранспортных цепей хлоропластов и митохондрий может влиять на образование АФК клеточной поверхностью.

Взаимодействие АФК с другими сигнальными посредниками

В настоящее время не вызывает сомнения, что сигнальные системы растительных клеток функционируют не разрозненно, а объединены в общую сеть [1, 3]. Накоплены экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что Ca^{2+} , АФК и монооксид азота (NO) являются посредниками, наиболее тесно взаимодействующими между собой при формировании устойчивости растений к стрессорам, в т.ч. абиотическим (рис. 2).

Усиление образования АФК, как и увеличение концентрации цитозольного Ca^{2+} (обычно кратковременное), относится к ранним реакциям растительных и животных клеток на воздействие стрессоров различной природы [2, 3].

В большинстве исследований показана первичность стрессового «всплеска» кальция по отношению к усилению генерации АФК, что связывают, в частности, с активацией кальцием NADPH-оксидазы – основного генератора АФК (см. выше). В то же время известно, что состояние, по крайней мере, части кальциевых каналов зависит от АФК. Так, с их помощью изменяется активность потенциалзависимых, регулируемых гиперполяризацией Ca^{2+} -каналов – hyperpolarization regulated Ca-permeable channel [19, 22].

Показано, что механочувствительные кальциевые каналы также могут регулироваться АФК [69]. Вероятно, АФК, появляющиеся вследствие активации NADPH-оксидазы, могут взаимодействовать с некоторыми функциональными группами актина или других протеинов цито-

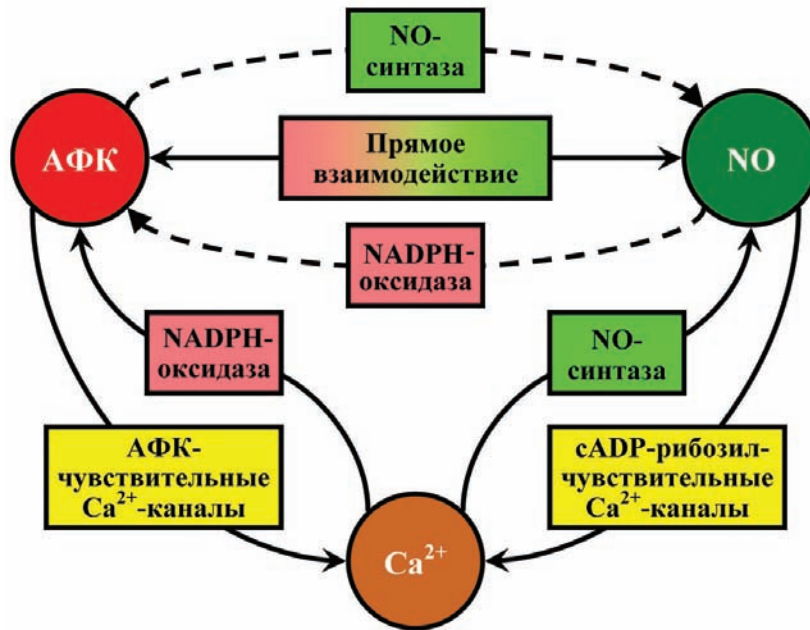


Рис. 2. Связь между АФК, NO и Ca^{2+} как сигнальными посредниками. Пояснения к схеме. АФК могут вызывать усиление поступления Ca^{2+} в цитозоль за счет влияния на редоксчувствительные Ca^{2+} -каналы. Ca^{2+} способствует активации NADPH-оксидазы. АФК могут активировать NO-синтазу и усиливать генерацию NO. Между АФК и NO возможно прямое взаимодействие с нейтрализацией эффектов. NO может способствовать поступлению Ca^{2+} в цитозоль через внутриклеточные сADP-рибозилчувствительные Ca^{2+} -каналы. Ca^{2+} является активатором NO-синтазы

скелета, ассоциированных с плазматической мембраной. Таким образом, от состояния этих протеинов может прямо или опосредованно зависеть состояние механочувствительных Ca^{2+} -каналов [69].

В целом же можно констатировать, что взаимосвязь между образованием АФК и изменениями концентрации кальция в клетках неоднозначна: в одних случаях Ca^{2+} индуцирует образование АФК; в других – АФК вызывают выход кальция в цитозоль. Нередко подобные эффекты наблюдаются одновременно. Есть основания полагать, что и Ca^{2+} , и АФК являются ключевыми компонентами единой сигнальной сети, на разных этапах функционирования которой возможно взаимное усиление действия этих посредников [3].

АФК принимают участие в реализации физиологических эффектов NO и наоборот [70, 71]. Так, при обработке растений экзогенным H_2O_2 увеличивалась генерация оксида азота, а под влиянием экзогенного донора NO нитропрусида натрия повышалось содержание H_2O_2 [72]. В целом же между указанными посредниками, по-видимому, существуют прямые и обратные

связи. Например, в культуре тканей корней женьшеня под влиянием донора NO усиливалась генерация супероксидного анион-радикала [73]. На растениях *Hypericum perforatum* показано увеличение содержания H_2O_2 под действием теплового шока, которое частично угнеталось сквенджером NO [72]. В листьях табака также показано быстрое увеличение содержания H_2O_2 в ответ на обработку донорами NO [74]. В то же время на растениях бобов эффект экзогенного оксида азота как агента, вызывающего закрытие устьиц, не подавлялся каталазой и реализовался независимо от АФК [75]. Обработка отделенных листьев кукурузы донором оксида азота не приводила к накоплению в них H_2O_2 , хотя экзогенный H_2O_2 вызывал усиление генерации NO [76].

Оксид азота может оказывать влияние как на ферментные системы, генерирующие АФК, в частности NADPH-оксидазу [73], апопластные формы пероксидазы [77], так и на антиоксидантные ферменты [78] и, таким образом, участвовать в сложной регуляции АФК-сигналов. Примечательно, что как увеличение содержания оксида азота в клетках растений с помощью донора NO, так и его снижение с помощью сквендже-

ра, может приводить к повышению активности антиоксидантных ферментов [78]. Авторы предполагают, что NO может участвовать не только во включении, но и в выключении антиоксидантной защиты, модификации АФК-сигнала и переключении растительных клеток с одних стресс-протекторных механизмов на другие.

