

ФІЗІОЛОГІЯ І БІОХІМІЯ РОСЛИН

УДК 581.1

ВПЛИВ ДОНОРІВ ОКСИДУ АЗОТУ НА СТАН ПРОДИХІВ РОСЛИН АРАБІДОПСИСУ, ДЕФЕКТНИХ ЗА ЖАСМОНАТНИМ І САЛІЦИЛАТНИМ СИГНАЛІНГОМ

© 2018 р. Т. О. Ястреб¹, О. І. Кокорев¹, К. М. Гавва¹,
Ю. Є. Колупаєв^{1,2}, О. П. Дмитрієв³

¹Харківський національний аграрний університет ім. В.В. Докучаєва
(Харків, Україна)

²Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна
(Харків, Україна)

³Інститут клітинної біології та генетичної інженерії
Національної академії наук України
(Київ, Україна)

Досліджували вплив донорів оксиду азоту (нітропрусиду натрію та нітриту натрію) на стан продихів рослин арабідопсису дикого типу (*Col-0*), мутантів, дефектних за жасмонатним сигналіном (*jin1*, *coi1*, *jar1*), і саліцилатдефіцитних трансформантів *NahG*. Обробка епідермісу розеткових листків донорами оксиду азоту зменшувала величину продихової апертури та кількість відкритих продихів у рослин дикого типу і у мутантів, дефектних за жасмонатним сигналіном. У трансформантів *NahG* зі знизеним вмістом саліцилової кислоти під впливом донорів NO також відзначалося зменшення продихової апертури, при цьому кількість відкритих продихів за обробки нітритом натрію була значно меншою, ніж у рослин інших генотипів. Обговорюються можливі зв'язки між сигнальними посередниками і фітогормонами при регуляції продихового апарату у рослин арабідопсису.

Ключові слова: *Arabidopsis thaliana*, мутанти *jin1*, *coi1*, *jar1*, трансформанти *NahG*, продихи, оксид азоту (NO), жасмонова кислота, жасмонатний сигналінг, саліцилова кислота

Оксид азоту (NO) є сигнальною молекулою, яка задіяна у регуляції клітинного циклу, процесів диференціації і морфогенезу (Cortois et al., 2008; Wilson et al., 2008), та індукції захисних реакцій рослин на дію стресорів різної природи (Corpas et al., 2011; Bajguz, 2014; Oz et al., 2015).

Оксид азоту бере участь в регуляції продихового апарату рослин (Desikan et al., 2002; Neill et al., 2002). Показана його здатність спричиняти закриття продихів (Desikan et al., 2002) та участь як сигнального посередника у реалізації впливу абсцизової (АБК) (Neill et al.,

2002; Scuffi et al., 2016), жасмонової (Liu et al., 2005) і саліцилової (Gayatri et al., 2013) кислот, а також екзогенного пероксиду водню (He et al., 2005) на стан продихового апарату листків. Зокрема, встановлено, що у закритті продихів, індукованому АБК, оксид азоту є однією із проміжних ланок сигнального ланцюга. Обробка АБК індукує кальцій-залежну активацію НАДФН-оксидази, що генерує активні форми кисню (АФК), утворений пероксид водню активує ферменти синтезу NO, а останній, впливаючи на стан кальцієвих каналів, спричиняє зміни іонного гомеостазу у замикаючих клітинах, що стимулює закриття продихів (Neill et al., 2008).

Також показано, що обробка метилжасмонатом листків бобів викликала активацію

Адреса для кореспонденції: Ястреб Тетяна Олегівна, Харківський національний аграрний університет ім. В.В. Докучаєва, п/в Докучаєвське-2, Харків, 62483, Україна;
e-mail: t_howk@ukr.net

ВПЛИВ ДОНОРІВ ОКСИДУ АЗОТУ НА СТАН ПРОДИХІВ

ферменту, подібного до NO-синтази тварин, і підвищення вмісту оксиду азоту у замикаючих клітинах. При цьому індуковане фітогормоном закриття продихів усувалося дією інгібітору NO-синтази N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (Liu et al., 2005). Закриття продихів, спричинюване у рослин арабідопсису дією саліцилової кислоти, залежало як від активності ферменту, подібного до NO-синтази тварин, так і від активності нітратредуктази (Hao et al., 2010).

