

<https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.08.066>

УДК 576.31:58.036.1

**С.Г. Плоховська, А.І. Ємець, Я.Б. Блюм**

ДУ “Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України”, Київ

E-mail: svetaplohovska@gmail.com

## **Залучення оксиду азоту до відповіді мікротрубочок рослинної клітини на дію високої температури**

*Представлено академіком НАН України Я.Б. Блюмом*

*Досліджено вплив донора (нітропрусид натрію (SNP)) і скавенджера (карбокси-2-феніл-4,4,5,5-тетраметилімідазолін-1-оксил-3-оксид (сРТІО)) оксиду азоту (NO) на теплостійкість проростків *Arabidopsis thaliana* за участю мікротрубочок як важливого посередника в реалізації дії високої температури на рослинну клітину. Експозиція проростків при температурі 41 °С призводила до значних змін вихідної організації мікротрубочок, що проявлялись в їх деполімеризації та фрагментації. Показано, що застосування донора оксиду азоту SNP за умов теплового стресу, яке має спричиняти підвищення рівня ендогенного NO, сприяє збереженню структурної цілісності мікротрубочок під дією високої температури, тоді як використання скавенджера оксиду азоту сРТІО зумовлює зворотні ефекти. Встановлені закономірності змін організації мікротрубочок можуть розглядатися як важливий елемент внутрішньоклітинних механізмів інгібування росту головного кореня під впливом високих температур і відновлення цих процесів шляхом індукції внутрішньоклітинних сигнальних шляхів за участю NO.*

**Ключові слова:** мікротрубочки, тепловий стрес, оксид азоту (NO), донор NO, нітропрусид натрію, скавенджер NO, сРТІО.

За останні роки отримано результати, на підставі яких можна стверджувати, що оксид азоту (NO) є внутрішньоклітинною сигнальною молекулою, за допомогою якої регулюються фізіологічні процеси на всіх етапах життєвого циклу рослин. Оксид азоту регулює проростання насіння, ріст бічних коренів і кореневих волосків, цвітіння і дозрівання плодів, а також бере участь у формуванні системи захисту від різноманітних абіотичних стресів і усуненні наслідків деяких з них [1, 2]. NO відіграє важливу роль у опосередкуванні реакцій на такі стресові фактори, як засолення, посуха, низькі та високі температури, важкі метали, УФ випромінювання та ін. [3, 4]. Температура є одним з основних фізичних параметрів, що впливає на життя на Землі. Зокрема, показано, що у відповідь на тепловий стрес зростає внутрішньоклітинний вміст NO у різних видів рослин [5]. Використання донора NO нітропрусиду натрію (SNP), Fe(III) і підкисленого нітриту сприяє зниженню термоінгібування

Цитування: Плоховська С.Г., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Залучення оксиду азоту до відповіді мікротрубочок рослинної клітини на дію високої температури. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2020. № 8. С. 66–72. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.08.066>

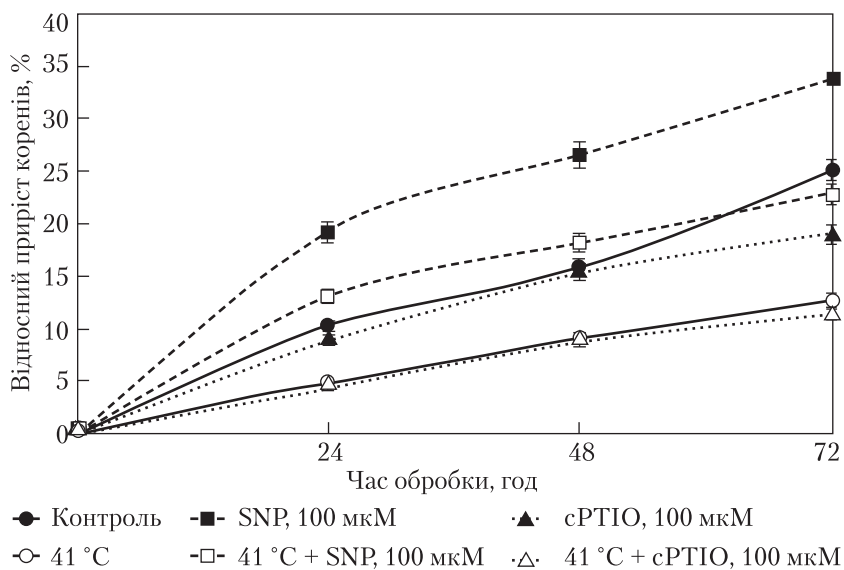
росту *Lactuca sativa*, а за умов дії скавенджера NO (сРТІО) відбувається зворотний процес [6]. Під впливом SNP різко збільшується термотолерантність і виживаність проростків рису (*Oryza sativa*) при температурі 50 °C [7]. Раніше нами було встановлено функціональний взаємозв'язок між дією холоду (0,5 °C) на морфологію та ріст головного кореня проростків *Arabidopsis thaliana* і прижиттєвими змінами організації актинових філаментів у різних типах клітин кореня під впливом холодового фактору [8].