Хорошо известна также возможность прямого взаимодействия АФК и NO. При реакции NO с $O_2^{\cdot-}$ образуется токсичный пероксинитрит ($ONOO^-$), который может окислять тиоловые остатки, нитровать белки по тирозину [79]. С другой стороны, в определенных условиях NO, по-видимому, может действовать как антиоксидант. Так, показано уменьшение оксидом азота цитотоксического действия АФК на клетки млекопитающих [80]. Насколько подобные прямые взаимодействия АФК и азота могут модифицировать передачу клеточных сигналов у растений пока не ясно.

Взаимодействие между АФК и NO как сигнальными компонентами, вероятно, во многих случаях опосредовано кальцием (рис. 2). Известно, что растительный фермент, подобный NO-синтазе животных, как и NADPH-оксидаза, активируется с участием кальция [81]. Кроме того, известно, что под действием экзогенных H_2O_2 и NO увеличивается содержание кальция в цитозоле растительных клеток [39, 81]. Еще один механизм взаимодействия между указанными посредниками связан с влиянием АФК [39] и оксида азота [82] на состояние кальциевых каналов.

В целом, по-видимому, между концентрацией внутриклеточного кальция, содержанием АФК и оксида азота существуют тесные прямые и обратные связи. Один из таких эффектов изучен нами на клетках coleoptiles пшеницы. Их обработка нитропруссидом натрия приводила к усилению генерации супероксидного анион-радикала. Данный эффект в значительной степени подавлялся блокатором кальциевых каналов хлоридом лантана, антагонистом кальмодулина хлорпромазином и ингибитором NADPH-оксидазы имидазолом, что позволяет предполагать кальцийзависимое повышение активности NADPH-оксидазы под действием NO [83]. Происходящее вследствие этого усиление образования АФК является необходимым для формирования устойчивости растительных клеток к нагреву, поскольку антиоксидант ионол, антагонисты

кальция и ингибитор NADPH-оксидазы имидазол в значительной степени снижали эффект повышения теплоустойчивости coleoptiles пшеницы, вызываемый действием донора NO. Одной из защитных реакций, индуцируемых действием оксида азота при посредничестве АФК, может быть активация антиоксидантных ферментов – СОД, каталазы и растворимой пероксидазы [83].

Участие АФК в процессах развития устойчивости растений к абиотическим стрессорам

Повышение содержания АФК в растениях в ответ на действие абиотических стрессоров зарегистрировано в огромном количестве исследований. При этом АФК рассматриваются одновременно как маркеры стрессового состояния и как сигнальные посредники, необходимые для развития адаптивного ответа [8, 47].

Одним из физиологически значимых механизмов усиления продукции АФК может быть активация АФК-генерирующих ферментных систем. Как уже отмечалось, одним из основных ферментов, генерирующих АФК на клеточной поверхности, является NADPH-оксидаза. Предполагается, что этот фермент может активироваться после поступления внешних сигналов на мембранные сенсоры [48].

Установлен эффект повышения активности NADPH-оксидазы в корнях проростков гороха и листьях арабидопсиса при действии гипотермии, гербицида параквата и других неблагоприятных факторов [84, 85]. Показано транзитное увеличение активности NADPH-оксидазы и содержания H_2O_2 в корнях и побегах этиолированных проростков кукурузы при действии низких положительных температур [86].

Кратковременное усиление образования супероксидного анион-радикала и H_2O_2 в корнях и побегах проростков пшеницы показано после одномоментного действия высокой закалывающей температуры (42 °C). Данный эффект в значительной степени угнетался ингибитором NADPH-оксидазы имидазолом, что позволило предположить причастность NADPH-оксидазы к накоплению H_2O_2 [87]. Кроме того, имидазол частично нивелировал развитие теплоустойчивости проростков, индуцируемое кратковременным действием гипертермии, что можно рассматривать как косвенное свидетельство участия

NADPH-оксидазы в процессе закаливания. Также установлено, что антиоксиданты (ионол, диметилтиомочевина) и ингибитор NADPH-оксидазы (имидазол) подавляли вызываемое тепловым закаливанием повышение активности антиоксидантных ферментов – СОД, каталазы, гваяколпероксидазы и аскорбатпероксидазы [87–89].

Похожие эффекты зарегистрированы и при изучении роли сигнала, формирующегося с участием АФК, в адаптации растений к осмотическому шоку. Через несколько часов после закаливающего осмотического воздействия на проростки пшеницы отмечалось повышение их устойчивости к осмотическому шоку. При этом после закаливания происходило транзиторное увеличение содержания H_2O_2 , которое в значительной степени угнеталось ингибитором NADPH-оксидазы имидазолом [90]. Обработка проростков скавенджером H_2O_2 диметилтиомочевинной или ингибитором NADPH-оксидазы имидазолом нивелировала эффект преадаптации.

Показана роль АФК, генерируемых с помощью NADPH-оксидазы, и в защитных реакциях проростков кукурузы на обезвоживание. При угнетении NADPH-оксидазы специфическим ингибитором дифенилениодонием в проростках кукурузы, подвергнутых водному стрессу или действию АБК, не наблюдалось такой ответной адаптивной реакции как повышение активности антиоксидантных ферментов [91].

Сообщается об активации NADPH-оксидазы под влиянием солевого стресса [6]. Примечательно, что мутанты *AtRbohJ* производили меньше АФК и отличались низкой солеустойчивостью [92]. Солеустойчивость растений арабидопсиса снижалась и при обработке ингибитором NADPH-оксидазы дифенилениодонием [92]. Также показано, что двойные мутанты арабидопсиса по генам, кодирующим мембраносвязанную субъединицу NADPH-оксидазы *AtRbohD* и *AtRbohF*, накапливали большее количество ионов натрия в клетках [93]. Обработка растений экзогенным H_2O_2 приводила к уменьшению накопления натрия в условиях солевого стресса. Авторы делают вывод о том, что АФК, производимые NADPH-оксидазой, функционируют как сигнальные посредники, участвующие в регуляции Na^+/K^+ -гомеостаза в растительных клетках.

Возможно, что АФК, генерируемые NADPH-оксидазой, задействованы в активации накопления пролина, необходимого для адаптации к засолению. На растениях проса показано, что их предобработка диметилтиомочевинной или имидазолом снимала как вызываемое солевым стрессом повышение содержания H_2O_2 в растениях проса, так и накопление пролина. Предстрессовая обработка указанными соединениями снижала и выживание растений после действия потенциально летального засоления [94].