З іншого боку, відома здатність екзогенного оксиду азоту спричиняти підвищення вмісту жасмонової і саліцилової кислот у клітинах рослин (Huang et al., 2004; Xu et al., 2006). Примітно, що білок транскрипційний фактор JIN1/MYC2 – один з ключових компонентів жасмонатного сигналіngu (Dombrecht et al., 2007), бере участь і у реалізації низки фізіологічних (стрес-протекторних) ефектів оксиду азоту (Ястреб и др., 2017).

Не виключено, що окремі фізіологічні реакції оксиду азоту можуть реалізовуватися за прямої чи опосередкованої участі жасмонової і (або) саліцилової кислот та їхніх похідних. У зв'язку з викладеним, метою роботи було порівняння реакції продихів на дію донорів оксиду азоту (нітропрусиду натрію – НПН і нітриту натрію) у рослин арабідопсису дикого типу і дефектних за жасмонатним та саліцилатним сигналіngом.

МЕТОДИКА

В експериментах використовували п'ятижизневі рослини *Arabidopsis thaliana* L. дикого типу (*Col-0*), дефектні за жасмонатним сигналіngом (*jin1* – мутант, дефектний за геном, що кодує білок транскрипційний фактор MYC2/JIN1 – один з ключових у жасмонатному сигналіngу; *jar1* – мутант за геном, що кодує JAR1-синтазу, відповідальну за утворення фізіологічно активного кон'югату жасмонової кислоти з ізолейцином, та *coil* – мутант за геном, що кодує білок COI1, який бере участь у видаленні білків-репресорів транскрипційних факторів жасмонатного сигналіngу (Колупаев и др., 2016)) і саліцилатдефіцитні – трансформовані геном *NahG*, що кодує саліцилатгидроксилазу (КФ 1.14.13.1) у бактерії *Pseudomonas putida* (Gaffney et al., 1993).

Рослини вирощували у водній культурі на живильному середовищі Хогланда з модифікаціями (Gibeaut et al., 1997) за температури 23/18°C (день/ніч), освітлення 6000 лк і фото-

періоду 10 год (Ястреб и др., 2017; Yastreb et al., 2017).

Продихову апертуру визначали за методикою, описану Ramirez et al. (2009) з модифікаціями. Епідерміс з абаксіальної поверхні розеткових листків витримували протягом 3 год на холодному білому світлі (150 Вт/м²) в чашках Петрі з 10 мМ розчином KCl, приготуванним на 10 мМ Трис-HCl буфері (pH 6,15) без CO₂ (Яковенко и др., 2008). Потім у середовище інкубації епідермісу вносили донори оксиду азоту НПН в концентраціях діапазону від 10 до 100 мкМ або нітрит натрію (від 0,5 до 2 мМ). Через 2 год інкубації визначали відсоток відкритих продихів і середню величину продихової апертури (Yastreb et al., 2017).

У кожному варіанті оцінювали стан не менш як 60 продихів на епідермісі листків, взятих з шести різних рослин. Досліди повторювали незалежно не менше трьох разів. На рисунку і в таблиці наведені середні величини та їх стандартні похибки.

