

ВИВЧЕННЯ РОЛІ NO ТА АКТИНОВИХ ФІЛАМЕНТІВ У ВІДПОВІДІ РОСЛИН НА ДІЮ ХОЛОДУ

На сьогоднішній день велика увага приділяється вивченню впливу різних стресових факторів, серед яких холод, на цитоскелет рослини клітини. Мікротрубочки та актинові філаменти – основні складові цитоскелету – відіграють ключову роль у процесах росту і морфогенезу клітин, тканин і органів рослин, визначають субклітинну організацію, розподіл, полярність, диференціацію клітин, впливають на рух органел, внутрішньо- та міжклітинний транспорт речовин, процеси ендо- та екзоцитозу [1]. Як і інші стреси спека та холод є одним з основних обмежень, що впливають на врожайність сільськогосподарських культур. Висока температура викликає окислювальний стрес, перекисне окислення ліпідів, пошкоджує мембрани, викликає деградацію білків, інактивацію ферментів і порушення ДНК в рослинах [2]. Низькі температури також викликають багато змін в біохімічних і фізіологічних процесах у рослин. Холод є важливим абіотичним фактором, який впливає на ріст та розвиток рослин, а також на полімерний склад компонентів цитоскелету, їх орієнтацію, організацію і взаємодію з різними внутрішньоклітинними структурами [3]. Так, наприклад, встановлено, що низька температура призводить до змін в організації мікротрубочок, викликаючи їх повну деполімеризацію [4]. На коренях кукурудзи було продемонстровано, що найбільш чутливими до низької температури є кортикальні мікротрубочки в перехідній зоні та зоні розтягу кореня, тоді як мікротрубочки в клітинах зони меристеми кореня мають велику стійкість до холоду [5]. Так, встановлено, що інгібітори протеїнкіназ підвищують стабільність мікротрубочок до холоду в суспензійних клітинах *Nicotiana tabacum* L. [6]. Нещодавно також було виявлено, що обробка проростків *Arabidopsis thaliana* інгібітором нерцепторних тирозинкіназ значно збільшує чутливість кортикальних мікротрубочок до дії холоду. На противагу цьому після обробки коренів інгібітором тирозинфосфатаз кортикальні мікротрубочки в різних типах клітин кореня ставали більш стійкими до дії низької температури [7]. Значно менше робіт присвячено дослідженню впливу

холоду на актинові філаменти. Раніше було показано, що мікрофіламенти клітин луски цибулі витримували холодний стрес, викликаний дією температури від 0 до +4 °C протягом години без зміни своєї структури, а мікротрубочки при цьому майже повністю деполімеризувались [8]. У той час, як обробка суспензійних клітин BY-2 (*Nicotiana tabacum* L.) 0 °C протягом 5 хв призводить до зникнення радіальних ниток мікрофіламентів, через 20 хв спостерігається формування неупорядкованої мережі товстих і розгалужених мікрофіламентів, а при подальшій дії холоду вони виглядають як окремі короткі точково пофарбовані структури або стержні [9].

В останнє десятиліття велику увагу приділяють дослідженню оксид азоту (NO) – універсального вторинного посередника в клітинах еукаріотичних організмів [10]. NO – газоподібна, нейтральна двоатомна молекула (вільний радикал), легко проникає через мембрани клітин організмів з періодом напіврозпаду в біологічних середовищах близько 6 сек [11]. У багатьох дослідженнях, вчені намагалися з'ясувати роль NO у боротьбі з температурним стресом. Було, наприклад, встановлено, що дія високої температури на клітини люцерни призводить до підвищення синтезу NO [12]. Zhao із співавт. [13] повідомляють, що холодова акліматизація викликана підвищенням синтезу ендogenous NO у дико-го типу *Arabidopsis thaliana* і в листках мутанта *Atnoal/rif1*, в той час як рівень ендogenous NO *nia1nia2* (NR-дефектний подвійний мутант) був нижчим, ніж у дико-го типу. Холодова акліматизація стимулює діяльність NR і індукуює регуляцію генів *NIA1*. Фармакологічні дослідження з використанням NR інгібітора NO поглинача і NO донорів показало, що рівень NO позитивно корелює із заморожуванням холодом. Тому, метою даної роботи було вивчення ролі NO та актинових філаментів у відповідь рослин на дію холоду.