Следует отметить, что NADPH-оксидаза не единственный фермент, участвующий в индуцируемом стресс-факторами усилении генерации АФК. Так, при тепловом и осмотическом закаливающих воздействиях на проростки пшеницы происходило увеличение активности апопластной пероксидазы. Обработка растений ингибитором пероксидазы салицилгидроксамовой кислотой частично снимала вызываемый действием стрессоров эффект повышения содержания H_2O_2 [90].

Как уже отмечалось, молекулы H_2O_2 среди АФК имеют больший потенциал для участия в клеточном сигналинге. В связи с этим возникает вопрос о роли СОД в конвертации супероксидного анион-радикала в H_2O_2 как сигнальную молекулу. Показано, что повышение содержания H_2O_2 в органах проростков пшеницы, индуцируемое тепловым или осмотическим закаливающими воздействиями, полностью снималось ингибитором СОД диэтилдитиокарбаматом натрия (ДДК) [87, 95]. При этом сам по себе указанный ингибитор незначительно влиял на содержание H_2O_2 в корнях проростков. Обработка проростков ДДК снижала вызываемое закаливающим воздействием увеличение активности аскорбатпероксидазы, гваяколпероксидазы и каталазы и препятствовала развитию устойчивости проростков к повреждающему прогреву и осмотическому шоку [87, 95].

Эти результаты согласуются с данными, полученными при изучении влияния агента окислительного стресса параквата на экспрессию гена аскорбатпероксидазы в эмбриональной культуре риса [96]. Вызываемая паракватом индукция аскорбатпероксидазы подавлялась ингибитором СОД ДДК и усиливалась действием ингибитора каталазы 3-аминотриазола. Таким образом, основную сигнальную роль при инду-

цировании антиоксидантных энзимов умеренным действием стрессоров, по-видимому, выполняет H_2O_2 , а не другие АФК.

Обобщая имеющиеся сведения, можно представить один из вероятных механизмов индуцирования адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров (например, гипертермии, осмотического шока, засоления), реализующийся с участием АФК-генерирующих энзимов. Поверхность клетки с помощью гипотетических сенсоров [97, 98] воспринимает сигналы гипертермии, осмотического воздействия или засоления (рис. 3). Это приводит к активации трансмембранной NADPH-оксидазы, апопластных форм пероксидазы и усилению генерации супероксидного анион-радикала. Последний с помощью апопластных форм СОД может превращаться в H_2O_2 , который свободно проникает в цитоплазму через плазматическую мембрану. Кроме того, как уже упоминалось, при определенных условиях $O_2^{\cdot-}$ может превращаться в гидропероксид и проходить через мембраны [22]. При этом в дальнейшем супероксидный анион-радикал превращается в H_2O_2 цитозольными формами СОД. Одновременно при действии стрессоров может происходить усиление стохастического образования АФК в хлоропластах, митохондриях и активация фотодыхания [13].

Увеличение концентрации H_2O_2 в клетках приводит к модификации внутриклеточных протеиновых редокс-сенсоров. В конечном итоге, вероятно, АФК-сигнал приводит к изменению состояния транскрипт-факторов, которые контролируют гены антиоксидантных энзимов и энзимов, участвующих в синтезе пролина, и другие защитные реакции.

Имеются основания полагать, что именно АФК как сигнальные посредники принимают участие в процессах, обеспечивающих формирование перекрестной устойчивости растений к стресс-факторам различной природы [67]. Сигналы АФК тесно интегрированы с сигналами так называемых «стрессовых» фитогормонов, в частности, этилена, абсцизовой, салициловой и жасмоновой кислот, брассиностероидов [99]. Указанные растительные гормоны прямо или опосредованно могут активировать NADPH-оксидазу и способствовать усилению генерации АФК. В частности, индуцируемое засухой закрытие устьиц, как и их открывание после прекращения засухи, может быть результатом

сложного взаимодействия сигналов, опосредованных абсцизовой кислотой, этиленом, брассиностероидами, пероксидом водорода, кальцием и оксидом азота [100]. Образование абсцизовой и салициловой кислот может быть ответом на увеличение содержания АФК в клетках. С другой стороны, физиологические эффекты этих стрессовых фитогормонов, как и жасмоновой кислоты и брассиностероидов, реализуются с участием АФК [5, 101]. Вопросы взаимодействия АФК и стрессовых фитогормонов как сигнальных соединений чрезвычайно сложны и выходят за рамки настоящего обзора. Заметим, что они достаточно глубоко изложены в вышедшем недавно обзоре Bartoli et al. [99].

АФК в настоящее время рассматриваются как вторичные мессенджеры, участвующие в индуцировании устойчивости растений к абиотическим стрессорам различной природы: гипо- и гипертермии, осмотическому шоку, засолению и пр. Уже появилось довольно много экспериментальных доказательств роли АФК-генерирующих энзимов клеточной поверхности (прежде всего, NADPH-оксидазы) в формировании сигнала, приводящего к активации защитных реакций и развитию устойчивости растений к указанным стрессорам. Однако механизмы активации этих энзимов, получения ими сигнала от первичных сенсоров действия стрессоров неизвестны. С другой стороны, очень мало известно о взаимодействии энзиматических систем, генерирующих АФК, с другими потенциальными их источниками, в частности, электрон-транспортными цепями митохондрий и хлоропластов. Не исключено, что слабый сигнал, обусловленный вызываемым стрессорами стохастическим увеличением содержания АФК в этих компартментах, может превращаться в более мощный, связанный с повышением активности АФК-генерирующих энзимов на клеточной поверхности [47]. В пользу такого предположения свидетельствует активация NADPH-оксидазы самими АФК.

