

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА «ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ
БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА ГЕНОМІКИ НАН УКРАЇНИ»**

ПЛОХОВСЬКА СВІТЛАНА ГРИГОРІВНА



УДК:576.311.348.3+543.272.32+58.036.5

**ЗАХИСНА РОЛЬ ОКСИДУ АЗОТУ ВІД ВПЛИВУ НИЗЬКИХ
ТЕМПЕРАТУР НА ОРГАНІЗАЦІЮ АКТИНОВИХ ФІЛАМЕНТІВ
*ARABIDOPSIS THALIANA***

03. 00. 11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2018

Дисертація є рукописом

Робота виконана у відділі геноміки та молекулярної біотехнології державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України»

Науковий керівник:

доктор біологічних наук, професор,
академік НАН України
Блюм Ярослав Борисович,
державна установа «Інститут харчової
біотехнології та геноміки НАН
України», завідувач відділу геноміки та
молекулярної біотехнології

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор
Кравець Володимир Степанович,
Інститут біоорганічної хімії та
нафтохімії НАН України, завідувач
відділу молекулярних механізмів
регуляції метаболізму клітини

кандидат біологічних наук, старший
науковий співробітник
Шевченко Галина Валеріївна,
Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного
НАН України, старший науковий
співробітник відділу клітинної біології
та анатомії

Захист відбудеться «11» жовтня 2018 року об 11⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.254.01 державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ-123, вул. Осиповського, 2а, тел./факс: (044) 434-37-77, e-mail: d26.254.01@ukr.net

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а.

Автореферат розіслано «11» вересня 2018 року.

Вчений секретар спеціалізованої
вченої ради, к.б.н., доц.



Н.Л. Пастухова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Основні складові цитоскелету – мікротрубочки та актинові філаменти (мікрофіламенти) – відіграють ключову роль у процесах росту і морфогенезу клітин, визначають субклітинну організацію, поділ, полярність, диференціацію клітин, впливають на рух органел, внутрішньо- та міжклітинний транспорт речовин, процеси ендо- та екзоцитозу. Мікротрубочки являють собою довгі порожнисті циліндри, стінки яких містять 13 протофіламентів, що складаються з глобулярних гетеродимерів, утворених субодиницями α - і β - тубуліну. Актинові філаменти утворюються закрученими один навколо одного тяжами, які складаються з глобулярних молекул актину (Barlow et al., 2000; Hussey et al., 2006; Pollard et al., 2003; Lee et al., 2010). Одним із швидкозростаючих напрямів досліджень цитоскелету рослинної клітини є вивчення його відповіді на дію різних факторів навколишнього середовища, таких, як гравітація (Blancaflor, 2002; Shevchenko et al., 2005; Pozhvanov et al., 2013), механічний стрес (Wang et al., 1993; Deng, 2004), високі (Pivovarova et al., 2005; Toivola et al., 2010) та низькі температури (Egiersztorff et al., 2001; Wasteneys et al., 2004; Fan et al., 2015), важкі метали (Pribyl et al., 2005; Fan et al., 2011; Goriunova et al., 2014) тощо. Низькі температури є важливим абіотичним фактором, який впливає на ріст та розвиток рослин, а також на організацію компонентів цитоскелету і їх взаємодію з різними внутрішньоклітинними структурами (Nick, 1998; Wasteneys et al., 2004; Penfield, 2008).

До цих пір в більшості робіт головна увага приділялась вивченню впливу холододового фактору на структуру та функції мікротрубочок. Відомо, що в клітині існує динамічна рівновага між розчиненими субодиницями тубуліну і полімерними тубуліновими філаментами. Низькі температури зсувають цю рівновагу в сторону деполімеризації мікротрубочок, що призводить до їх розбирання (Mizuno, 1992; Zhao et al., 2003; Valuška et al., 2010). Зокрема, при температурі $+0,5^{\circ}\text{C}$ деполімеризуються кортикальні мікротрубочки у клітинах перехідної зони, в зонах розтягу та диференціації головних коренів проростків *Arabidopsis thaliana* (Sheremet et al., 2011). Така деполімеризація мікротрубочок рослин пов'язана не лише з активацією відповідних сигнальних шляхів під впливом низьких температур, але й з індукованими холоду змінами експресії генів тубуліну (Буй та ін., 2015, 2017; Farajalla et al., 2007).

Однак значно менше робіт присвячено дослідженню впливу холоду на мікрофіламенти рослинної клітини. Показано, що в пилкових трубках тютюну (*Nicotiana tabacum* L.) актинові філаменти залишаються непошкодженими після експозиції при температурі $+4^{\circ}\text{C}$, в той час як мікротрубочки за таких умов деполімеризуються (Aström et al., 1991). Короткочасна експозиція культури клітин *N. tabacum* ВУ-2 при 0°C протягом 5 хв призводить до зникнення радіальних мікрофіламентів, а більш тривала (20 хв) до формування непорядкованої розрідженої мережі актинових філаментів. Через більш тривалий проміжок часу (12 год) спостерігалися лише яскраві короткі пучки або окремі скупчення F-актину навколо ядра і по периферії клітин (Pokorna et al., 2004).

Відомо, що при дії різних абіотичних факторів зростає внутрішньоклітинний вміст ендогенного оксиду азоту (NO) – універсального вторинного посередника у клітинах еукаріот (Neill et al., 2003; Besson-Bard et al., 2009). Відомо, що NO залучений