Відповідним чином високі температури впливають і на іншу важливу складову цитоскелета рослин — мікротрубочки, змінюючи їх організацію як в інтерфазних клітинах, так і в клітинах, що діляться [9]. Тим часом сигнальні механізми сприйняття і шляхи передачі сигналу NO за участю мікротрубочок у клітинах рослин під час дії високих температур, тобто залучення NO до цього процесу як сигнальної молекули, раніше не вивчалися. Тому ми ставили за мету дослідження закономірностей впливу теплового шоку (високої температури) на організацію мікротрубочок рослинної клітини, а також залежності цього процесу від дії донора/скавенджера NO задля розробки способу підвищення стійкості рослин до зазначеного стресового фактору.

**Матеріали та методи.** Експерименти проводили на чотириденних проростках лінії *A. thaliana* (L.) Heynh., яка експресує химерний ген *gfp-map4*, що дає змогу візуалізувати мікротрубочки в живих клітинах цієї лінії. Пророщування насіння, оцінку впливу високих температур на ріст і морфологію коренів, статистичну обробку даних проводили за описаними нами раніше методиками [10]. Як модулятор вмісту оксиду азоту використовували екзогенний донор NO нітропрурид натрію (SNP) (“Sigma”, США) і скавенджер NO карбокси-2-феніл-4,4,5,5-тетраметилімідазолін-1-оксил-3-оксид (сРТІО) (“Sigma”, США), які розчиняли в дистильованій воді безпосередньо перед початком експерименту і доводили до концентрації 100 мкМ. Для вивчення комбінованої дії модуляторів вмісту NO і високої температури (41 °C) корені попередньо обробляли водними розчинами SNP та сРТІО протягом 1 год і переносили на поверхню агаризованого середовища, аналогічного за складом тому, на якому відбувалося пророщування насіння.

Організацію мікротрубочок у клітинах кореня *A. thaliana* досліджували за допомогою лазерного сканувального конфокального мікроскопа LSM 510 META (“Carl Zeiss”, Німеччина). Для отримання тривимірного зображення використовували аргонівий лазер з довжиною хвилі 488 нм, роздільний фільтр HFT 405/488, емісійний фільтр BP 505–530, об'єктиви Plan Arochromat 40x/1.4 DIC та 60x/1.4 Oil DIC. Усі дослідження проводили не менше ніж у трьох повторях. Статистичну обробку даних здійснювали за критерієм Стьюдента (*T*-test) ( $p \leq 5\%$ ).

**Результати досліджень та їх обговорення.** Згідно з результатами досліджень, експозиція проростків коренів *A. thaliana* при температурі 41 °C призводить до змін параметрів росту коренів, спричиняючи інгібування цього процесу. Так, через 24 год інтенсивність росту головного кореня зменшувалася приблизно в 2,4 раза, через 48 год — в 1,7 раза, а через 72 год — в 1,9 раза порівняно з контрольними проростками, які росли при температурі 23 °C. Результати як одержаних, так і попередніх спостережень свідчать про те, що обробки проростків *A. thaliana* SNP (100 мкМ) протягом 1 год достатньо для прояву його ефекту [11, 8]. Стимуляторний вплив цього донора NO на ріст коренів виявлено як у контролі, так і у разі його комбінованої дії з високою температурою. Так, після 24 год експозиції проростків при тем-