Вопрос об избирательности сигналов АФК предметно обсуждается сравнительно недавно [12, 47]. Одна из концепций предполагает, что АФК используются, главным образом, в качестве общего сигнала, предшествующего активации всей сигнальной сети. При этом избирательность достигается за счет появления других сигнальных молекул. Особое значение в реали-

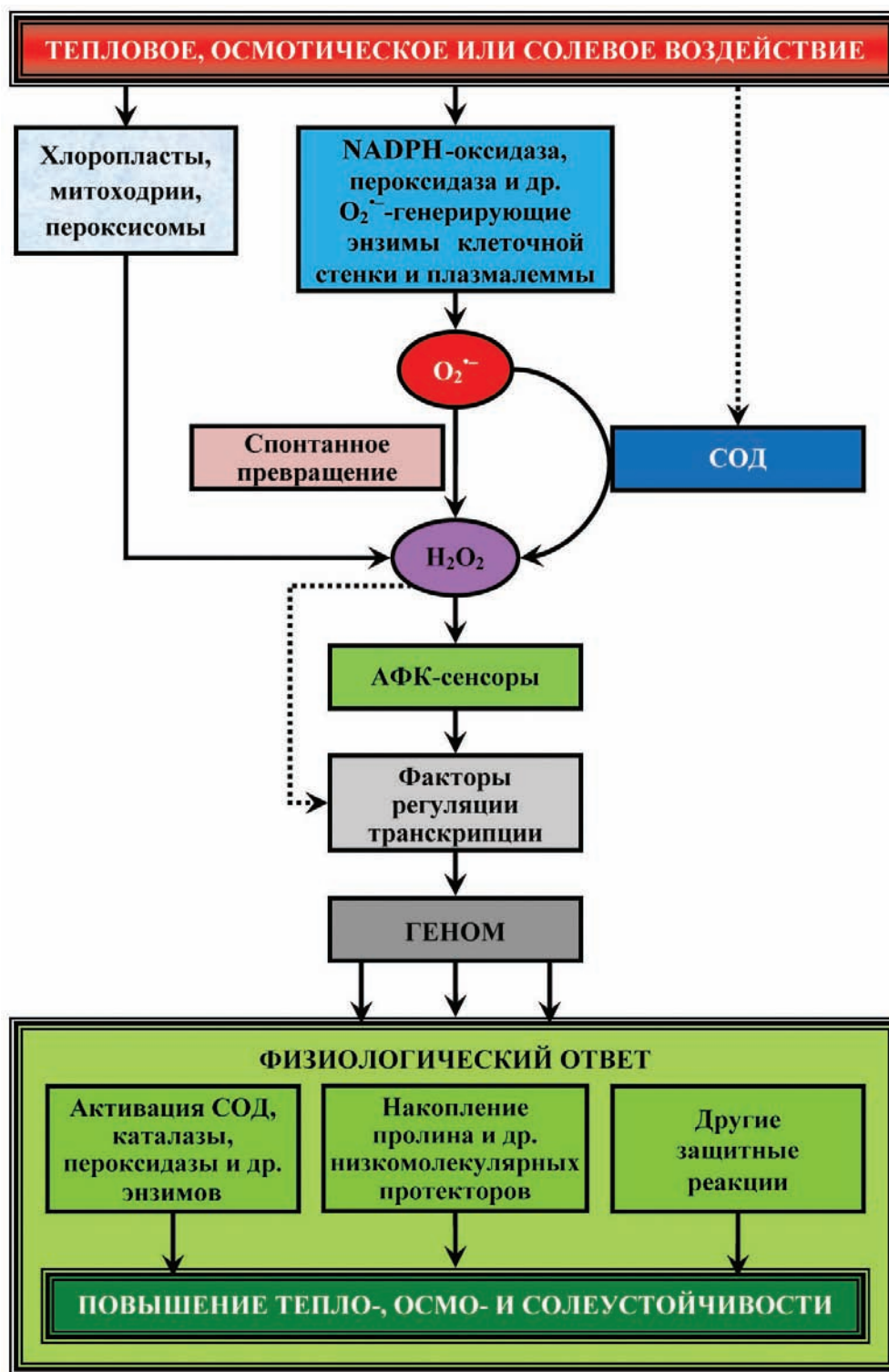


Рис. 3. Гипотетическая схема усиления образования АФК в растительных клетках при тепловом, осмотическом и солевом воздействиях. Пояснения к схеме. Под действием стресс-факторов могут активироваться NADPH-оксидаза и другие ферменты, генерирующие АФК, а также СОД, что приводит к увеличению количества H_2O_2 . Также может усиливаться образование АФК в хлоропластах, митохондриях и пероксисомах. H_2O_2 прямо, а чаще при посредничестве АФК-сенсоров, взаимодействует с транскрипт-факторами и влияет на экспрессию генов, индуцируя физиологические реакции, обеспечивающие повышение устойчивости растений

заций сигнальных эффектов АФК, по-видимому, имеет их взаимодействие с Ca^{2+} и NO. Не вызывает сомнений роль АФК в открывании кальциевых каналов и активации синтеза NO. В свою очередь, NO и Ca^{2+} участвуют в регуляции образования и обезвреживания АФК (в частности, путем влияния на активность NADPH-оксидазы и антиоксидантных энзимов).

Наряду с сигналами, связанными с другими посредниками, сигнал самих АФК является достаточно информативным и может расшифровываться с помощью набора рецепторов АФК, имеющихся в клеточных компартментах [47].

В целом, считается, что результат эффектов АФК как сигнальных посредников определяется не только их количеством, но и клеточной локализацией, взаимодействием с антиоксидантами, другими сигнальными молекулами и стрессовыми фитогормонами. Исследования таких взаимодействий, особенно методами неразрушающего контроля (цитохимическими, флуоресцентными) [102], в сочетании с подходами транскриптомики [103] сейчас представляют собой динамично развивающуюся область клеточной физиологии и биохимии растений.

АКТИВНІ ФОРМИ КИСНЮ І СТРЕСОВИЙ СИГНАЛІНГ У РОСЛИН

Ю. Є. Колупаєв, Ю. В. Карпець

Харківський національний аграрний
університет ім. В. В. Докучаєва, Україна;
e-mail: plant_biology@mail.ru

В огляді узагальнено дані щодо основних процесів і компартментів, які беруть участь в утворенні активних форм кисню (АФК) у рослинних клітинах. Охарактеризовано особливості будови і регуляції NADPH-оксидази як одного з основних ензиматичних продуцентів АФК. Як можливі сенсори редокс-сигналів у рослинних клітинах розглянуто двокомпонентні гістидинкінази, АФК-чутливі транскриптори, АФК-чутливі протеїнкінази і редоксрегульовані іонні канали. Обговорено взаємодію між АФК та іншими сигнальними посередниками, особливо оксидом азоту та іонами кальцію. Проаналізовано роль АФК як сигнальних посередників у розвитку стійкості рослин до гіпертермії, осмотичного шоку й інших абіотичних стресорів.