до регуляції численних процесів у рослин, зокрема, поділу, росту та диференціації клітин (Ötvös et al., 2005), цвітіння, запилення та проростання насіння (Bright et al., 2009; Zhao et al., 2009), адаптивної відповіді рослин на світло, силу тяжіння, осмотичний, оксидативний, а також низько- та високотемпературні стреси (Pedroso et al., 2000; Zhang et al., 2004; Lamattina et al., 2003; Song et al., 2008). Показано, що обробка донором NO нітропрусидом натрію (SNP) стимулює утворення та ріст бокових коренів у томатів, інгібуючи при цьому ріст головного кореня. При додаванні скавенджера NO сРТЮ відбувається інгібування росту головного і бокових коренів (Correa-Aragunde et al., 2004). Тривала чи короткочасна дія абіотичних або біотичних чинників середовища на рослину може спричинити розвиток нітрозативного стресу, який проявляється у посиленні синтезу ендогенного NO (Valderrama et al., 2007; Corpas et al., 2008). Температурний стрес викликає збільшення концентрації ендогенного NO в клітинах, отож застосування донорів NO підвищує холодостійкість в таких рослин, як томати, пшениця та кукурудза (Neill et al., 2003). Таким чином, оскільки до цих пір закономірності впливу холоду на актинові філаменти рослин вивчені недостатньо, актуальним лишається з'ясування особливостей впливу даного фактору на ці цитоскелетні структури, а також встановлення механізмів залучення до цих процесів NO як вторинного посередника, котрий бере участь у регуляції фізіологічного стану рослинного організму за умов стресу.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами. Дисертаційну роботу виконано у рамках бюджетних тематик відділу геноміки та молекулярної біотехнології ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»: «Вивчення молекулярно-генетичних та клітинних механізмів стійкості рослин до абіотичних та біотичних факторів для покращення їх адаптивних властивостей до несприятливих умов навколишнього середовища» (2011–2016 рр., № ДР 0111U001597); «Геноміка та клітинна біологія цитоскелету рослин як інструмент для вивчення його структури і функцій та розвитку нових біотехнологій» (2015–2019 рр., № ДР 0115U002084); «Дослідження відповіді рослин на дію абіотичних та біотичних чинників на клітинному та генетичному рівнях для покращення їх адаптивних властивостей до несприятливого впливу змін кліматичних умов» (2017–2021 рр., № ДР 0117U000909).

Мета та завдання дослідження. Мета дисертаційної роботи – встановлення закономірностей дії холоду як абіотичного стресового фактору на структуру актинових філаментів в різних типах клітин кореня *Arabidopsis thaliana*, а також участі NO як вторинного посередника в забезпеченні відповіді рослин на дію цього фактору із залученням мікрофіламентів.

Згідно із поставленою метою до завдань експериментальної роботи входило:

- дослідити вплив низьких температур (+4°C, +0,5°C) та донора NO нітропрусиду натрію (SNP) на параметри росту та морфології головних коренів проростків *A. thaliana*;
- дослідити вплив низьких температур (+4°C, +0,5°C) та скавенджера NO карбокси-2-феніл-4,4,5,5-тетраметилімідазолін-1-оксил-3-оксид (сРТЮ) на ріст та морфологію головних коренів проростків *A. thaliana*;
- вивчити вплив низьких температур на особливості просторової організації актинових філаментів в клітинах різних зон головного кореня проростків *A. thaliana*;

- дослідити комбінований вплив попередньої обробки проростків *A. thaliana* нітропрусидом натрію та подальшого впливу низьких температур (+4°C, +0,5°C) на просторову організацію актинових філаментів у різних типах клітин кореня *A. thaliana*;
- дослідити комбінований вплив попередньої обробки проростків *A. thaliana* скавенджером NO та подальшого впливу низьких температур (+4°C, +0,5°C) на просторову організацію мікрофіламентів у клітинах кореня *A. thaliana*;
- визначити закономірності змін орієнтації актинових філаментів в різних типах клітин головного кореня *A. thaliana* під впливом низьких температур (+4°C, +0,5°C) за допомогою програми Microfilament Analyzer (MFA);
- визначити закономірності змін орієнтації мікрофіламентів в клітинах різних зон головного кореня проростків *A. thaliana* після комбінованого впливу SNP і сРТІО та низьких температур (+4°C, +0,5°C) використовуючи програму MFA.

Об'єкт дослідження – особливості структурної організації актинових філаментів в різних типах клітин головного кореня проростків *A. thaliana*.

Предмет дослідження – вплив низьких температур (+4°C, +0,5°C) та донора (SNP) і скавенджера (сРТІО) оксид азоту на ріст та морфологію первинних коренів проростків *A. thaliana*, а також організацію актинових філаментів в клітинах різних ростових зон кореня.

Методи дослідження. Світлова мікроскопія (дослідження морфології коренів); конфокальна мікроскопія (вивчення просторової організації актинових філаментів в клітинах коренів); програмне забезпечення Microfilament Analyzer (аналіз орієнтації актинових філаментів в клітинах коренів); методи статистичного аналізу.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше проведено дослідження змін просторової організації актинових філаментів в різних типах клітин всіх функціональних зон первинного кореня *A. thaliana*, викликаних впливом низьких температур (+4°C; +0,5°C), що пов'язано у часі із змінами показників росту та морфології кореня. Встановлено, що мікрофіламенти в клітинах різних ростових зон кореня мають різну ступінь чутливості до дії холодового фактору. Найбільшу чутливість до впливу досліджуваних температур виявлено для актинових філаментів в клітинах кореневих волосків, меристематичних клітинах, а також епідермальних клітинах зони розтягу кореня. Наші дані вперше показують комбінований вплив низьких температур та донора (SNP) і скавенджера (сРТІО) оксиду азоту на організацію актинових філаментів в різних типах клітин кореня проростків *A. thaliana*. Встановлено, що в клітинах коренів при дії SNP формується велика сітка відновлюваних мікрофіламентів, а при дії сРТІО відбувається збільшення дезорієнтації та деполімеризації актинових філаментів. Вперше за допомогою програмного забезпечення MFA проведено узагальнення закономірностей орієнтації мікрофіламентів в клітинах з різних зон кореня *A. thaliana*. Вперше встановлено, що під впливом холоду та змін вмісту ендogenous NO, індукованих дією донора (SNP) і скавенджера (сРТІО) оксиду азоту, відбувається не тільки розрідження динамічної актинової сітки та зміни просторових характеристик полімеризації/деполімеризації актину в клітинах різних зон кореневого апексу, але й диференційно змінюється орієнтація мікрофіламентів відносно основної осі кореня.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані дані можуть використовуватись для подальших досліджень закономірностей впливу низьких

температур на просторову організацію актинових філаментів в рослинній клітині, що має важливе значення для розуміння механізмів дії цього абіотичного фактору на рослинний організм в цілому і може бути використане для розробки практичних підходів для зменшення негативного впливу холодowego фактору на ріст і розвиток рослин, особливо за умов сільськогосподарського виробництва. Використання ефективних донорів і скавенджерів оксиду азоту може бути рекомендовано для забезпечення регулювання змін вмісту ендogenous NO, який залучається до відповіді клітин на вплив факторів зовнішнього середовища, для практичного використання.

Особистий внесок здобувача. Спільно з науковим керівником було обрано актуальну тему наукового дослідження, здійснено постановку основних завдань роботи та проведено інтерпретацію отриманих результатів. Автором особисто опрацьовано літературні джерела за темою дисертаційної роботи, проведено основні експериментальні дослідження, викладено основні положення та узагальнення дисертаційної роботи.