Матеріали і методи

Експерименти проводили на чотирьохденних проростках лінії *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., що експресує химерний ген 35::GFP-

ABD2-GFP (F-актин зв'язуючий домен (ABD) гена фімбрину (*AtFIM1*) із *A. thaliana*, злитий з геном *gfp* як до С- так і до N-кінця ABD2), що дозволяє візуалізувати актинові філаменти в живих клітинах цієї лінії (Wang et al., 2005). Як модулятор вмісту NO використовували донор екзогенного NO, нітропрурид натрію (натрій нітрософеріціанід дегідрат), який розчиняли у дистильованій воді безпосередньо перед початком експерименту в концентрації 100 мкМ. Для поверхневої стерилізації насіння *A. thaliana* (GFP-ABD2-GFP) витримували в 6 %-ому розчині гіпохлориду натрію протягом 6–10 хв з подальшим п'ятикратним відмиванням стерильною дистильованою водою. Для пророщування в асептичних умовах насіння переносили на тверде живильне середовище Мурасіге-Скуга (Murashige and Skoog salts, Duchefa, Нідерланди), що містить 2,2 г/л набору макро- і мікросолей середовища MS, збагачене тіаміном та міоїнозитолом, а також 10 г/л сахарози та 4 г/л джелрайту, рН 5,7. Надалі висаджене насіння стратифікували за температури +4 °С протягом 24 год, а потім залишали для проростання на 4 доби за постійної температури +22 °С і 16/8-годинному фотоперіоді. Чотириденні проростки *A. thaliana* витримували у пластикових чашках Петрі об'ємом 5 мл у водному розчині нітропрусиду натрію (100 мкМ) протягом 1 год. Обробку холодом (+4 °С) проводили відразу перед зйомкою, поміщаючи чашки Петрі з проростками в холодильник на 1–2 год.

Зміни морфології головних коренів проростків *A. thaliana* (GFP-ABD2-GFP) в умовах холодостресу вивчали за допомогою світлового мікроскопа Axioskop 40 (Carl Zeiss, Німеччина), об'єктиви Plan-Neofluar 10x/0.30, 20x/0.5 і 40x/1.30 Oil DIC. Організацію актинових філаментів після обробки холодом та модуляторами вмісту NO через 1 і 2 год вивчали *in vivo* за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопу LSM 5 PASCAL (Carl Zeiss, Німеччина). Для отримання тривимірного зображення використовували агарозний гель з довжиною хвилі 488 нм, роздільний фільтр HFT 405/488, емісійний фільтр BP 505–530, об'єктиви Plan Arochromat 40x/1.4 DIC і 60x/1.4 Oil DIC. Індивідуальну конфігурацію визначали для кожного об'єктива шляхом зміни параметрів швидкості сканування, точкової діафрагми і детектора лазера. За допомогою програмного забезпечення версії 4SP2 LSM 510 META (Carl Zeiss, Німеччина) отримували тривимірні структури організації ак-

тинових філаментів на основі серії оптичних зрізів (Z–стеків) з інтервалом 0,2–0,7 мкм.

Результати та обговорення

У роботі досліджували організації актинових філаментів *in vivo* в різних типах клітин головних коренів *A. thaliana* (GFP-ABD2-GFP) після обробки низькою температурою (+4 °С) та після комбінованого впливу холоду і екзогенного донора NO (нітропрусиду натрію). У результаті проведених експериментів спостерігаються зміни нативної організації актинових філаментів в різних зонах головних коренів *A. thaliana* (GFP-ABD2-GFP). У необроблених проростків в епідермальних клітинах мікрофіламенти являють собою тонку і високодинамічну сітчасту структуру (рис. 1 I (А)). Вже після 1 год обробки холодом актинові філаменти частково деполімеризуються (рис. 1 I (В)), а після 2 год обробки неупорядкована сітка мікрофіламентів розріджується і спостерігаються короткі нитки актину (рис. 1, I (Д)). Після комбінованого впливу холоду та екзогенного донора NO (SNP 100 мкМ) відбувається часткове відновлення сітки мікрофіламентів (рис. 1 I (Г)), утворюються тонкі закручені тяжі, що рівномірно заповнюють весь об'єм клітини (рис. 1 I (Е)). В клітинах меристеми актинові філаменти представляють собою потовщені пучки, розташовані навколо ядра у вигляді сітчастої структури (рис. 1 II (А)). Після впливу холоду відбувається часткова (рис. 1 II (В)) або повна деполімеризація ниток актину (рис. 1 II (Д)). Комбінований вплив низької температури і донора також призводив до відновлення сітки мікрофіламентів. Спостерігалось зменшення клітин із частковою і повною деполімеризацією (рис. 1 II (Г)), мікрофіламенти знову починали закручуватись і скупчуватись, утворюючи сітку навколо ядра клітини (рис. 1 II (Е)).