Ключові слова: активні форми кисню, NADPH-оксидаза, сенсори редокс-сигналів, кальцій, оксид азоту, абіотичні стресори, рослинні клітини.

REACTIVE OXYGEN SPECIES AND STRESS SIGNALING IN PLANTS

Yu. E. Kolupaev, Yu. V. Karpets

V. V. Dokuchaev Kharkiv National
Agrarian University, Ukraine;
e-mail: plant_biology@mail.ru

Data on the basic processes and the compartments, involved in formation of reactive oxygen species (ROS) in plant cells, are generalised. The features of structure and regulation of NADPH-oxidase as the one of main enzymatic producers of ROS are characterized. The two-component histidine kinases, ROS-sensitive transcript-factors, ROS-sensitive protein kinase and redox-regulated ionic channels are discussed as the possible sensors of redox-signals in plant cells. The interaction between ROS and other signal mediators, in particular nitric oxide and calcium ions, is discussed. The ROS role as the signal mediators in the development of plant resistance to hyperthermia, osmotic shock and other abiotic stressors is analyzed.

Key words: reactive oxygen species, NADPH-oxidase, redox-signal sensors, calcium, nitric oxide, abiotic stressors, plant cells.

References

1. Tarchevsky I. A. Signal systems of plant cells. – Moscow: Nauka, 2002. – 294 p. (In Russian).
2. Scandalios J. G. The rise of ROS // Trends Biochem. Sci. – 2002. – **27**. – P. 483–486.
3. Kaur N., Gupta A. K. Signal transduction pathways under abiotic stresses in plant // Curr. Sci. – 2005. – **88**. – P. 1771–1780.
4. Vranova E., Inze D., Breusegem F. Signal transduction during oxidative stress // J. Exp. Bot. – 2002. – **53**. – P. 1227–1236.
5. Kolupaev Yu. Ye., Karpets Yu. V. Formation of plants adaptive reactions to abiotic stressors influence. – Kyiv: Osnova, 2010. – 352 p. (In Russian).
6. Jaspers P., Kangasjarvi J. Reactive oxygen species in abiotic stress signaling // Physiol. Plant. – 2010. – **138**. – P. 405–413.

7. Kreslavski V. D., Allakhverdiev S. I., Los D. A., Kuznetsov V. V. Signaling role of reactive oxygen species in plants under stress // *Russ. J. Plant Physiol.* – 2012. – **59**. – P. 141–154.
8. Pucciariello C., Banti V., Perata P. ROS signaling as common element in low oxygen and heat stresses // *Plant Physiol. Biochem.* – 2012. – **59**. – P. 3–10.
9. Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Van Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants // *Trends Plant Sci.* – 2004. – **9**. – P. 490–498.
10. Huang G. T. Ma S. L., Bai L. P., Zhang L., Ma H., Jia P., Liu J., Zhong M., Guo Z. F. Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants // *Mol. Biol. Rep.* – 2012. – **39**. – P. 969–987.
11. Drobot L. B., Samoylenko A. A., Vorotnikov A. V., Tyurin-Kuzmin P. A., Bazalii A. V., Kietzmann T., Tkachuk V. A., Komisarenko S. V. Reactive oxygen species in signal transduction // *Ukr. Biochem. J.* – 2013. – **85**, N 6. – P. 209–217.
12. Moller I. M., Sweetlove L. J. ROS signaling-specificity is required // *Trends Plant Sci.* – 2010. – **15**. – P. 370–374.
13. Foyer C. H., Noctor G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications // *Antioxid. Redox Signal.* – 2009. – **11**. – P. 861–906.
14. Foyer C. H., Shigeoka S. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis // *Plant Physiol.* – 2011. – **155**. – P. 93–100.
15. Cvetkovska M., Vanlerberghe G. C. Alternative oxidase impacts the plant response to biotic stress by influencing the mitochondrial generation of reactive oxygen species // *Plant Cell Environ.* – 2013. – **36**. – P. 721–732.
16. Rhoads D. M., Umbach A. L., Subbaiah C. C., Siedow J. N. Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling // *Plant Physiol.* – 2006. – **141**. – P. 357–366.
17. Moller I. M. Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species // *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 2001. – **52**. – P. 561–591.
18. Minibayeva F., Kolesnikov O., Chasov A., Beckett R. P., Lüthje S., Vylegzhanina N., Buck F., Böttger M. Wound-induced apoplastic peroxidase activities: their roles in the production and detoxification of reactive oxygen species // *Plant Cell Environ.* – 2009. – **32**. – P. 497–508.
19. Kwak J. M., Nguyen V., Schroeder J. I. The role of reactive oxygen species in hormonal responses // *Plant Physiol.* – 2006. – **141**. – P. 323–329.
20. 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 Rac GTPase to its N-terminal extension // *Plant Cell.* – 2007. – **19**. – P. 4022–4034.
21. Zhang A., Zhang J., Ye N., Cao J., Tan M., Zhang J., Jiang M. ZmMPK5 is required for the NADPH oxidase-mediated selfpropagation of apoplastic H₂O₂ in brassinosteroid-induced antioxidant defence in leaves of maize // *J. Exp. Bot.* – 2010. – **61**. – P. 4399–4411.
22. Sagi M., Fluhr R. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases // *Plant Physiol.* – 2006. – **141**. – P. 336–340.
23. Scarpeci T. E., Zanor M. I., Carrillo N., Mueller Roeber B., Valle E. M. Generation of superoxide anion in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana* during active photosynthesis: A focus on rapidly induced genes // *Plant Mol. Biol.* – 2008. – **66**. – P. 361–378.
24. Lee K. P., Kim C., Landgraf F., Apel K. EXECUTER1- and EXECUTER2-dependent transfer of stress-related signals from the plastid to the nucleus of *Arabidopsis thaliana* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2007. – **104**. – P. 10270–10275.
25. Laloi C., Stachowiak M., Pers-Kamczyc E., Warzych E., Murgia I., Apel K. Cross-talk between singlet oxygen- and hydrogen peroxide-dependent signaling of stress responses in *Arabidopsis thaliana* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – **104**. – P. 672–677.
26. Tkachuk V. A., Tyurin-Kuzmin P. A., Belousov V. V., Vorotnikov A. V. Hydrogen peroxide as a new second messenger // *Biologicheskie membrany.* – 2012. – **29**, N 1–2. – P. 21–37. (In Russian).
27. Bienert G. P., Moller A. L., Kristiansen K. A., Schulz A., Moller I. M., Schjoerring J. K., Jahn T. P. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes // *J. Biol. Chem.* – 2007. – **282**. – P. 1183–1192.
28. Miller E. W., Dickinson B. C., Chang C. J. Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake

- to regulate downstream intracellular signaling // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2010. – **107**. – P. 15681–15686.
29. *Alscher R. G., Erturk N., Heath L. S.* Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants // *J. Exp. Bot.* – 2002. – **53**. – P. 1331–1341.
 30. *Kuzniak E., Sklodowska M.* The effect of *Botrytis cinerea* infection on the antioxidant profile of mitochondria from tomato leaves // *J. Exp. Bot.* – 2004. – **55**. – P. 605–612.
 31. *Ogawa K., Kanematsu S., Asada K.* Generation of superoxide anion and localisation of Cu/Zn-superoxide dismutase in vascular tissue of spinach hypocotyls: their association with lignification // *Plant Cell Physiol.* – 1997. – **38**. – P. 1118–1126.
 32. *Ogawa K., Kanematsu S., Asada K.* Intra and extra-cellular localization of «cytosolic» CuZn-superoxide dismutase in spinach leaf and hypocotyls // *Plant Cell Physiol.* – 1996. – **37**. – P. 790–799.
 33. *Palma J. M., Huertas E. L., Corpas F. J., Sandalio L. M., Gomez M., del Rio L. A.* Peroxisomal manganese superoxide dismutase: purification and properties of the isozyme from pea leaves // *Physiol. Plant.* – 1998. – **104**. – P. 720–726.
 34. *Petrov V. D., Breusegem F. V.* Hydrogen peroxide—a central hub for information flow in plant cells // *AoB Plants.* – 2012: pls014; doi:10.1093/aobpla/pls014.
 35. *Menshchikova E. B., Zenkov N. K.* Properties and functions of NADPH oxidases of mammals // *Uspehi Sovremennoy Biologii.* – 2006. – **126**, N 1. – P. 97–112. (In Russian).
 36. *Glyan'ko A. K., Ischenko A. A.* Structural and functional characteristics of plant NADPH oxidase: A review // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2010. – **46**. – P. 463–471.
 37. *Torres M. A., Dangl J. L., Jones J. D. G.* *Arabidopsis* gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – **99**. – P. 517–522.
 38. *Kaye Y., Golani Y., Singer Y., Leshem Y., Cohen G., Ercetin M., Gillaspay G., Levine A.* Inositol polyphosphate 5-phosphatase7 regulates the production of reactive oxygen species and salt tolerance in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* – 2011. – **157**. – P. 229–241.
 39. *Demidchik V.* Reactive oxygen species and oxidative stress in plants // *Plant Stress Physiology / Ed. S. Shabala.* – CAB International, 2012. – P. 24–58.
 40. *Marino D., Dunand C., Puppo A., Pauly N.* A burst of plant NADPH oxidases // *Trends Plant Sci.* – 2012. – **17**. – P. 9–15.
 41. *Nühse T. S., Bottrill A. R., Jones A. M. E., Peck S. C.* Quantitative phosphoproteomic analysis of plasma membrane proteins reveals regulatory mechanisms of plant innate immune responses // *Plant J.* – 2007. – **51**. – P. 931–940.
 42. *Takeda S., Gapper C., Kaya H., Bell E., Kuchitsu K., Dolan L.* Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells // *Science.* – 2008. – **319**. – P. 1241–1244.
 43. *Oda T., Hashimoto H., Kuwabara N., Akashi S., Hayashi K., Kojima C., Wong H. L., Kawasaki T., Shimamoto K., Sato M., Shimizu T.* Structure of the N-terminal regulatory domain of a plant NADPH oxidase and its functional implications // *J. Biol. Chem.* 2010. – **285**. – P. 1435–1445.
 44. *Ogasawara Y., Kaya H., Hiraoka G., Yumoto F., Kimura S., Kadota Y., Hishinuma H., Senzaki E., Yamagoe S., Nagata K., Nara M., Suzuki K., Tanokura M., Kuchitsu K.* Synergistic activation of the *Arabidopsis* NADPH oxidase AtrbohD by Ca^{2+} and phosphorylation // *J. Biol. Chem.* – 2008. – **283**. – P. 8885–8892.
 45. *Kimura S., Kaya H., Kawarazaki T., Hiraoka G., Senzaki E., Michikawa M., Kuchitsu K.* Protein phosphorylation is a prerequisite for the Ca^{2+} -dependent activation of *Arabidopsis* NADPH oxidases and may function as a trigger for the positive feedback regulation of Ca^{2+} and reactive oxygen species // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2012. – **1823**. – P. 398–405.
 46. *Zhang Y., Zhu H., Zhang Q., Maoyin L., Yan M., Wang R., Wang L., Welti R., Zhang W., Wang X.* Phospholipase Dα1 and phosphatidic acid regulate NADPH oxidase activity and production of reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal closure in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* – 2009. – **21**. – P. 2357–2377.
 47. *Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N., Miller G., Tognetti V. B., Vandepoele K., Gollery M., Shulaev V., Van Breusegem F.* ROS signaling: the new wave? // *Trends Plant Sci.* – 2011. – **16**. – P. 300–309.
 48. *Apel K., Hirt H.* Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal

- transduction // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2004. – **55**. – P. 373–399.
49. Kanesaki Y., Yamamoto H., Paithoonrangsarit K., Shoumskaya M., Suzuki I., Hayashi H., Murata N. Histidine kinases play important roles in the perception and signal transduction of hydrogen peroxide in the cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803 // *Plant J.* – 2007. – **49**, N 2. – P. 313–324.
 50. Los D. A. Sensor systems of cyanobacteria. – Moscow: Nauchnyi mir, 2010. – 218 p. (In Russian).
 51. Mur L. A. J., Kenton P., Atzorn R., Miersch O., Wasternack C. The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death // *Plant Physiol.* – 2006. – **140**. – P. 249–262.
 52. Ndamukong I., Al Abdallat A., Thurow C., Fode B., Zander M., Weigel R., Gatz C. SA-inducible Arabidopsis glutaredoxin interacts with TGA factors and suppresses JA responsive PDF1.2 transcription // *Plant J.* – 2007. – **50**. – P. 128–139.
 53. Lushchak V. I. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals // *Comparative Biochem. Physiol. Pt C.* – 2011. – **153**. – P. 175–190.
 54. Mou Z., Fan W., Dong X. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes // *Cell.* – 2003. – **113**. – P. 935–944.
 55. Miller G., Mittler R. Could plant HSFs function as hydrogen peroxide sensors? // *Ann. Bot.* – 2006. – **98**. – P. 279–288.
 56. Kotak S., Larkindale J., Lee U. von Koskull-Döring P., Vierling E., Scharf K. D. Complexity of the heat stress response in plants // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2007. – **10**. – P. 310–316.
 57. Liu H., Liao H., Charng Y. The role of class A1 heat shock factors (HSFA1s) in response to heat and other stresses in *Arabidopsis* // *Plant Cell Environ.* – 2011. – **34**. – P. 738–751.
 58. Gupta R., Luan S. Redox control of protein tyrosine phosphatases and mitogen-activated protein kinases in plants // *Plant Physiol.* – 2003. – **132**. – P. 1149–1152.
 59. Karimova F. G., Petrova N. V. Effect of H₂O₂ on tyrosine phosphorylation of pea proteins // *Russ. J. Plant Physiol.* – 2007. – **54**. – P. 322–328.
 60. Pitzschke A., Hirt H. Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species signaling in plants // *Plant Physiol.* – 2006. – **141**. – P. 351–356.
 61. Mazid M., Ahmed K. T., Mohammad F. Role of Nitric oxide in regulation of H₂O₂ mediating tolerance of plants to abiotic stress: A synergistic signalling approach // *J. Stress Physiol. Biochem.* – 2011. – **7**, N 2. – P. 34–74.
 62. Pei Z. M., Murata Y., Benning G., Thomine S., Klüsener B., Allen G. J., Grill E., Schroeder J. I. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells // *Nature.* – 2000. – **406**. – P. 731–734.
 63. Munemasa S., Hossain M. A., Nakamura Y., Mori I. C., Murata Y. The Arabidopsis calcium-dependent protein kinase, CPK6, functions as a positive regulator of methyl jasmonate signaling in guard cells // *Plant Physiol.* – 2011. – **155**. – P. 553–561.
 64. Demidchik V., Shabala S., Davies J. Spatial variation in H₂O₂ response of Arabidopsis thaliana root epidermal Ca²⁺ flux and plasma membrane Ca²⁺ channels // *Plant J.* – 2007. – **49**. – P. 377–386.
 65. Demidchik V., Cuin T. A., Svistunenko D., Smith S. J., Miller A. J., Shabala S., Sokolik A., Yurin V. Arabidopsis root K⁺ efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death // *J. Cell Sci.* – 2010. – **123**. – P. 1468–1479.
 66. Wong C. M., Cheema A. K., Zhang L., Suzuki Y. J. Protein carbonylation as a novel mechanism in redox signaling // *Circulation Res.* – 2008. – **102**. – P. 310–318.
 67. Suzuki N., Koussevitzky S., Mittler R., Miller G. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress // *Plant Cell Environ.* – 2012. – **35**. – P. 259–270.
 68. Rivero R. M., Shulaev V., Blumwald E. Cytokinin-dependent photorespiration and the protection of photosynthesis during water deficit // *Plant Physiol.* – 2009. – **150**. – P. 1530–1540.
 69. Mori I. C., Schroeder J. S. Reactive oxygen species activation of plant Ca²⁺ channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction // *Plant Physiol.* – 2004. – **135**. – P. 702–708.
 70. Zhang A., Jiang M., Zhang J., Tan M., Hu X. Mitogen-activated protein kinase is involved in