Апробація роботи. Результати дисертаційної роботи були представлені на II Міжнародній науково-практичній конференції «Природничі та медичні науки: актуальні проблеми і перспективи розвитку» (Київ, Україна, 14 листопада 2013); II конференції молодих учених «Plant Genomics and Biotechnology» (Київ, Україна, 23-24 грудня 2013); Міжнародній науково-практичній конференції молодих науковців «Проблеми та перспективи досліджень рослинного світу» (Ялта, АР Крим, 13-16 травня 2014); 4-му з'їзді Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом (Ужгород, Україна, 17-20 вересня 2014); XI Українському біохімічному конгресі (Київ, Україна, 6-10 жовтня 2014); VI Міжнародній науково-практичній конференції «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты)» (Ялта, АР Крим, 12-17 жовтня 2014); III Міжнародній науковій конференції «Регуляція росту і розвитку рослин: фізіолого-біохімічні і генетичні аспекти» (Харків, Україна, 11-12 листопада 2014); X Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» (Чернівці, Україна, 14-18 вересня 2015); XI Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів», а також асоційованого з конференцією VI з'їзду Всеукраїнської асоціації біологів рослин (Одеса, Україна, 12-16 вересня 2016); Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні питання розвитку біології та екології» (Вінниця, Україна, 3-7 жовтня 2016); III конференції молодих учених «Біологія рослин і біотехнологія» (Київ, Україна, 16-18 травня 2017); IV Міжнародній конференції «Онтогенез рослин у природному та трансформованому середовищі. Фізіолого-біохімічні та екологічні аспекти» (Львів, Україна, 4-6 жовтня 2017).

Публікації. За результатами дисертаційної роботи було опубліковано 15 праць, з них 5 статей (в т.ч. 2 – у зарубіжних журналах) та 10 тез доповідей в профільних журналах та збірниках матеріалів конференцій.

Структура та об'єм роботи. Дисертаційна робота складається з анотації, вступу, семи розділів, узагальнення результатів та висновків. У роботі наведено 5 таблиць, 21 рисунок, список використаних джерел містить 273 посилання. Загальний обсяг рукопису 145 сторінок.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У першому розділі (огляді літератури) розглянуто відомі літературні дані стосовно структурно-функціональної організації актинових філаментів в рослинних клітинах. Описано основні фізіологічні аспекти впливу холоду на рослину, а також молекулярно-генетичні механізми впливу низьких температур на рослинну клітину. Окремо розглянута роль оксиду азоту, задіяного у регуляції різних процесів життєдіяльності клітин рослин як за нормальних умов, так і при дії біотичних та абіотичних стресових факторів, що забезпечує їх пластичність і адаптацію до нестабільних умов навколишнього середовища. Зазначається обмеженість досліджень щодо впливу холододового фактору на цитоскелет, а також механізмів впливу NO як вторинного посередника у цих процесах.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктами дослідження були чотириденні проростки *Arabidopsis thaliana* (L.) (екотип Columbia-0), а також проростки трансформованої лінії *A. 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 з C-, так і з N-кінця ABD2). Для поверхневої стерилізації насіння *A. thaliana* витримували протягом 6-10 хв у 6%-ному (v:v) розчині гіпохлориту натрію (NaCl) з подальшим п'ятиразовим відмиванням стерильною дистильованою водою. Для проростання стерильне насіння переносили на тверде поживне середовище Мурасіге-Скуга (МС) (Murashige&Skoog, 1962) з половинним набором мікро- та макросолей МС (2,2 г/л), 10 г/л сахарози, 4 г/л джелрайта, рН 5,7. Висаджене насіння стратифікували при температурі +4°C протягом 24 год. Надалі чашки Петрі з насінням залишали для проростання у вертикальному положенні протягом 4-х діб при постійній температурі +22°C і 16/8-годинному фотоперіоді.

Для дослідження впливу низьких температур чашки Петрі з чотирьохденними проростками поміщали в холодильник на 24, 48 та 72 год при температурі +4°C та +0,5°C. Як модулятор вмісту оксиду азоту використовували донор екзогенного NO нітропрусид натрію (SNP) (Aldrich, USA) та скавенджер NO карбокси-2-феніл-4,4,5,5-тетраметилімідазолін-1-оксил-3-оксид (сРТІО) (Sigma, USA), які розчиняли у дистильованій воді безпосередньо перед початком експерименту в концентрації 100 мкМ. Для вивчення комбінованої дії SNP та сРТІО і низьких температур (+4°C; +0,5°C) проводили попередню обробку проростків водними розчинами SNP та сРТІО протягом 1 год з подальшим перенесенням на поверхню агаризованого середовища МС, аналогічного за складом тому, на якому відбувалося пророщування насіння *A. thaliana*.

Зображення коренів були отриманні за допомогою цифрової фотокамери Canon Power Shot G6 в режимі макрозйомки у точках 24, 48 та 72 год від початку обробки. Вимірювання довжини коренів проводили за допомогою програми *ImageJ* (версія 1.38 d), яка знаходиться у вільному доступі на сайті <http://rsb.info.nih.gov/ij/>. Попередні результати (фактична довжина коренів, виражена у міліметрах) були представлені як середнє значення довжини коренів (мм) \pm стандартна похибка. Для встановлення впливу низьких температур (+4°C; +0,5°C) на ріст коренів *A. thaliana* на протязі 24, 48 та 72 год визначали показники відносного приросту коренів (%), що було

представлене як співвідношення фактичного приросту (мм) оброблених коренів до фактичного приросту коренів контролю (мм), розраховане в програмі Microsoft Office Excel 2007 за формулою:

$$\Delta = \frac{(L_{cp} - L_o)}{L_o} * 100\%$$

де L_{cp} – середнє значення довжини коренів, оброблених низькими температурами протягом встановленого часу (мм), L_o – середнє значення довжин коренів до початку експерименту (мм), Δ – приріст довжин коренів (%). Достовірність різниці вираховували за критерієм Стюдента. Значення довжин коренів (мм) наводили як середнє арифметичне (M) \pm середнє відхилення (m).