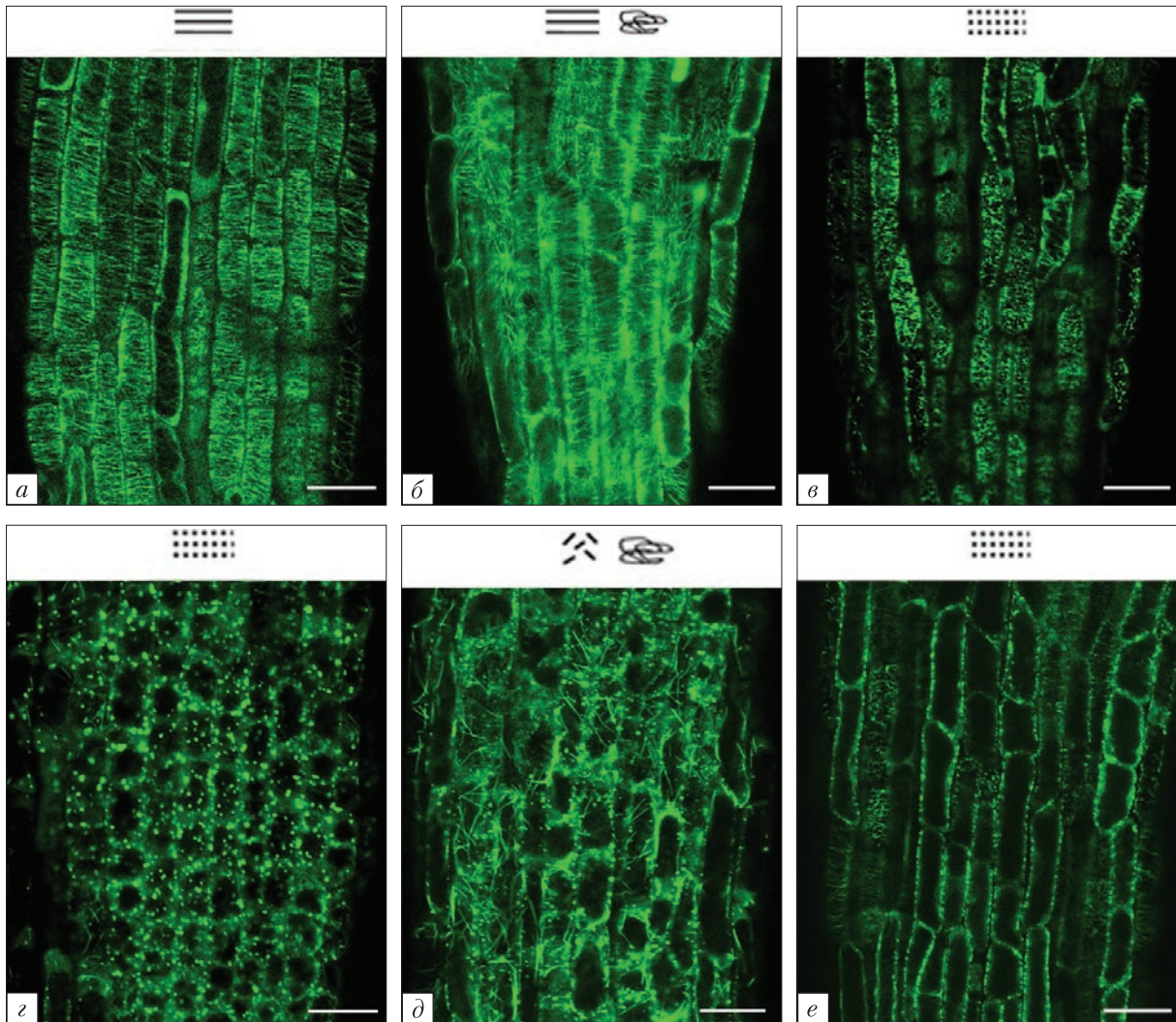


**Рис. 1.** Приріст коренів *A. thaliana* після попередньої обробки донором/скавенджером NO та різних строків експозиції при високій температурі (41 °C)

пературі 41 °C та обробки SNP (100 мкМ) ріст коренів стимулювався в 1,4 раза, а через 48 та 72 год — в 1,5 раза порівняно з проростками, експонованими при високій температурі.

Зворотна картина спостерігається у разі комбінованої дії температурного стресу (41 °C) і скавенджера NO cPTIO (100 мкМ), що виявляється у сповільненні росту коренів на всіх часових проміжках. Зокрема, через 24 год інтенсивність росту коренів пригнічується в 1,9 раза, через 48 год — в 1,7 раза і через 72 год — в 1,8 раза порівняно з приростом коренів, що піддавались лише дії теплового фактору (рис. 1). Одержані дані корелюють з результатами інших досліджень, які також свідчать про позитивний вплив SNP на теплостійкість колеоптилів пшениці [12]. Подібні результати були отримані і за умов індукування теплостійкості калюсної культури пшениці під впливом SNP [13].

