

РОЛЬ ЖАСМОНАТА И ОКСИДА АЗОТА (NO) В ИНДУЦИРОВАНИИ ЗАКРЫВАНИЯ УСТЬИЦ У РАСТЕНИЙ *ARABIDOPSIS THALIANA*

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

¹Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева, Харьков, Украина, plant_biology@ukr.net

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

³Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, Украина, dmitriev.ap@gmail.com

Аннотация. Исследовали влияние метилжасмоната (МЖ), доноров и антагонистов оксида азота (NO) на состояние устьиц у растений *Arabidopsis thaliana* дикого типа (*Col-0*) и мутантов, дефектных по жасмонатному сигналингу (*jin1* и *coil*). Обработка эпидермиса листьев растворами МЖ вызывала уменьшение числа открытых устьиц и размеров устьичной апертуры только у растений дикого типа. У мутантов *jin1* и *coil* при действии МЖ эти показатели практически не изменялись. Влияние МЖ на состояние устьиц у растений *Col-0* практически полностью устранялось предварительной обработкой эпидермиса скавенджером оксида азота РТЮ и частично воздействием ингибиторов NO-синтазы животных (L-NAME) и нитратредуктазы (вольфрамата натрия). Доноры оксида азота (нитропруссид натрия, L-аргинин и нитрит натрия) уменьшали количество открытых устьиц и размер устьичной щели у растений всех исследуемых генотипов. Таким образом, NO задействован в реализации физиологических эффектов МЖ, а различные доноры оксида азота могут индуцировать закрытие устьиц независимо от восприятия жасмонатного сигнала.

Ключевые слова: метилжасмонат, оксид азота, устьица, *Arabidopsis thaliana*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-850-854

В формировании реакции замыкающих клеток на изменение условий окружающей среды задействованы фитогормоны и сигнальные посредники. В этом отношении наиболее изучена роль абсцизовой кислоты (АБК). В последнее десятилетие значительное внимание уделяется и функциям жасмоновой кислоты и ее производных [Munemasa et al., 2011]. Показано, что жасмоновая кислота может влиять на состояние устьиц зависимым и независимым от АБК способами [de Ollas, Dodd, 2016].

Одна из функций оксида азота в стрессовых условиях – участие в регуляции устьичного аппарата растений. Показана его способность вызывать закрытие устьиц [Desikan et al., 2002] и выступать в роли сигнального посредника в реализации действия абсцизовой [Scuffi et al., 2016] и жасмоновой [Liu et al., 2005] кислот на состояние устьичного аппарата листьев. В частности, установлено, что при закрытии устьиц, индуцированном метилжасмонатом (МЖ), оксид азота является одним из промежуточных звеньев сигнальной цепи [Liu et al., 2005].

Целью работы было выяснить участие ферментативных систем, синтезирующих NO, в реализации действия МЖ на состояние устьичного аппарата, а также оценить влияние на него различных источников оксида азота у растений арабидопсиса дикого типа и дефектных по жасмонатному сигналингу.

В экспериментах использовали пятидневные растения *Arabidopsis thaliana* L. дикого типа (*Col-0*) и дефектных по жасмонатному сигналингу (*jin1* и *coil*), которые выращивали в водной культуре на среде Хогланда с модификациями при температуре 24/18°C (день/ночь), освещении 6000 лк и фотопериоде 10 ч [Ястреб и др., 2017]. Устьичную апертуру определяли по методике, описанной Ramirez et al. [2009]. Для достижения эффекта открывания устьиц эпидермис с абаксиальной поверхности розеточных листьев выдерживали в течение 2,5 ч на холодном белом свете (8000 лк) в чашках Петри с 10 mM раствором KCl, приготовленном на 10 mM Трис-HCl буфере (pH

6,15) без CO₂. После этого в среду вносили МЖ в конечных концентрациях от 10 до 400 мкМ и через 2,5 ч измеряли устьичную апертуру и процент открытых устьиц. При исследовании влияния антагонистов NO на проявление эффектов МЖ в среду инкубации эпидермиса за 1 ч до внесения МЖ добавляли скарвенджер NO 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (PTIO – 200 мкМ), ингибитор NO-синтазы животных N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME – 1 мМ) или ингибитор нитратредуктазы (вольфрамат натрия – 200 мкМ).

В отдельной серии экспериментов оценивали влияние на состояние устьичного аппарата потенциальных доноров оксида азота – нитропруссид натрия (НПН), нитрита натрия и L-аргинина в концентрациях от 0,5 до 2 мМ. Экспозиция эпидермиса листьев на среде с добавлением указанных соединений составляла 2,5 ч.