Зміни морфології первинних, бічних та додаткових коренів проростків *A. thaliana* в умовах холодного стресу 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. Зміни організації актинових філаментів, до складу яких входив білковий продукт флуоресцентної химерної конструкції GFP-ABD2-GFP під впливом низьких температур та комбінованого впливу донора (SNP) і скавенджера (сРТЮ) оксиду азоту візуалізували за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопу LSM 5 PASCAL (Carl Zeiss, Німеччина). Для отримання тривимірного зображення використовували аргонний лазер з довжиною хвилі 488 нм, роздільний фільтр HFT 405/488, емісійний фільтр BP 505-530, об'єктиви Plan Aplanachromat 40x/1.4 DIC і 60x/1.4 Oil DIC. Тривимірні структури різних типів організації актинових філаментів отримували на основі серії оптичних зрізів (Z-стеки) з інтервалом 0,2-0,7 мкм за допомогою програмного забезпечення версії 4SP2 LSM 510 META (Carl Zeiss, Німеччина). Досліди проводили в трьох повторюваностях для усіх досліджуваних зразків у певних часових проміжках.

Для виявлення закономірностей змін орієнтації актинових філаментів після впливу низьких температур і модуляторів вмісту NO використовували програмне забезпечення Microfilament Analyzer (MFA), що знаходиться у вільному доступі на сайті <http://www.ua.ac.be/bimef/MFA>.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вплив холоду та SNP і сРТЮ на ріст та морфологію головних коренів проростків *A. thaliana*. В результаті проведених досліджень встановлено, що експозиція проростків *A. thaliana* при температурі +4°C і +0,5°C призводить до значних змін параметрів росту і розвитку первинного кореня. Через 24 год після експозиції при температурі +4°C інтенсивність росту головного кореня зменшувалась приблизно у 2,8 рази, через 48 год – в 3,1 рази, а через 72 год – в 3,6 рази в порівнянні з контрольними проростками. Із зниженням температури до +0,5°C збільшується інгібуючий ефект на параметри росту коренів *A. thaliana*. Так, через 24 год інтенсивність росту зменшилася в 3 рази, через 48 год – в 3,2 рази, а через 72 год – в 4 рази. При комбінованій дії холоду та донора NO SNP в концентрації 100 мкМ відбувається часткове стимулювання росту головних коренів порівняно з коренями, що піддавались холодному стресу. Зворотна картина спостерігається при комбінованій дії холоду та скавенджера NO. Так, на всіх часових проміжках спостерігається сповільнення росту коренів при обробці сРТЮ в концентрації 100

мкМ. Зміни росту та морфології коренів *A. thaliana* внаслідок впливу низьких температур та комбінованої дії холоду та донора NO SNP і його скавенджера сРТІО підсумовані в таблиці 1.

Таблиця 1

Вплив холоду та регуляторів ендogenous вмісту NO на ріст та морфологію головних коренів *A. thaliana*

Показники температури та тип донора/скавенджера NO	Ріст коренів 24 год	Свелінг (збільшення розміру клітин)	Бічні та адвентивні корені	Кореневі волоски			
				поява зачатків	ріст	морфологія	
						свелінг	галуження
+4°C	↓	+	+	+	↓	+	+
+0,5°C	↓	+	–	+	↓	–	–
SNP	↑	–	+	+	↑	–	–
сРТІО	↓	+	–	+	↓	+	+/-
+4°C + SNP	↑	+/-	+/-	+	↑	–	+/-
+4°C + сРТІО	↓	+	+	+	↓	+	+
+0,5°C + SNP	↑	+/-	+/-	+	↑	–	–
+0,5°C+сРТІО	↓	–	–	+	↓	+	+

Умовні позначення: + наявність ефекту; – відсутність ефекту; +/- нерегулярна поява ефекту; ↑ стимулювання росту; ↓ уповільнення росту

З літературних даних відомо, що у рослин, які піддавались дії холодового стресу, проявляються різні фенотипічні симптоми, що включають: зниження швидкості росту, вкорочення листкової пластинки (Sowinski et al., 2005; Rymer et al., 2007), в'янення, пригнічення кушіння (Bagnall et al., 1983), пожовтіння листя (хлороз) (Yoshida et al., 1996), а також може призводити до смерті тканин (некроз) (Jiang et al., 2002; Ruelland and Zachowski, 2010). Нами також було виявлено значні порушення морфології кореня *A. thaliana* після впливу низьких температур (рис. 1).

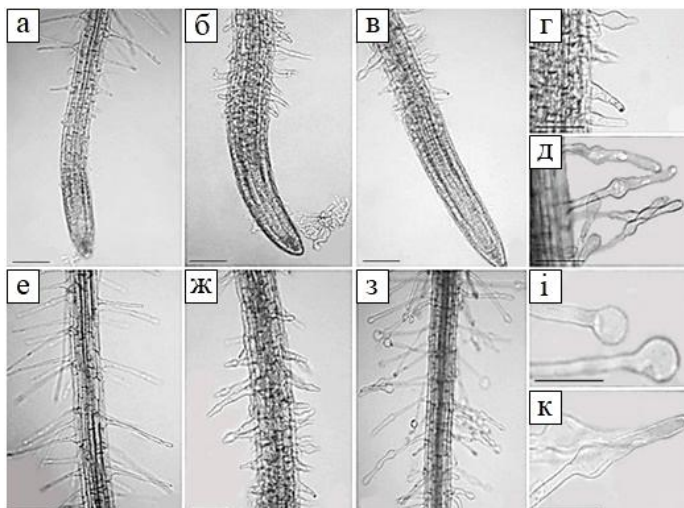


Рис. 1. Деформація кореневого апексу проростків *A. thaliana* після впливу температури +4°C: а, е – контроль; б, г, ж, і – через 24 год; в, д, з, к – через 48 год. Масштаб: 10 мкм (а, б, в, е, ж, з), 40 мкм (г, д), 100 мкм (і, к)

Зокрема, експозиція при температурі $+4^{\circ}\text{C}$ ініціює деформацію кореневого апексу, укорочення зони росту, а також розбухання та формування деформованих корневих волосків (рис. 1, б-д). За цих же умов спостерігалась поява великої кількості корневих волосків з порушеною морфологією в зоні диференціації (рис. 1, ж-к). Крім того, виявлено, що експозиція коренів *A. thaliana* при температурі $+0,5^{\circ}\text{C}$ спричиняє дещо інший ефект, який проявляється в анізотропному збільшенні діаметру (свелінг) епідермальних клітин перехідної зони та зони розтягу порівняно з необробленими зразками (рис. 2).