Ще раніше нами було встановлено, що організація мікротрубочок у різних типах клітин кореня *A. thaliana* модулюється вмістом NO [11]. Так, у ході експериментів підтверджено, що інкубація коренів у 100 мкМ розчині SNP призводить до реорганізації мережі мікротрубочок з поперечної на частково неупорядковану (рис. 2, б), тоді як скавенджер NO cPTIO (100 мкМ) спричиняє рандомізацію та фрагментацію мікротрубочок (рис. 2, в). Найбільш чутливими до впливу теплового стресу виявилися кортикальні мікротрубочки в епідермальних клітинах на рівні меристеми і клітинах перехідної зони та власне зони розтягу кореня *A. thaliana*. Експозиція проростків при температурі 41 °C зумовлює значні зміни вихідної організації мікротрубочок, що виявляється в їх деполімеризації та фрагментації (див. рис. 2, г). Комбінований вплив високої температури та SNP у концентрації 100 мкМ призводить до реорганізації системи мікротрубочок, що супроводжується появою поодиноких дезорганізованих тяжів мікротрубочок одночасно з їх частковою деполімеризацією в окремих клітинах (див. рис. 2, д). Зворотна картина спостерігається у разі комбінованої дії теплового фактору та скавенджера NO cPTIO (100 мкМ), що спричиняє значне розбирання мікротрубочок, їх фрагментацію та повну деполімеризацію в окремих клітинах (див. рис. 2, е).



**Рис. 2.** Організація мікротрубочок в епідермальних клітинах на рівні зони меристеми головного кореня *A. thaliana*: *a* – контроль; *б* – 100 мкМ SNP; *в* – 100 мкМ сРТІО; *г* – експозиція при 41 °С; *д* – експозиція при 41 °С + 100 мкМ SNP; *е* – експозиція при 41 °С + 100 мкМ сРТІО. Масштаб: 20 мкм

Раніше Ю.В. Карпець із співавт. [14] встановили, що застосування донорів NO за умов теплового стресу призводить до збільшення рівня ендogenous NO і підвищує стійкість рослин до теплового стресу, тоді як використання скавенджерів NO перешкоджає розвитку теплостійкості. Результати інших досліджень також свідчать про те, що попередня обробка NO зменшує пошкодження, спричинені тепловим стресом у проростків рису (*O. sativa*) і збільшує виживаність листя пшениці (*Triticum aestivum*) та проростків кукурудзи (*Zea mays*) [14, 15].

Таким чином, отримані результати свідчать про те, що зміни рівня ендogenous NO, індуковані донором (SNP) або скавенджером (сРТІО) оксиду азоту, можуть бути одним із внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, що залучають ключові елементи цитоскелета до відповіді рослинної клітини на дію високих температур. Встановлені нами закономірності



змін орієнтації мікротрубочок під впливом високотемпературного стресу та використання донора і скавенджера NO можуть розглядатися як важливий елемент внутрішньоклітинних механізмів інгібування росту кореня під впливом високих температур і відновлення цих процесів шляхом індукції внутрішньоклітинних сигнальних шляхів за участю NO.

#### ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Simontacchi M., Galatro A., Ramos-Artuso F., Santa-Maria G.E. Plant survival in a changing environment: the role of nitric oxide in plant responses to abiotic stress. *Front. Plant Sci.* 2015. **6**. P. 977. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00977>
2. Asgher M., Per T.S., Masood A., Fatma M., Freschi L., Corpas F.J., Khan N.A. Nitric oxide signaling and its crosstalk with other plant growth regulators in plant responses to abiotic stress. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2017. **24**. P. 2273–2285. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7947-8>
3. Hasanuzzaman M., Oku H., Nahar K., Borhannuddin Bhuyan M.H.M., All Mahmud J., Baluska F., Fujita M. Nitric oxide-induced salt stress tolerance in plants: ROS metabolism, signaling, and molecular interactions. *Plant Biotechnol. Rep.* 2018. **12**, № 2. P. 77–92. <https://doi.org/10.1007/s11816-018-0480-0>
4. Krasylenko Yu.A., Yemets A.I., Blume Ya.B. Cell mechanisms of nitric oxide signaling in plants under abiotic stress conditions. *Mechanism of plant hormone signaling under stress: a functional genomic frontier*: Pandey G. (Ed.). Vol. 1. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2017. P. 371–398. <https://doi.org/10.1002/9781118889022.ch15>
5. Hasanuzzaman M., Nahar K., Alam M.M., Roychowdhury R., Fujita M. Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 2013. **14**. P. 9643–9684. <https://doi.org/10.3390/ijms14059643>
6. Deng Z., Song S. Sodium nitroprusside, ferricyanide, nitrite and nitrate decrease the thermo-dormancy of lettuce seed germination in a nitric oxide-dependent manner in light. *South Afr. J. Bot.* 2012. **78**. P. 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2011.06.009>
7. Song L., Hou M. Involvement of nitric oxide in acquired thermotolerance of rice seedlings. *Russ. J. Plant Physiol.* 2013. **60**. P. 785–790. <http://doi.org/10.1134/S1021443713060149>
8. Plohovska S.G., Krasylenko Yu.A., Yemets A.I. Low temperature effects on actin filament organization in *Arabidopsis thaliana* primary root cells. *Cell. Biol. Int.* 2019. **43**, № 9. P. 1020–1030. <https://doi.org/10.1002/cbin.10931>
9. Koutalianou M., Orfanidis S., Katsaros C. Effects of high temperature on the ultrastructure and microtubule organization of interphase and dividing cells of the seagrass *Cymodocea nodosa*. *Protoplasma.* 2016. **253**. P. 299–310. <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0809-2>
10. Plohovska S.G., Yemets A.I., Blume Ya.B. Influence of cold on organization of actin filaments of different types of root cells in *Arabidopsis thaliana*. *Cytol. Genet.* 2016. **50**, № 5. P. 318–323. <https://doi.org/10.3103/S0095452716050108>
11. Krasylenko Ya.A., Yemets A.I., Sheremet Ya.A., Blume Ya.B. Nitric oxide as a critical factor for perception of UV-B irradiation by microtubules in Arabidopsis. *Physiol. Plant.* 2012. **145**. P. 505–515. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01530.x>
12. Karpets Y.V., Kolupaev Y.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. <https://doi.org/10.1134/S1021443711060094>
13. El-Beltagi H.S., Ahmed O.K., Hegazy A.E. Protective effect of nitric oxide on high temperature induced oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum*) callus culture. *Not. Sci. Biol.* 2016. **8**, № 2. P. 192–198. <https://doi.org/10.15835/nsb829807>
14. Karpets Yu.V., Kolupaev Yu.E., Vayner A.A. Functional interaction between nitric oxide and hydrogen peroxide during formation of wheat seedling induced heat resistance. *Russ. J. Plant Physiol.* 2015. **62**. P. 65–70. <https://doi.org/10.1134/S1021443714060090>
15. Uchida A., Jagendorf A.T., Hibino T., Takabe T., Takabe T. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Sci.* 2002. **163**. P. 515–523. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00159-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00159-0)