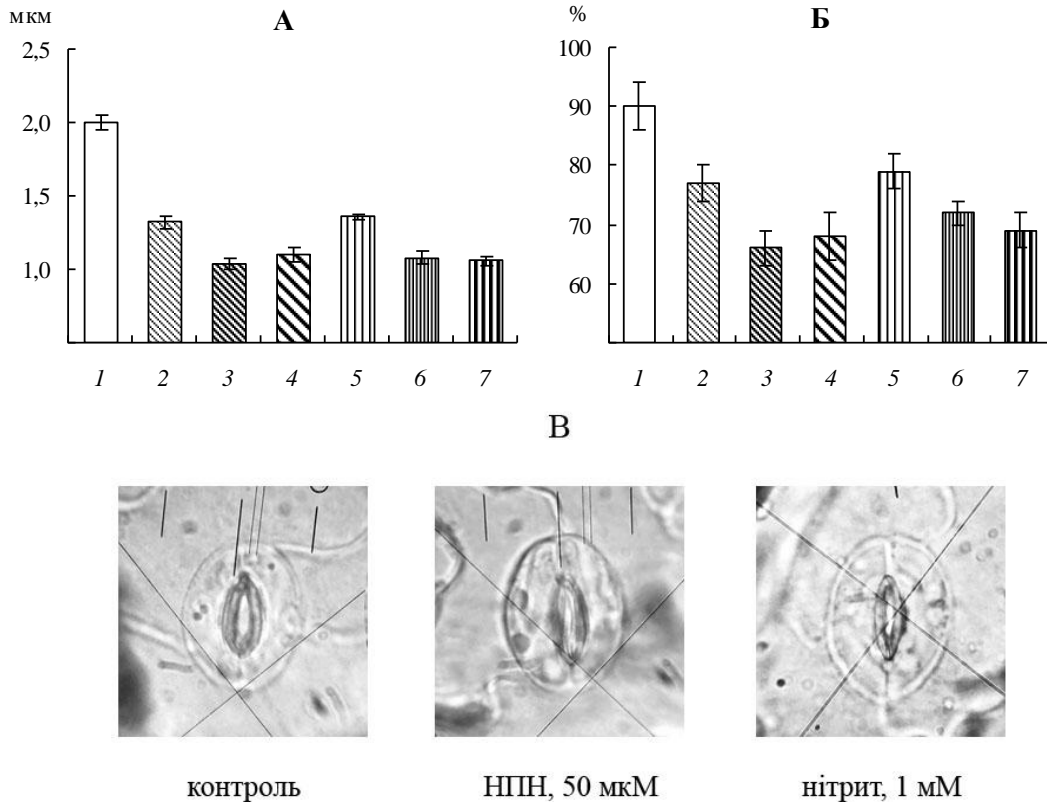
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Обробка епідермісу донором NO НПН в концентрації 10 мкМ зменшувала величину продихової апертури і відносну кількість відкритих продихів (рисунок). За підвищення концентрації до 50 мкМ ефект донора оксиду азоту посилювався, проте подальше її збільшення до 100 мкМ не призводило до посилення прояву впливу НПН на стан продихів.

Інший донор оксиду азоту, нітрит натрію, так само спричиняв збільшення кількості закритих продихів і зменшення величини продихової щільності, найбільш помітні ефекти виявлялися за його концентрацій 1 або 2 мМ (рисунок).

У наступних експериментах порівнювали вплив 50 мкМ НПН і 1 мМ нітриту натрію на стан продихового апарату рослин арабідопсису дикого типу та дефектних за жасмонатним і саліцилатним сигналіngом.

Вихідні величини апертури продихів рослин арабідопсису відрізнялися залежно від генотипу. Так, у рослин генотипів *jin1* і *jar1* після впливу світла апертура була меншою, ніж у рослин дикого типу, водночас у мутантів *coil*, навпаки, дещо більшою, ніж у *Col-0* (таблиця). У саліцилатдефіцитних трансформантів *NahG* в контролі величина апертури продихів не відрізнялася від такої у рослин дикого типу. Після впливу холодного білого світла у рослин всіх



Концентраційна залежність впливу донорів оксиду азоту на ширину (мкм) продигової щілини відкритих продигових (А) та відносну кількість (%) відкритих продигових (Б) рослин арабідопсису *Col-0*: 1 – контроль; 2 – НПН, 10 мкМ; 3 – НПН, 50 мкМ; 4 – НПН, 100 мкМ; 5 – нітрит 0,5 мМ; 6 – нітрит 1 мМ; 7 – нітрит 2 мМ. В – фото типових продигових.