Рис. 2. Морфологічні зміни кореневого апексу проростків *A. thaliana* після експозиції при температурі $+0,5^{\circ}\text{C}$: а – контроль; б, г, д – через 24 год; в, е – через 48 год. Масштаб: 10 мкм (а, б, в), 40 мкм (г, д), 100 мкм (е)

В останнє десятиліття велику увагу приділяють дослідженню оксиду азоту як універсального вторинного посередника в клітинах еукаріотичних організмів, що проявляється в трансдукції хімічного сигналу у фізіологічну відповідь (Stamler, 1994). Раніше було показано, що дія високої температури на клітини люцерни призводить до посилення синтезу NO (Neil et al., 2003). Виявлено, що використання екзогенного NO при тепловому стресі у *Phaseolus radiatus* сприяє збереженню параметрів флуоресценції хлорофіла *a*, цілісності мембран, складу H_2O_2 і активності антиоксидативних ферментів без участі стресових факторів (Song et al., 2008). Нами було показано, що комбінований вплив холоду і донора NO SNP в концентрації 100 мкМ призводить до зникнення сильних пошкоджень у порівнянні з такими, що мають місце лише при дії холодового стресу. Зменшується кількість деформованих корневих волосків в зоні диференціації, не спостерігається розбухання корневих волосків як при експозиції проростків холодом (рис. 3, б-д).

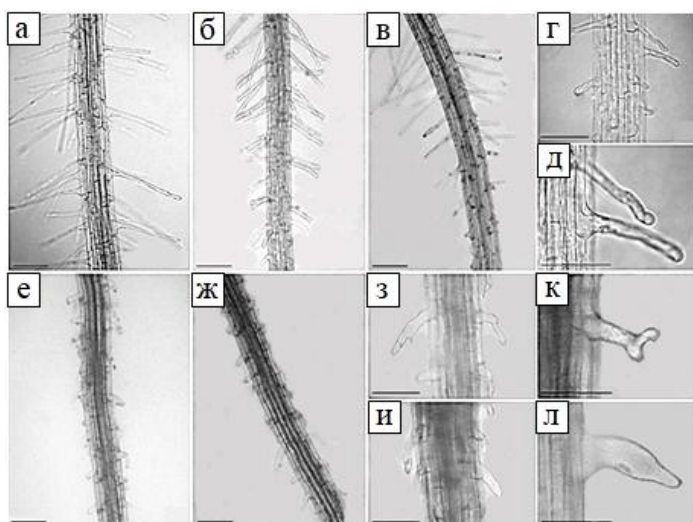


Рис. 3. Деформація кореневого апексу проростків *A. thaliana* після комбінованого впливу холоду ($+4^{\circ}\text{C}$) та донора NO SNP і скавенджера NO cPTIO: а – контроль; б-д – 100 мкМ SNP (б – 24 год, в – 48 год, г-д – 72 год); е-к – 100 мкМ cPTIO (е – 24 год, ж-и – 48 год, к-л – 72 год). Масштаб: 10 мкм (а, б, в, е, ж), 40 мкм (г, з, и), 100 мкм (д, к, л)

Зворотні зміни спостерігаються після комбінованої дії холоду і скавенджера NO сРТЮ в концентрації 100 мкМ. Вже через 24 год активно формуються численні зачатки корневих волосків з порушеною морфологією (рис. 3, е-ж), для частини з яких характерним є свелінг, інші кореневі волоски є розгалуженими або викривленими, їх подальший ріст припиняється (рис. 3, з-л). До того ж відбувається збільшення діаметру епідермальних клітин (свелінг) перехідної зони та власне зони розтягу. Іншими авторами також показано, що у присутності високої нефізіологічної концентрації сРТЮ (1 мМ) відбувається утворення зачатків корневих волосків у *A. thaliana* без їх подальшого росту (Lombardo et al., 2006). Zhao із співавт. (2003) повідомляють, що холодова акліматизація викликана підвищенням рівня синтезу ендогенного NO у дикого типу *A. thaliana* і в листках мутанта *Atnoa1/rif1*, в той час як рівень ендогенного оксиду азоту NR-дефектного подвійного мутанта *nialnia2* був нижчим, ніж у дикого типу.

Визначення впливу низьких температур на організацію актинових філаментів у клітинах головного кореня проростків *A. thaliana*. Виявлено, що в контрольних зразках епідермальних клітинах на рівні меристеми і клітинах власне меристеми мікрофіламенти представлені у вигляді тонкої високодинамічної сітчастої структури та розміщуються по всій цитоплазмі (рис. 4, а, б). В перехідній зоні кореня актинові філаменти мають вигляд пучків F-актину, що розміщуються навколо ядра і приєднуються поперечними тяжами до клітинної стінки (рис. 4, в). В зоні розтягу пучки F-актину також розміщуються навколо ядра, а біля поверхні клітини спостерігаються більш товсті і помітні нитки актину (рис. 4, г). На ранніх стадіях розвитку кореневого волоска формується густа сітка з пучків F-актину, що заповнює весь кортекс клітини. На більш пізньому етапі розвитку кореневого волоска пучки F-актину розтягуються в напрямку його росту і на самому апексі формують дуже тонку і динамічну сітку мікрофіламентів (рис. 4, д, е). Отримані результати добре узгоджуються з раніше описаними закономірностями організації актинових філаментів в клітинах кореня проростків *A. thaliana*, де GFP злитий з F-актин зв'язуючим доменом 2 (ABD) з гена фімбрину 1 (Wang et al., 2008; Voigt et al., 2005).