Надійшло до редакції 18.05.2020

REFERENCES

1. Simontacchi, M., Galatro, A., Ramos-Artuso, F. & Santa-Maria, G.E. (2015). Plant survival in a changing environment: the role of nitric oxide in plant responses to abiotic stress. *Front. Plant Sci.*, 6, pp. 977. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00977>
2. Asgher, M., Per, T. S., Masood, A., Fatma, M., Freschi, L., Corpas, F. J. & Khan, N. A. (2017). Nitric oxide signaling and its crosstalk with other plant growth regulators in plant responses to abiotic stress. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 24, pp. 2273-2285. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7947-8>
3. Hasanuzzaman, M., Oku, H., Nahar, K., Borhannuddin Bhuyan, M. H. M., Al Mahmud, J., Baluska, F. & Fujita, M. (2018). Nitric oxide-induced salt stress tolerance in plants: ROS metabolism, signaling, and molecular interactions. *Plant Biotechnol. Rep.*, 12, No. 2, pp. 77-92. <https://doi.org/10.1007/s11816-018-0480-0>
4. Krasylenko, Yu. A., Yemets, A. I. & Blume, Ya. B. (2017). Cell mechanisms of nitric oxide signaling in plants under abiotic stress conditions. In Pandey, G. (Ed.). *Mechanism of plant hormone signaling under stress: a functional genomic frontier*. (Vol. 1) (pp. 371-398). Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781118889022.ch15>
5. Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam, M. M., Roychowdhury, R. & Fujita, M. (2013). Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *Int. J. Mol. Sci.*, 14, pp. 9643-9684. <https://doi.org/10.3390/ijms14059643>
6. Deng, Z. & Song, S. (2012). Sodium nitroprusside, ferricyanide, nitrite and nitrate decrease the thermodormancy of lettuce seed germination in a nitric oxide-dependent manner in light. *South Afr. J. Bot.*, 78, pp. 139-146. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2011.06.009>
7. Song, L. & Hou, M. (2013). Involvement of nitric oxide in acquired thermotolerance of rice seedlings. *Russ. J. Plant Physiol.*, 60, pp. 785-790. <https://doi.org/10.1134/S1021443713060149>
8. Plohovska, S. G., Krasylenko, Yu. A. & Yemets, A. I. (2019). Low temperature effects on actin filament organization in *Arabidopsis thaliana* primary root cells. *Cell. Biol. Int.*, 43, No. 9, pp. 1020-1030. <https://doi.org/10.1002/cbin.10931>
9. Koutalianou, M., Orfanidis, S. & Katsaros, C. (2016). Effects of high temperature on the ultrastructure and microtubule organization of interphase and dividing cells of the seagrass *Cymodocea nodosa*. *Protoplasma.*, 253, pp. 299-310. <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0809-2>
10. Plohovska, S. G., Yemets, A. I. & Blume, Ya. B. (2016). Influence of cold on organization of actin filaments of different types of root cells in *Arabidopsis thaliana*. *Cytol. Genet.*, 50, No. 5, pp. 318-323. <https://doi.org/10.3103/S0095452716050108>
11. Krasylenko, Y. A., Yemets, A. I., Sheremet, Y. A. & Blume, Ya. B. (2012). Nitric oxide as a critical factor for perception of UV-B irradiation by microtubules in *Arabidopsis*. *Physiol. Plant*, 145, pp. 505-515. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01530.x>
12. Karpets, Y. V., Kolupaev, Y. E. & Yastreb, T. O. (2011). Effect of sodium nitroprusside on heat resistance of wheat coleoptiles: dependence on the formation and scavenging of reactive oxygen species. *Russ. J. Plant Physiol.*, 58, pp. 1027-1033. <https://doi.org/10.1134/S1021443711060094>
13. El-Beltagi, H. S., Ahmed, O. K. & Hegazy, A. E. (2016). Protective effect of nitric oxide on high temperature induced oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum*) callus culture. *Not. Sci. Biol.*, 8, No. 2, pp. 192-198. <https://doi.org/10.15835/nsb829807>
14. Karpets, Yu. V., Kolupaev, Yu. E. & Vayner, A. A. (2015). Functional interaction between nitric oxide and hydrogen peroxide during formation of wheat seedling induced heat resistance. *Russ. J. Plant Physiol.*, 62, pp. 65-70. <https://doi.org/10.1134/S1021443714060090>
15. Uchida, A., Jagendorf, A. T., Hibino, T., Takabe, T. & Takabe, T. (2002). Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Science.*, 163, pp. 515-523. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00159-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00159-0)

Received 18.05.2020

*S.H. Plokhovska,  
A.I. Yemets, Ya.B. Blume*

Institute of Food Biotechnology and Genomics of the NAS of Ukraine, Kyiv  
E-mail: svetaplohovska@gmail.com

INVOLVEMENT OF NITRIC OXIDE  
IN THE RESPONSE OF PLANTCELL MICROTUBULES  
TO THE ACTION OF HIGH TEMPERATURE

The effect of a donor (sodium nitroprusside, SNP) and a scavenger (carboxy-2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide, cPTIO) nitric oxide (NO) on the heat resistance of *Arabidopsis thaliana* seedlings with the participation of microtubules as an important intermedator in the realization of the action of high temperatures on the plant cell is studied. The exposure of seedlings at a temperature of 41 °C led to significant changes in the initial organization of microtubules, which manifested themselves in their depolymerization and fragmentation. It has been shown that the use of the SNP nitric oxide donor under thermal stress, which should cause an increase in the level of endogenous NO, helps to maintain the microtubule structural integrity to a high temperature, while the use of cPTIO nitric oxide scavenger causes the opposite effects. The established patterns of changes in the organization of microtubules can be considered as an important element of intracellular mechanisms of inhibition of the growth of roots under the influence of a high temperature and the recovery of these processes by induction of intracellular signaling pathways with NO.

**Keywords:** *microtubules, heat stress, nitric oxide (NO), donor NO, sodium nitroprusside, scavenger NO, cPTIO.*