п'яти генотипів майже всі продихи були у відкритому стані (таблиця).

Реакція продигового апарату рослин, дефектних за жасмонатним сигналігом, на дію двох донорів оксиду азоту була схожою на реакцію рослин *Col-0*: в усіх випадках спостерігалася достовірне при $P \leq 0,05$ зменшення величини продигової апертури (таблиця). Також за дії НПН і нітриту натрію відзначалося зменшення відносної кількості відкритих продигових до 71-79%.

У саліцилатдефіцитних трансформантів *NahG* під впливом обох донорів NO помітно зменшувалася ширина продигової щілини (таблиця). При цьому за дії НПН відносна кількість відкритих продигових зменшувалася до 75%, а під впливом нітриту натрію це зниження було більш істотним (до 55%).

Таким чином, білки JIN1/MYC2, COI1 і JAR1, задіяні у жасмонатному сигналігу, напевно, не причетні до реалізації впливу екзогенного оксиду азоту на стан продигових, оскільки реакція продигового апарату мутантів *jin1*, *coil* і *jar1* на обробку епідермісу донорами NO не відрізнялася від такої у рослин дикого типу.

Як уже зазначалося, в літературі є відомості про здатність метилжасмонату індукувати утворення NO (Munemasa et al., 2011). Також повідомляється про пригнічення спричиненого метилжасмонатом закриття продигових у бобів дією скавенджеру оксиду азоту РТЮ (від 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide) та інгібітору NO-синтази L-NAME у бобів (Liu et al., 2005). З іншого боку, є дані про здатність екзогенного оксиду азоту індукувати синтез жасмонової кислоти у рослин арабідопсису (Huang et al., 2004). Проте, ймовірно, за умов наших експериментів донори оксиду азоту чинили вплив на стан продигових, не пов'язаний з синтезом жасмонату або ж з участю білків жасмонатного сигналігу, і такий вплив не відрізнявся у рослин дикого типу та мутантів *jin1*, *coil* і *jar1*.

Можна припустити, що у реалізації впливу оксиду азоту на апертуру продигових не бере участь і ендогенна саліцилова кислота. Так, в наших експериментах від впливом НПН і нітриту натрію величина продигової щілини у саліцилатдефіцитних рослин *NahG* зменшувалася практично так само, як і у рослин дикого типу

ВПЛИВ ДОНОРІВ ОКСИДУ АЗОТУ НА СТАН ПРОДИХІВ

Вплив донорів оксиду азоту на стан продихів рослин арабідопсису різних генотипів

Генотип	Контроль		НПН, 50 мкМ		NaNO ₂ , 1 мМ	
	Ширина продихової щілини, мкм	Кількість відкритих продихів, %	Ширина продихової щілини, мкм	Кількість відкритих продихів, %	Ширина продихової щілини, мкм	Кількість відкритих продихів, %
<i>Col-0</i>	2,06±0,04	93±2	1,30±0,05	70±2	1,35±0,04	73±3
<i>jin1</i>	1,33±0,06	100	0,80±0,02	75±3	0,85±0,05	71±1
<i>coi1</i>	2,46±0,06	97±1	1,46±0,04	77±3	1,49±0,03	79±3
<i>jar1</i>	1,74±0,04	93±2	1,17±0,06	74±2	1,02±0,04	74±2
<i>NahG</i>	1,98±0,06	95±2	1,22±0,04	75±2	1,34±0,06	55±2