Як і в епідермальних клітинах кореневого апекса, так і в епідермальних клітинах зони розтягу головних коренів *A. thaliana* (GFP-ABD2-GFP) актинові нитки являють собою систему довгих пучків мікрофіламентних структур, рівномірно розташованих всередині клітини (рис. 2 А). У більшості клітин зони розтягу після 1 год обробки температурою +4 °С мікрофіламенти дезорієнтуються (рис. 2 Б), а в окремих клітках після 2 год обробки залишається рідка сітка довгих і товстих тяжів (рис. 2 II В). Після комбінованого впливу донора і низької температури, скупчення ниток в товсті пучки не спостерігається, а відбувається їх дезорієнтація і реорієнтація (рис. 2 Д, В) у порівнянні з контрольними зразками.

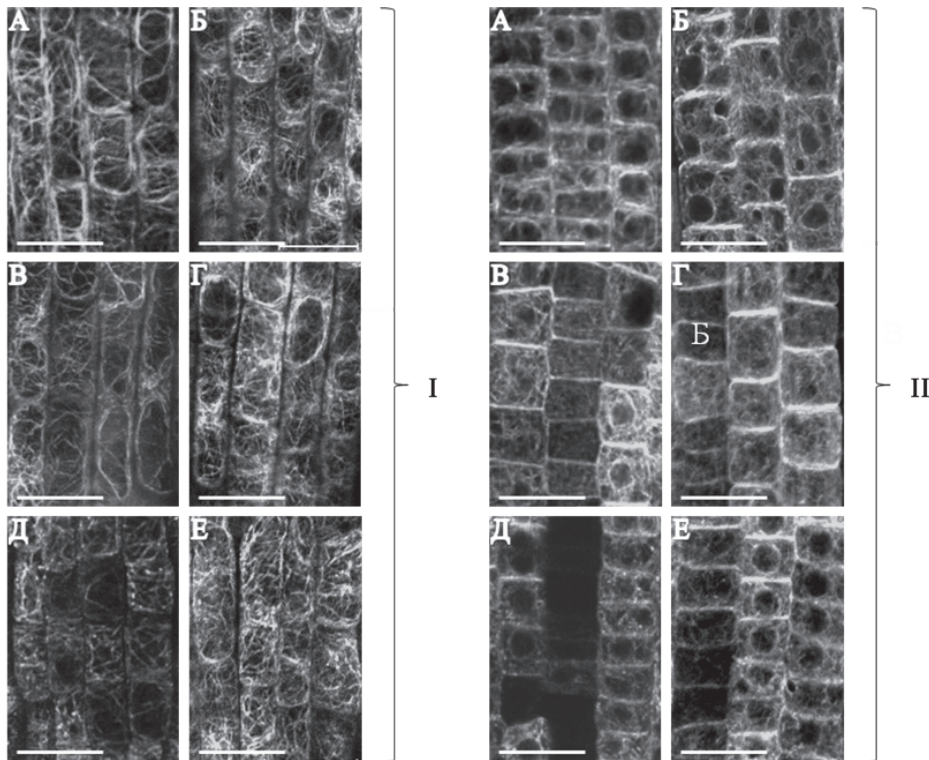


Рис. 1. Організація актинових філаментів в клітинах кореня *A. thaliana* (GFP-ABD2-GFP) після обробки температурою +4 °С та екзогенним донором NO: I – епідермальні клітини, II – зона меристеми: А – контроль, Б – контроль + 100 мкМ SNP; В – вплив холоду, 1 год; Г – вплив холоду + 100 мкМ SNP, 1 год; Д – вплив холоду, 2 год; Е – вплив холоду + 100 мкМ SNP, 2 год. Масштаб: 20 мкм