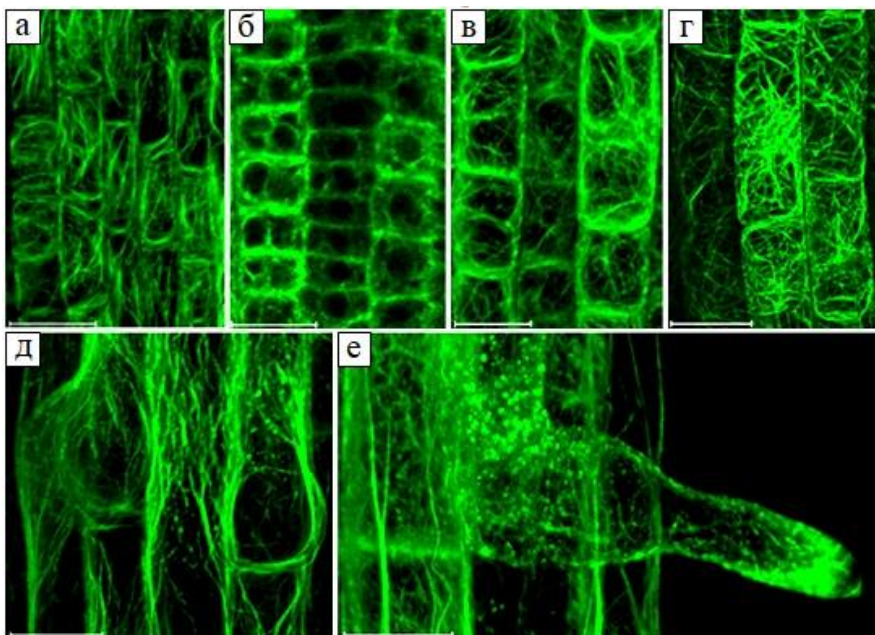


Рис. 4. Організація мікрофіламентів в різних типах клітин кореня *A. thaliana*: а – епідермальні клітини на рівні меристеми; б – клітини меристеми; в – клітини перехідної зони; г – клітини зони розтягу; д, е – клітини зони диференціації і кореневий волосок. Масштаб: 20 мкм

Встановлено, що обробка холодом коренів *A. thaliana* призводить до виражених змін вихідної організації актинових філаментів в клітинах всіх досліджуваних зон головного кореня. Вже через 1 год після початку експозиції при температурі $+4^{\circ}\text{C}$ в епідермальних клітинах на рівні меристеми можна спостерігати більш тонку невпорядковану та розріджену сітку мікрофіламентів (рис. 5, а). Клітини апікальної меристеми виявились досить чутливими до дії цієї температури, оскільки в них також фіксуються зміни вихідної орієнтації актинових філаментів, а також їх часткова деполімеризація (рис. 5, б). Нами також виявлено зміни організації мікрофіламентів після експозиції при температурі $+4^{\circ}\text{C}$ в епідермальних клітинах на рівні перехідної зони і зони розтягу кореня *A. thaliana*, де вони реорієнтувалися і ставали більш тонкішими і короткими у порівнянні з контролем (рис. 5, в). Після інкубації коренів при $+4^{\circ}\text{C}$ вже через 1 год в клітинах зони диференціації та корневих волосках спостерігали розрідження актинової сітки і часткову деполімеризацію мікрофіламентів (рис. 5, г, д).

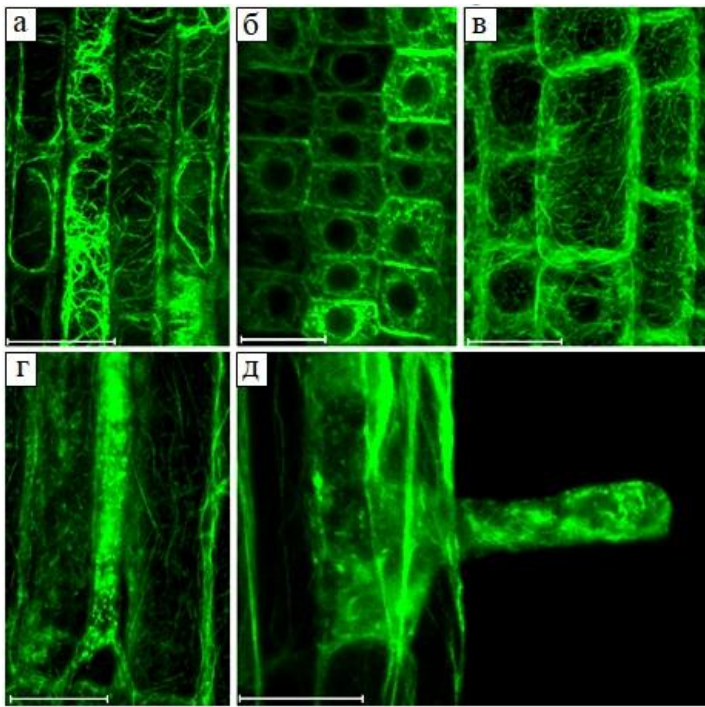


Рис. 5. Організація актинових філаментів у клітинах головного кореня проростків *A. thaliana* після 1 год експозиції при температурі $+4^{\circ}\text{C}$: а – епідермальні клітини на рівні меристеми; б – клітини меристеми; в – епідермальні клітини на рівні перехідної зони та зони розтягу; г, д – зона диференціації та корневий волосок. Масштаб: 20 мкм

Більш виражений вплив на організацію та орієнтацію актинових філаментів відмічався через 2 год експозиції при температурі $+4^{\circ}\text{C}$. Так, в епідермальних клітинах на рівні меристеми невпорядкована сітка мікрофіламентів ставала ще більш розрідженою, а в окремих клітинах можна було спостерігати їх деполімеризацію (рис. 6, а). Більш виражений вплив даної температури виявлено у клітинах апікальної меристеми, в яких спостерігали високий рівень невпорядкованості мікрофіламентів, а в окремих клітинах вони взагалі не візуалізувались, що свідчить про їх руйнування і повну деполімеризацію (рис. 6, б). В епідермальних клітинах на рівні перехідної зони та зони розтягу через 2 год експозиції при температурі $+4^{\circ}\text{C}$ спостерігали подальше розрідження актинової сітки, коли мікрофіламенти ставали видимі як короткі тонкі пучки F-актину, що свідчить про їх фрагментацію (рис. 6, в). Через 2 год при експозиції $+4^{\circ}\text{C}$ в корневих волосках можна було спостерігати лише яскраво забарвлені точкові структури або короткі пучки F-актину (рис. 6, г), що можливо і

являється причиною змін їх морфології і може приводити до порушення ініціювання росту і розвитку корневих волосків.