(таблиця). Відносна кількість відкритих продихів в епідермісі трансформантів *NahG* за дії донорів NO також зменшувалася. Проте вплив нітриту натрію на цей показник саме у саліцилатдефіцитних трансформантів був більш помітним, ніж дія НПН. Пояснити цей ефект поки що складно. Не виключено, що саліцилова кислота опосередковано задіяна у регуляції продихового апарату за впливу нітриту як одного із джерел утворення оксиду азоту. Як відомо, утворення оксиду азоту з нітриту каталізується нітратредуктазою у НАДФН-залежній реакції (Neill et al., 2003). Ще одним джерелом монооксиду азоту у рослинних клітинах може бути виявлена в плазмалемі нітриг-NO-редуктаза. Цей фермент, на відміну від нітратредуктази, як кофактор використовує не НАДФН, а цитохром *c* як донор електронів, і функціонує у порівняно вузькому діапазоні рН (Neill et al., 2008). Не виключено, що активність вказаних ферментів або стан їх кофакторів залежать від саліцилатного статусу рослинних клітин. З іншого боку, відомо, що екзогенна саліцилова кислота здатна спричинити закриття продихів з участю NO, утворюваного як у реакціях окиснення L-аргініну, так і у реакціях відновлення нітрату-нітриту (НАО et al., 2010). Таким чином, питання про причину більш помітного індукування закриття продихів нітритом у саліцилатдефіцитних рослин залишається відкритим.

В цілому, можна стверджувати, що за умов наших експериментів донори оксиду азоту чинили вплив на стан продихів, не пов'язаний прямо з жасмонатним або саліцилатним сигналігом, і такі ефекти майже не відрізнялися у рослин дикого типу, саліцилатдефіцитних трансформантів та мутантів, дефектних за різними генами жасмонатного сигналігу.

ЛІТЕРАТУРА

Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О., Луговая А.А. Роль жасмонатов в адаптации растений к действию абиотических стрессоров // Физиология растений и генетика. – 2016. – Т. 48, № 2. – С. 105-121.

Яковенко О.Н., Кретинин С.В., Кабачевская Е.М., Ляхнович Г.В., Волотовский Д.И., Кравец В.С. Роль фосфолипазы *C* в регуляции устьичного аппарата абсцизовой кислотой // Укр. бот. журн. – 2008. – Т. 65, № 4. – С. 604-613.

Ястреб Т.О., Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В., Дмитриев А.П. Действие донора оксида азота на солеустойчивость растений арабидопсиса дикого типа и мутантов *jin1* // Физиология растений. – 2017. – Т. 64, № 2. – С. 142-150.

Vajguz A. Nitric Oxide: role in plants under abiotic stress // Physiological Mechanisms and Adaptation Strategies in Plants Under Changing Environment / Eds. P. Ahmad, M.R. Wani. – New York: Springer Science+Business Media, 2014. – V. 2. – P. 137-159.

Corpas F.J., Leterrier M., Valderrama R., Airaki M., Chaki M., Palma J.M., Barroso J.B. Nitric oxide imbalance provokes a nitrosative response in plants under abiotic stress // Plant Sci. – 2011. – V. 181. – P. 604-611.

Courtois C., Besson A., Dehan J., Bourque S., Dobrowolska G., Pugin A., Wendehenne D. Nitric oxide signalling in plants: interplays with Ca²⁺ and protein kinases // J. Exp. Bot. – 2008. – V. 59. – P. 155-163.

Desikan R., Griffiths R., Hancock J., Neill S. A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2002. – V. 99. – P. 16314-16318.

Dombrecht B., Xue G.P., Sprague S.J., Kirkegaard J.A., Ross J.J., Reid J.B., Fitt G.P., Sewelam N., Schenk P.M., Manners J.M., Kazan K. MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis* // Plant Cell. – 2007. – V. 19. – P. 2225-2245.

Gaffney T., Friedrich L., Vernooij B., Negrotto D., Nye G., Uknes S., Ward E., Kessmann H., Ryalsm J. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance // Science. – 1993. – V. 261. – P. 754-756.