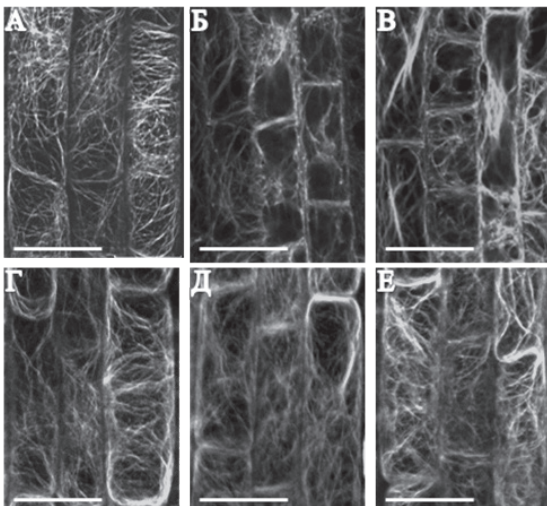


Рис. 2. Організація актинових філаментів в епідермальних клітинах зони розтягу кореня *A. thaliana* (GFP-ABD2-GFP) після обробки температурою +4 °С та екзогенним донором NO: А – контроль; Б – вплив холоду, 1 год; В – вплив холоду, 2 год; Г – контроль + 100 мкМ SNP; Д – вплив холоду + 100 мкМ SNP, 1 год; Е – вплив холоду + 100 мкМ SNP, 2 год. Масштаб: 20 мкм

Встановлено, що особливу чутливість до дії холоду мають актинові філаменти в диференційованих клітинах, у тому числі в клітинах кореневих волосків. Після обробки коренів холодом спостерігається розрідження актинової сітки, візуалізуються лише яскраво забарвлені точкові структури або короткі мікрофіламенти. (рис. 3 Б, В). Комбінована дія холоду та нітропрусиду натрію в концентрації 100 мкМ показує дещо іншу картину. Мікрофіламенти візуалізуються у вигляді густої розгалуженої сітки (рис. 3 Д, Е).

Раніше нами було продемонстровано виражений вплив низької температури (+4 °С) на прижиттєву організацію і орієнтацію актинових філаментів, що є однією з причин змін морфології і росту головних коренів *A. thaliana*. Найбільш чутливими до дії холоду виявились кореневі волоски, меристематичні клітини, а також епідермальні клітини всіх досліджуваних зон кореня [14]. Красиленко із співав. [15] вперше показали, що NO опосередковує реорганізацію мікротрубочок як основних компонентів цитоскелету, що є рушійною силою морфогенезу. Було виявлено

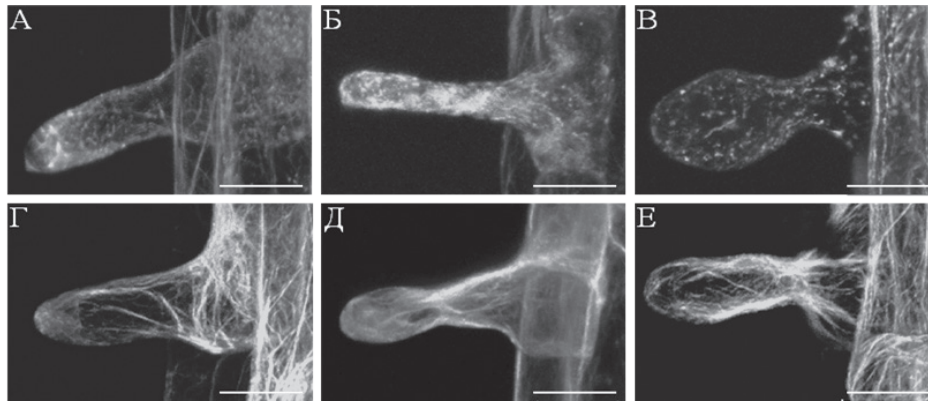


Рис. 3. Організація актинових філаментів в зоні диференціації в клітинах кореня *A. thaliana* (GFP-ABD2-GFP) після обробки температурою +4°C та комбінованого впливу холоду та екзогенного донора NO: А – контроль; Б – вплив холоду, 1 год; В – вплив холоду, 2 год; Г – контроль + 100 мкМ SNP; Д – вплив холоду + 100 мкМ SNP, 1 год; Е – вплив холоду + 100 мкМ SNP, 2 год. Масштаб: 20 мкм

стимулюючий вплив донора NO (10–500 мкМ) на ріст коренів, що узгоджується зі зміною орієнтації та організації мікротрубочок у клітинах певних ростових зон коренів *A. thaliana*.