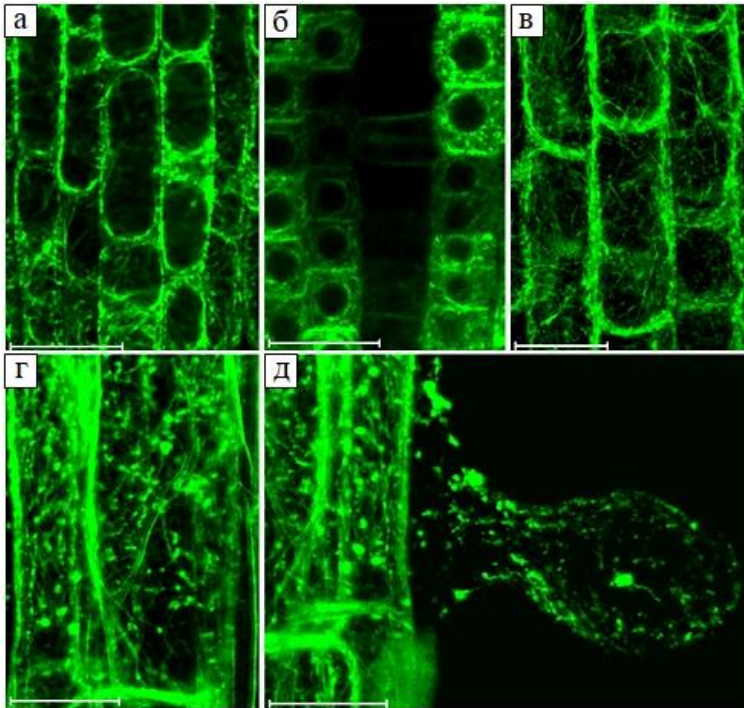


Рис. 6. Організація актинових філаментів у клітинах головного кореня проростків *A. thaliana* після 2 год експозиції при температурі $+4^{\circ}\text{C}$: а – епідермальні клітини на рівні меристеми; б – клітини меристеми; в – епідермальні клітини на рівні зони розтягу; г, д – зона диференціації та кореневий волосок. Масштаб: 20 мкм

Найбільш чутливими до впливу температури $+4^{\circ}\text{C}$ виявились мікрофіламенти клітин апікальної меристеми та кореневі волоски, менш чутливими – актинові філаменти клітин перехідної зони та зони розтягу. Отриманні нами дані узгоджуються з іншими дослідженнями, в яких також спостерігали деполімеризацію мікрофіламентів через короткі інтервали часу після обробки рослини низькими температурами, наприклад, у клітинах ріпаку та люцерни (Orvar et al., 2000; Sangwan et al., 2001). Раніше зміни організації мікрофіламентів під впливом холоду спостерігалися в пилкових трубках у груші (Wu et al., 2012).

На наступному етапі досліджень нами вивчались особливості впливу низької температури ($+0,5^{\circ}\text{C}$) на організацію актинових філаментів різних типів клітин кореня. В епідермальних клітинах на рівні меристеми після експозиції при цій температурі відбувається розрідження актинової сітки і зміна орієнтації актинових філаментів порівняно з вихідними закрученими і невпорядкованими тяжами (рис. 7, а). В той же час через 1 год експозиції при температурному режимі $+0,5^{\circ}\text{C}$ в клітинах апікальної меристеми спостерігали більш тонку рідку сітку актинових філаментів і її часткову деполімеризацію (рис. 7, б). У епідермальних клітинах на рівні перехідної зони і зони розтягу після обробки холодом актинові філаменти формували сітку з більш вираженою поперечною орієнтацією у порівнянні з вихідною невпорядкованою організацією (рис. 7, в). В трихобластах і атрихобластах зберігалась переважно вихідна організація мікрофіламентів, проте в деяких корневих волосках відбувались зміни організації мікрофіламентів з незначною їх деполімеризацією (рис. 7, г).

Ще більш суттєві зміни в організації актинових філаментів відмічались після 2 год експозиції при температурі $+0,5^{\circ}\text{C}$. Зокрема, в клітинах епідермісу на рівні меристеми (рис. 8, а) було відмічено майже повну деполімеризацію мікрофіламентів, при одночасній ретракції цитоплазми клітин, що вказує на сильний стрес, викликаний

дією холоду. Значні зміни торкнулись і клітин апікальної меристеми, в яких не формувались типові тяжі актинових філаментів, натомість візуалізувались окремі короткі неупорядковані пучки мікрофіламентів, а в деяких клітинах вони були взагалі відсутні (рис. 8, б).

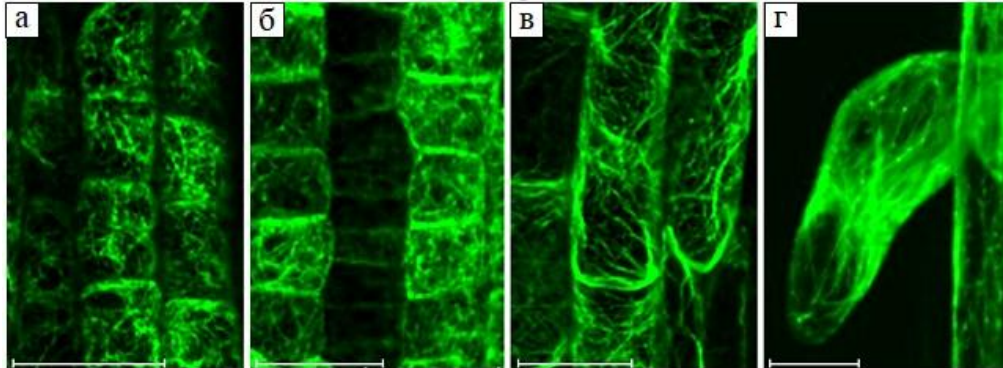


Рис. 7. Організація актинових філаментів у клітинах головного кореня проростків *A. thaliana* після 1 год експозиції при температурі $+0,5^{\circ}\text{C}$: а – епідермальні клітини на рівні меристеми; б – клітини апікальної меристеми; в – епідермальні клітини на рівні зони розтягу; г – кореневий волосок. Масштаб: 20 мкм

Сильна деполімеризація актинових філаментів була зафіксована в клітинах епідермісу зони розтягу, одночасно спостерігалось посилення неупорядкованості мікрофіламентів з частковою і повною їх деполімеризацією в деяких клітинах (рис. 8, в), що, можливо, є причиною порушення морфології кореня в даній області. В трихобластах і атрихобластах зони диференціації під впливом даної температури утворювалась сітка вкорочених і частково деполімеризованих мікрофіламентів, при цьому в корневих волосках через 2 год обробки холодом можна було спостерігати лише короткі пучки F-актину. Найбільш чутливими до дії даної температури виявились мікрофіламенти зони розтягу та кореневі волоски, найменш чутливими – актинові філаменти в клітинах апікальної меристеми.