Gayatri G., Agurla S., Raghavendra A.S. Nitric oxide in guard cells as an important secondary messenger

- during stomatal closure // *Front. Plant Sci.* – 2013. – V. 4:425.
- Gibeaut D.M., Hulett J., Cramer G.R., Seemann J.R. Maximal biomass of *Arabidopsis thaliana* using a simple, low-maintenance hydroponic method and favorable environmental conditions // *Plant Physiol.* – 1997. – V. 115. – P. 317-319.
- Hao F., Zhao S., Dong H., Zhang H., Sun L., Miao C. *Nia1* and *Nia2* are involved in exogenous salicylic acid-induced nitric oxide generation and stomatal closure in *Arabidopsis* // *J. Integr. Plant Biol.* – 2010. – V. 52. – P. 298-307.
- He J.M., Xu H., She X.P., Song X.G., Zhao W.M. The role interrelationship of hydrogen peroxide and nitric oxide in the UV-B-induced stomatal closure in broad bean // *Function. Plant Biol.* – 2005. – V. 32. – P. 237-247.
- Huang X., Stettmaier K., Michel C., Hutzler P., Mueller M.J., Durner J. Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signaling in *Arabidopsis thaliana* // *Planta.* – 2004. – V. 218. – P. 938-946.
- Liu X., Shi W., Zhang S., Lou C. Nitric oxide involved in signal transduction of jasmonic acid-induced stomatal closure of *Vicia faba* L. // *Chinese Sci. Bull.* – 2005. – V. 50, № 6. – P. 520-525.
- Munemasa S., Mori I.C., Murata Y. Methyl jasmonate signaling and signal crosstalk between methyl jasmonate and abscisic acid in guard cells // *Plant Signal. Behav.* – 2011. – V. 6:7. – P. 939-941.
- Neill S.J., Desikan R., Clarke A., Hancock J.T. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells // *Plant Physiol.* – 2002. – V. 128. – P. 13-16.
- Neill S.J., Desikan R., Hancock J.T. Nitric oxide signaling in plants // *New Phytol.* – 2003. – V. 159. – P. 11-35.
- Neill S., Barros R., Bright J., Desikan R., Hancock J., Harrison J., Morris P., Ribeiro D., Wilson I. Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress // *J. Exp. Bot.* – 2008. – V. 59. – P. 165-176.
- Oz M.T., Eyidogan F., Yucel M., Oktem H.A. Functional role of nitric oxide under abiotic stress conditions // *Nitric Oxide Action in Abiotic Stress Responses in Plants* / Eds. M.N. Khan, M. Mobin, F. Mohammad, F.J. Corpas – Heidelberg, New York, Dordrecht, London, 2015. – P. 21-42.
- Ramírez V., Coego A., López A., Agorio A., Flors V., Vera P. Drought tolerance in *Arabidopsis* is controlled by the OCP3 disease resistance regulator // *Plant J.* – 2009. – V. 58. – P. 578-591.
- Scuffi D., Lamattina L., Garcia-Mata C. Decoding the interaction between nitric oxide and hydrogen sulfide in stomatal movement // *Gasotransmitters in Plants, Signaling and Communication in Plants* / Eds. L. Lamattina, C. Garcia-Mata. – Springer International Publishing Switzerland, 2016. – P. 271-288.
- Wilson I.D., Neill S.J., Hancock J.T. Nitric oxide synthesis and signaling in plants // *Plant Cell Environ.* – 2008. – V. 31. – P. 622-631.
- Xu M., Dong J., Zhu M. Nitric oxide mediates the fungal elicitor-induced puerarin biosynthesis in *Pueraria thomsonii* Benth. suspension cells through a salicylic acid (SA)-dependent and jasmonic acid (JA)-dependent signal pathway // *Sci. China. Ser. C: Life Sci.* – 2006. – V. 49. – P. 379-389.
- Yastreba T.O., Kolupaev Yu.E., Lugovaya A.A., Dmitriev A.P. Formation of adaptive reactions in *Arabidopsis thaliana* wild-type and mutant *jin1* plants under action of abscisic acid and salt stress // *Cytol. Genet.* – 2017. – V. 51. – P. 325-330.