Инкубация эпидермиса розеточных листьев арабидопсиса дикого типа в среде, содержащей МЖ, вызывала уменьшение величины устьичной апертуры, пропорциональное концентрации фитогормона (табл. 1). Максимальный эффект достигался при использовании 200 и 400 мкМ МЖ. Под влиянием этих концентраций уменьшалось и относительное число открытых устьиц (табл. 1).

Таблица 1.

Концентрационная зависимость действия метилжасмоната на состояние устьиц у растений арабидопсиса дикого типа

Концентрация, мкМ	Ширина устьичной апертуры, мкм	Число открытых устьиц, %
Контроль	2,63 ± 0,07	92,4 ± 3,2
10	2,36 ± 0,12	100
50	1,48 ± 0,12	93,0 ± 3,0
200	1,05 ± 0,10	71,3 ± 3,3
400	0,97 ± 0,09	68,2 ± 3,4

У растений генотипов *coi1* и *jin1* при обработке МЖ количество открытых устьиц оставалось близким к 100%, достоверно не менялась и величина апертуры устьичной щели (результаты не приведены).

Скарвенджер оксида азота PTIO практически полностью устранял эффект уменьшения апертуры устьиц у МЖ-обработанных растений дикого типа (табл. 2). Этот антагонист NO нивелировал и происходящее под влиянием МЖ уменьшение числа открытых устьиц. Нивелирование проявления эффекта МЖ на величину устьичной апертуры происходило также под влиянием ингибитора NO-синтазы животных (L-NAME) и ингибитора нитратредуктазы (вольфрамата натрия) (табл. 2). Обработка L-NAME частично, а вольфраматом натрия практически полностью снимала влияние МЖ на число открытых устьиц.

Таблица 2.

Действие метилжасмоната и антагонистов NO на устьичный аппарат растений арабидопсиса дикого типа

Вариант	Ширина устьичной апертуры, мкм	Число открытых устьиц, %
Контроль	2,58 ± 0,08	94 ± 2,8
МЖ (200 мкМ)	1,05 ± 0,05	72 ± 2,5
МЖ (200 мкМ) + PTIO (200 мкМ)	2,41 ± 0,11	91 ± 3,0
МЖ (200 мкМ) + L-NAME (1 мМ)	1,38 ± 0,06	84 ± 2,0
МЖ (200 мкМ) + вольфрамат (200 мкМ)	1,54 ± 0,08	91 ± 2,5

Известна способность экзогенного оксида азота повышать содержание жасмоновой кислоты в клетках растений [Huang et al., 2004]. Показано, что транскрипционный фактор JIN1/MYC2 – один из ключевых компонентов жасмонатного сигналинга [Dombrecht et al., 2007] – участвует и в реализации ряда физиологических (стресс-протекторных) эффектов оксида азота [Ястреб и др., 2017]. Не исключено, что отдельные физиологические реакции NO могут реализовываться с прямым или опосредованным участием жасмоновой кислоты или ее производных. В связи с этим мы сравнили реакции устьиц на действие доноров NO (НПН и нитрита натрия) у растений арабидопсиса дикого типа и дефектных по жасмонатному сигналингу.

Обработка эпидермиса розеточных листьев НПН уменьшала величину устьичной апертуры и число открытых устьиц у растений дикого типа и обоих мутантов, дефектных по жасмонатному сигналингу (табл. 3). Полученные результаты свидетельствуют, что белки JIN1/MYC2 и COI1, задействованные в жасмонатном сигналинге, по-видимому, не причастны к реализации влияния экзогенного NO на состояние устьиц.

Таблица 3.

Влияние доноров оксида азота на состояние устьиц у растений арабидопсиса различных генотипов

Генотип	Контроль		НПН, 0,5 мМ	
	Ширина устьичной щели, мкм	Число открытых устьиц, %	Ширина устьичной щели, мкм	Число открытых устьиц, %
<i>Col-0</i>	2,06±0,04	93±2	1,30±0,05	70±2
<i>jin1</i>	1,33±0,06	100	0,80±0,02	75±3
<i>coi1</i>	2,46±0,06	97±1	1,46±0,04	77±3

В следующей серии экспериментов исследовали влияние обработки эпидермиса розеточных листьев потенциальными естественными источниками NO: L-аргинином и нитритом. Оба соединения в концентрациях 0,5–2,0 мМ вызывали уменьшение устьичной апертуры (табл. 4). При этом эффект нитрита оказался более заметным. L-аргинин и нитрит в концентрациях 1 и 2 мМ вызывали также уменьшение относительного числа открытых устьиц (табл. 4).