Висновки

Отримані нами дані вперше демонструють негативний вплив низької температури (+4 °C), а також комбінований вплив холоду і екзогенного донора нітропрусида натрію також на прижиттєву організацію та орієнтацію актинових філаментів в різних типах клітин головних коренів *A. thaliana* (GFP-ABD2-GFP). Нами вста-

новлено, що порушення орієнтації мікрофіламентів відновлюється за допомогою екзогенного донора NO, що позитивно корелює відносно до охолодження. Найбільш чутливими до дії холоду виявилися кореневі волоски, меристематичні клітини і клітини зони розтягу, а також епідермальні клітини всіх досліджуваних зон кореня *A. thaliana*. З'ясування впливу низьких температур на цитоскелет клітини має важливе значення для розуміння механізмів їх дії на рослинний організм в цілому, і тому може служити основою для пошуку шляхів зменшення їх негативного впливу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Barlow W.P., Baluska F. Cytoskeletal perspectives on root growth and morphogenesis // *Plant Mol. Biol.* – 2000. – 51. – P. 289–322.
2. Suzuki N., Mittler R. Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction // *Physiol Plant.* – 2006. – 126. – P. 45–51.
3. Wasteneys G. The cytoskeleton and growth polarity // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2000. – 3. – P. 503–511.
4. Willin M., Stromberg E. Cold-stable and cold-adapted microtubules // *Int. Rev. Cytol.* – 1995. – 157. – P. 1–31.
5. Baluska F., Parker J.S., Barlow P.W. The microtubular cytoskeleton in cells of cold treated roots of maize (*Zea mays* L.) shows tissue-specific responses // *Protoplasma.* – 1993. – 172. – P. 84–96.
6. Mizuno K. Induction of cold stability of microtubules in cultured tobacco cells // *Plant Physiol.* – 1992. – 100. – P. 740–748.
7. Sheremet Ya.A., Yemets A.I., Blume Ya.B. Inhibitors of tyrosin kinases and phosphatases as a tool for the investigation of microtubule role in plant cold response // *Cytology and Genetics.* – 2012. – 46. – P. 1–8.
8. Quader H. Cytoskeleton: Microtubules // *Progress in Botany.* – Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag. – 1998. – P. 374–395
9. Pokorna J., Schwarzerova K., Zelenkova S. Sites of actin filament initiation and reorganization in cold-treated tobacco cells // *Plant, Cell and Environment.* – 2004. – 27. – P. 641–653.
10. Stamler J.S. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide // *Cell.* – 1994. – 78. – P. 931–936.
11. Stohr C., Ullrich W.R. Generation and possible roles of NO in plant roots and apoplasmic space // *Exp. Bot.* – 2002. – 53. – P. 2293–2303.
12. Neill S.J., Desikan R., Hancock J.T. Nitric oxide signalling in plants // *New Phytologist.* – 2003. – 159. – P. 11–35.
13. Zhao J.-L., Zhang H., Li X.-L., Li Y. Chilling stability of microtubules in root-tip cell of cucumber // *Plant Cell Rep.* – 2003. – 22. – P. 32–37.
14. Плоховська С.Г., Заславський В.А., Емець А.И., Блюм Я.Б. Участвие актинових філаментов в ответе клеток корня *Arabidopsis thaliana* на действие низкой температуры // *Доповіді НАН України.* – 2015.
15. Krasnylenko Y., Yemets A., Sheremet Y., Blume Y. Nitric oxide as a critical factor for perception of UV-B irradiation by microtubules in *Arabidopsis* // *Physiologia Plantarum.* – 2011. – 145 (4). – P. 505–515.

PLOHOVSKA S.H., KRASYLENKO YU.A., YEMETS A.I., BLUME YA.B.

*Institute of Food Biotechnology and Genomics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine,
Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2a, e-mail: address: sveta_plohovska@mail.ru*

STUDY THE ROLE OF NO AND ACTIN FILAMENTS IN ANSWER OF PLANTS ON COLD ACTION

Aims. It has been shown in a number of studies that low temperature leads to significant changes in the organization of cytoskeleton structures. Recent studies have shed light on the importance of NO, a ubiquitous signaling molecule in eukaryotes, for plant tolerance to freezing. **Methods.** In this work we studied the effect of cold and SNP (NO donor) on organization of actin filaments in the cells of the root seedlings *A. thaliana* (GFP-ABD2-GFP) using confocal laser scanning microscope. **Results.** Observed disorientation and partially depolymerization of actin filaments in the most cells of the transition zone and individual cells were found. Effect of SNP stimulates restoration of actin filaments; there were found an extensive network of renewal filaments structures after SNP treatment. **Conclusions.** Our data have shown for the first time a negative effect of low temperature on organization and orientation of the actin filaments in various cell types of the main roots of *A. thaliana*. We have found that disorientation microfilaments reversed by exogenous donor of NO, which correlates positively with respect to cold.

Keywords: cytoskeleton, actin filaments, sodium nitroprusside (SNP), green fluorescent protein (GFP), actin binding domain 2 (ABD2).