Надійшла до редакції
10.01.2018 р.

INFLUENCE OF NITRIC OXIDE DONORS ON STATE OF STOMATA IN ARABIDOPSIS PLANTS, DEFECTIVE IN JASMONATE AND SALICYLATE SIGNALING

T. O. Yastreba¹, A. I. Kokorev¹, E. N. Gavva¹, Yu. E. Kolupaev^{1,2}, A. P. Dmitriev³

¹*Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University
(Kharkiv, Ukraine)*

E-mail: t_howk@ukr.net

²*Karazin Kharkiv National University
(Kharkiv, Ukraine)*

³*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering
of National Academy of Sciences of Ukraine
(Kyiv, Ukraine)*

Effect of nitric oxide donors (sodium nitroprusside and sodium nitrite) on the state of stomata of *Arabidopsis* wild-type plants (*Col-0*), mutants defective in jasmonate signaling (*jin1*, *coi1*, *jar1*) and salicylate-deficient *NahG* transformants was studied. Treatment of rosette leaves epidermis by nitric

ВПЛИВ ДОНОРІВ ОКСИДУ АЗОТУ НА СТАН ПРОДИХІВ

oxide donors caused a decrease in stomata aperture size and an amount of open stomata in both wild-type plants and mutants defective in jasmonate signaling. NO donors-treated *NahG* transformants with a reduced salicylic acid have also showed a decrease in stomata aperture size. However, the number of open stomata in sodium nitrite-treated transformants was significantly less than that in plants of other genotypes. Possible cross-talks in between of signal mediators and plant hormones at regulation of the stomatal apparatus in plants of *Arabidopsis* are discussed.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, mutants *jin1*, *coi1*, *jar1*, transformants *NahG*, stomata, nitric oxide (NO), jasmonic acid, jasmonate signaling, salicylic acid

ВЛИЯНИЕ ДОНОРОВ ОКСИДА АЗОТА НА СОСТОЯНИЕ УСТЬИЦ РАСТЕНИЙ АРАБИДОПСИСА, ДЕФЕКТНЫХ ПО ЖАСМОНАТНОМУ И САЛИЦИЛАТНОМУ СИГНАЛИНГУ

Т. О. Ястреб¹, А. И. Кокорев¹, Е. Н. Гавва¹, Ю. Е. Колупаев^{1,2}, А. П. Дмитриев³

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

E-mail: t_howk@ukr.net

²Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина
(Харьков, Украина)

³Институт клеточной биологии и генетической инженерии
Национальной академии наук Украины
(Киев, Украина)

Исследовали влияние доноров оксида азота (нитропруссид натрия и нитрита натрия) на состояние устьиц растений арабидопсиса дикого типа (*Col-0*), мутантов, дефектных по жасмонатному сигналингу (*jin1*, *coi1*, *jar1*), и салицилатдефицитных трансформантов *NahG*. Обработка эпидермиса розеточных листьев донорами оксида азота уменьшала величину устьичной апертуры и количество открытых устьиц у растений дикого типа и у мутантов, дефектных по жасмонатному сигналингу. У трансформантов *NahG* с пониженным содержанием салициловой кислоты под влиянием доноров NO также отмечалось уменьшение устьичной апертуры, при этом количество открытых устьиц при обработке нитритом натрия было значительно меньшим, чем у растений других генотипов. Обсуждаются возможные связи между сигнальными посредниками и фитогормонами при регуляции устьичного аппарата у растений арабидопсиса.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, мутанты *jin1*, *coi1*, *jar1*, трансформанты *NahG*, устьица, оксид азота (NO), жасмоновая кислота, жасмонатный сигналинг, салициловая кислота