- abscisic acid-induced antioxidant defense and acts downstream of reactive oxygen species production in leaves of maize plant // *Plant Physiol.* – 2006. – **141**. – P. 475–487.
71. *Wilson I. D., Neill S. J., Hancock J. T.* Nitric oxide synthesis and signalling in plants // *Plant Cell Environ.* – 2008. – **31**. – P. 622–631.
 72. *Xu M. J., Dong J. F., Zhang X. B.* Signal interaction between nitric oxide and hydrogen peroxide in heat shock-induced hypericin production of *Hypericum perforatum* suspension cells // *Sci. China. Ser. C: Life Sci.* – 2008. – **51**. – P. 676–686.
 73. *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.
 74. *Pasqualini S., Meier S., Gehring C., Madeo L., Fornaciari M., Romano B., Ederli L.* Ozone and nitric oxide induce cGMP-dependent and -independent transcription of defence genes in tobacco // *New Phytol.* – 2009. – **181**. – P. 860–870.
 75. *Lu D., Zhang X., Jiang J., An G. Y., Zhang L. R., Song C. P.* NO may function in the downstream of H_2O_2 in ABA-induced stomatal closure in *Vicia faba* L. // *J. Plant Physiol. Mol. Biol.* – 2005. – **31**. – P. 62–70.
 76. *Zhang A., Jiang M., Zhang J., Ding H., Xu S., Hu X., Tan M.* Nitric oxide induced by hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade involved in antioxidant defense in maize leaves // *New Phytol.* – 2007. – **175**. – P. 36–50.
 77. *Viktorova L. V., Maksyutova N. N., Trifonova T. V., Andrianov V. V.* Hydrogen peroxide and nitric oxide generation induced by nitrate and nitrite operation into the apoplast of wheat leaves // *Biochemistry (Moscow)*. – 2010. – **75**. – P. 117–124.
 78. *Vital S. A., Fowler R. W., Virgen A., Gossett D. R., Banks S. W., Rodriguez J.* Opposing roles for superoxide and nitric oxide in the NaCl stress-induced upregulation of antioxidant enzyme activity in cotton callus tissue // *Environ. Exp. Bot.* – 2008. – **62**. – P. 60–68.
 79. *Reiter C. D., Teng R. J., Beckman J. S.* Superoxide reacts with nitric oxide to nitrate tyrosine at physiological pH via peroxynitrite // *J. Biol. Chem.* – 2000. – **275**. – P. 32460–32466.
 80. *Wink D. A., Hanbauer I., Krishna M. C., DeGraff W., Gamson J., Mitchell J. B.* Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1993. – **90**. – P. 9813–9817.
 81. *Neill S., Bright J., Desikan R., Hancock J., Harrison J., Wilson I.* Nitric oxide evolution and perception // *J. Exp. Bot.* – 2008. – **59**. – P. 25–35.
 82. *Besson-Bard A., Pugin A., Wendehenne D.* New insights into nitric oxide signaling in plants // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2008. – **59**. – P. 21–39.
 83. *Karpets Yu. V., Kolupaev Yu. E., Yastreb T. O.* Effect of sodium nitroprusside on heat resistance of wheat coleoptiles: dependence on the formation and scavenging of reactive oxygen species // *Russ. J. Plant Physiol.* – 2011. – **58**. – P. 1027–1033.
 84. *Glyan'ko A. K., Vasil'eva G. G., Ischenko A. A., Mironova N. V., Alekseenko A. L.* The NADPH oxidase activity of pea seedling roots in rhizobial infection depending on abiotic and biotic factors // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2010. – **46**. – P. 438–443.
 85. *Straus M. R., Rietz S., Themaat E. V. L., Bartsch M., Parker J. E.* Salicylic acid antagonism of EDS1-driven cell death is important for immune and oxidative stress responses in *Arabidopsis* // *Plant J.* – 2010. – **62**. – P. 628–640.
 86. *Piotrovskii M. S., Shevyreva T. A., Zhestkova I. M., Trofimova M. S.* Activation of plasmalemmal NADPH oxidase in etiolated maize seedlings exposed to chilling temperatures // *Rus. J. Plant Physiol.* – 2011. – **58**. – P. 290–298.
 87. *Kolupaev Yu. E., Oboznyi A. I., Shvidenko N. V.* Role of hydrogen peroxide in generation of a signal inducing heat tolerance of wheat seedlings // *Russ. J. Plant Physiol.* – 2013. – **60**. – P. 227–234.
 88. *Kolupaev Yu. Ye., Karpets Yu. V., Kosakivska I. V.* The importance of reactive oxygen species in the induction of plant resistance to heat stress // *Gen. Appl. Plant Physiol.* – 2008. – **34**, N 3–4. – P. 251–266.
 89. *Kolupaev Yu. E., Oboznyi O. I.* Participation of the active oxygen forms in the induction of ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase under heat hardening of wheat seedlings // *Ukr. Biochem. J.* – 2012. – **84**, N 6. – P. 125–132. (In Russian).

90. *Oboznyi O. I., Kolupaev Yu. E.* Participation of the enzymatic systems generating reactive oxygen species, in formation cross-tolerances of plantlets of wheat to the hyperthermia and osmotic shock // *Fiziologiya i Biokhimiya Kulturnykh Rastenii*. – 2012. – **44**, N 4. – P. 347–354. (In Russian).
91. *Jiang M., Zhang J.* Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in abscisic acid- and water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings // *Planta*. – 2002. – **215**. – P. 1022–1030.
92. *Leshem Y., Seri L., Levine A.* Induction of phosphatidylinositol 3-kinase-mediated endocytosis by salt stress leads to intracellular production of reactive oxygen species and salt tolerance // *Plant J.* – 2007. – **51**. – P. 185–197.
93. *Ma L., Zhang H., Sun L., Jiao Y., Zhang G., Miao C., Hao F.* NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF function in ROS-dependent regulation of Na⁺/K⁺ homeostasis in *Arabidopsis* under salt stress // *J. Exp. Bot.* – 2012. – **63**. – P. 305–317.
94. *Vayner A. O., Kolupaev Yu. E., Yastreba T. O.* Participation of hydrogen peroxide in induction of proline accumulation in millet plants under action of NaCl // *The Bulletin of Kharkiv National Agrarian University. Series Biology*. – 2013. – Is. 2 (29). – P. 32–38. (In Russian).
95. *Oboznyi A. I., Kolupaev Yu. E., Vayner A. A., Yastreba T. O.* The role of superoxide dismutase in inducing of wheat seedlings tolerance to osmotic shock // *J. Stress Physiol. Biochem.* – 2013. – **9**, Is. 3. – P. 251–261.
96. *Morita S., Kaminaka H., Masumura T., Tanaka K.* Induction of rice cytosolic ascorbate peroxidase mRNA by oxidative stress: the involvement of hydrogen peroxide in oxidative stress signalling // *Plant Cell Physiol.* – 1999. – **40**. – P. 417–422.
97. *Hirayama T., Shinozaki K.* You have free access to this content research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future // *Plant J.* – 2010. – **61**. – P. 1041–1052.
98. *Los D. A., Zorina A., Sinetova M., Kryazhov S., Mironov K., Zinchenko V. V.* Stress sensors and signal transducers in Cyanobacteria // *Sensors*. – 2010. – **10**. – P. 2386–2415.
99. *Bartoli C. G., Casalongue C. A., Simon-tacchia M., Marquez-Garcia B., Foyer C. H.* Interactions between hormone and redox signalling pathways in the control of growth and cross tolerance to stress // *Environ. Exp. Bot.* – 2013. – **94**. – P. 73–88.
100. *Wilkinson S., Davies W. J.* Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community // *Plant Cell Environ.* – 2010. – **33**. – P. 510–525.
101. *Xia X. J., Wang Y. J., Zhou Y. H., Tao Y., Mao W. H., Shi K., Asami T., Chen Z., Yu J. Q.* Reactive oxygen species are involved in brassinosteroid-induced stress tolerance in cucumber // *Plant Physiol.* – 2009. – **150**. – P. 801–814.
102. *Queval G., Hager J., Gakière B., Noctor G.* Why are literature data for H₂O₂ contents so variable? A discussion of potential difficulties in the quantitative assay of leaf extracts // *J. Exp. Bot.* – 2008. – **59**. – P. 135–146.
103. *Gadjev I., Vanderauwera S., Gechev T. S., Laloi C., Minkov I. N., Shulaev V., Apel K., Inzé D., Mittler R., Van Breusegem F.* Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* – 2006. – **141**. – P. 436–445.

Получено 10.12.2013