Таблица 4.

Концентрационная зависимость влияния L-аргинина и нитрита натрия на состояние устьиц у растений арабидопсиса дикого типа

Вариант	Ширина устьичной щели, мкм	Число открытых устьиц, %
Контроль	2,46 ± 0,08	93 ± 3,0
Аргинин, 0,5 мМ	2,10 ± 0,05	93 ± 3,0
Аргинин, 1 мМ	1,77 ± 0,09	82 ± 2,0
Аргинин, 2 мМ	1,81 ± 0,09	80 ± 2,5
NaNO ₂ , 0,5 мМ	1,67 ± 0,08	85 ± 2,5
NaNO ₂ , 1 мМ	1,43 ± 0,07	78 ± 3,2
NaNO ₂ , 2 мМ	1,41 ± 0,09	78 ± 3,3

Влияние L-аргинина на состояние устьичного аппарата подавлялось ингибитором NO-синтазы животных (L-NAME). В свою очередь, действие нитрита на величину устьичной апертуры и число открытых устьиц нивелировалось предварительной инкубацией эпидермиса в присутствии ингибитора нитратредуктазы (вольфрамата натрия) (результаты не приведены). Полученные результаты свидетельствуют о

возможности закрывания устьиц с участием NO, образующегося различными путями:: при окислении L-аргинина и при восстановлении нитрита.

Таким образом, оксид азота, образующийся, по-видимому, за счет как минимум двух различных механизмов, является необходимым сигнальным посредником в реализации устьичных эффектов МЖ. Образование NO по пути окисления L-аргинина и восстановления нитрата/нитрита может быть критически важным для формирования устьичных реакций, что показано также с использованием молекулярно-генетических методов [He et al., 2013]. При этом нельзя исключить вклад в регуляцию устьичного аппарата и других (минорных) путей синтеза оксида азота, например, реакций, катализируемых нитрит-NO-редуктазой плазматической мембраны, ксантиноксидоредуктазой пероксисом, а также процесса окисления полиаминов с помощью Cu-аминоксидазы [Глянько и др., 2013]. Однако выяснение их возможной роли в образовании NO при реализации физиологических эффектов жасмонатов и других фитогормонов нуждается в проведении дополнительных исследований.

Литература

Глянько А.К. Инициация синтеза оксида азота (NO) в корнях этиолированных проростков гороха (*Pisum sativum* L.) под влиянием N-соединений // Биохимия. – 2013. – Т. 78. – С. 520–526.

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. – С. 142–150.

de Ollas C., Dodd I.C. Physiological impacts of ABA–JA interactions under water-limitation // Plant Mol. Biol. – 2016. – V. 91. – P. 641–650.

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.

He J.M., Ma X.G., Zhang Y., Sun T.F., Xu F.F., Chen Y.P., Liu X., Yue M., Role and interrelationship of Gα protein, hydrogen peroxide, and nitric oxide in ultraviolet B-induced stomatal closure in *Arabidopsis* leaves // Plant Physiol. – 2013. – V. 161. – P. 1570–1583.

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 – 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. – P. 939–941.

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, L. Lamattina, C. Garcia-Mata (eds.). – Springer International Publishing Switzerland, 2016. – P. 271–288.

ROLE OF JASMONATE AND NITRIC OXIDE- INDUCED OF STOMATA CLOSURE IN *ARABIDOPSIS THALIANA*

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

¹Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University, Kharkiv, Ukraine,
plant_biology@ukr.net

²Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

³Institute of cell biology and genetic engineering of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine,
dmitriev.ap@gmail.com

Abstract. The effects of methyl jasmonate (MJ), donors and antagonists of nitric oxide (NO) on stomata of *Arabidopsis thaliana* wild-type (*Col-0*) and mutants defective in jasmonate signaling (*jin1* and *coi1*) were studied. Treatment of leaves epidermis with MJ solutions decreased the opened stomata number and the size of stomatal aperture only in wild-type plants. In MJ-treated *jin1* and *coi1* mutants these parameters were not practically change. The MJ effects on stomata closure in *Col-0* plants were almost completely eliminated by preliminary epidermis treatment with nitric oxide scavenger PTIO and partly with inhibitors of animal NO-synthase (L-NAME) and nitrate reductase (sodium tungstate). Nitric oxide donors (sodium nitroprusside, L-arginine and sodium nitrite) reduced the number of opened stomata and the size of stomatal aperture. The data obtained suggest that NO is involved in realization of MJ physiological effects and various NO donors could induce the stomatal closure.

Keywords: methyl jasmonate, nitric oxide, stomata, *Arabidopsis thaliana*