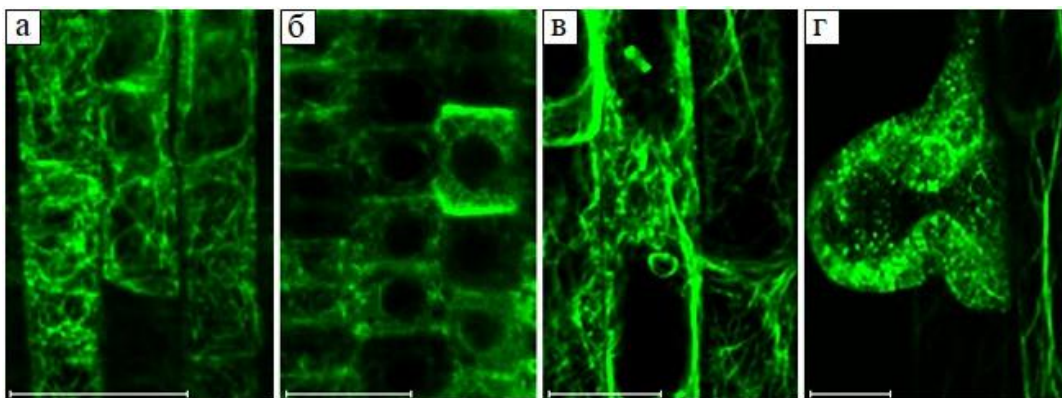


Рис. 8. Організація актинових філаментів у клітинах головного кореня проростків *A. thaliana* після 2 год експозиції при температурі $+0,5^{\circ}\text{C}$: а – епідермальні клітини на рівні меристеми; б – клітини меристеми; в – епідермальні клітини на рівні зони розтягу; г – кореневий волосок. Масштаб: 20 мкм

Раніше при вивченні дії холодового фактора на мікрофіламенти рослинної клітини було встановлено, що експозиція культури клітин *N. tabacum* BY-2 при 0°C протягом 5 хв приводила до зникнення радіальних тяжів мікрофіламентів, а через 20 хв – до формування неупорядкованої сітки товстих і розгалужених структур. Ця сітка ставала більш розрідженою через 6 год обробки холодом, а через 12 год в оброблених холодом клітках спостерігали яскраві точкові тяжі або окремі скупчення актину по периферії клітини і навколо її ядра (Pokorná et al., 2004). У клітинах культури озимого ріпаку під дією низьких температур порушується актинова сітка і мікрофіламенти деполімеризуються (Egiersztorff & Kasperska, 2001).

Комбінований вплив низьких температур та донора (SNP) і скавенджера (сРТЮ) оксиду азоту на організацію мікрофіламентів в клітинах головного кореня проростків *A. thaliana*. У результаті проведених експериментів виявлено, що після комбінованого впливу температури +4°C та SNP в концентрації 100 мкМ вже через 1 год відбувається часткове відновлення сітки актинових філаментів в епідермальних клітинах на рівні меристеми, утворюються тонкі закручені актинові тяжі, що рівномірно заповнюють весь об'єм клітини (рис. 9, а). Комбінований вплив температури +4°C і донора NO також призводить до відновлення сітки актинових філаментів в клітинах власне меристеми. Спостерігається зменшення клітин з частковою і повною деполімеризацією мікрофіламентів, які знову починають закручуватись і скупчуватись, утворюючи сітку навколо ядра клітини (рис. 9, б). Після комбінованого впливу SNP і низької температури (+4°C) в клітинах зони розтягу скупчення ниток в товсті пучки не спостерігається, а відбувається їх дезорієнтація і реорієнтація у порівнянні з контрольними зразками (рис. 9, в). В клітинах зони диференціації та кореневих волосках актинові філаменти скупчуються і заповнюють весь об'єм клітини, візуалізуються у вигляді сітчастої структури (рис. 9, г, д).

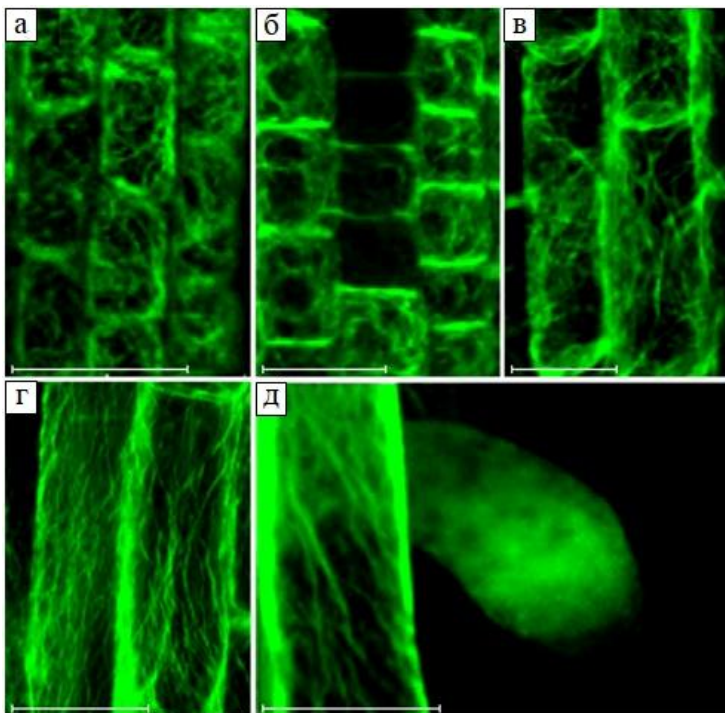


Рис. 9. Вплив низької температури (+4°C) та донора NO SNP (100 мкМ) на організацію мікрофіламентів в клітинах головного кореня *A. thaliana*: а – епідермальні клітини на рівні меристеми; б – клітини меристеми; в – епідермальні клітини на рівні зони розтягу; г, д – зона диференціації та кореневий волосок. Масштаб: 20 мкм

Комбінований вплив температури +0,5°C та донора оксиду азоту SNP в концентрації 100 мкМ також призводить до часткового відновлення сітки

мікрофіламентів, але в меншій мірі, що, очевидно, пов'язано із зниженням температури. В епідермальних клітинах апікальної меристеми та в клітинах власне меристеми можна спостерігати скупчення ниток в пучки, їх дезорієнтацію і реорієнтацію у порівнянні з контрольними зразками (рис. 10, а, б). Після комбінованої дії температури $+0,5^{\circ}\text{C}$ та SNP в концентрації 100 мкМ в клітинах зони розтягу відбувається заповнення всього об'єму клітин актиновими філаментами у вигляді тонкої сітчастої структури. У цьому випадку вони мають вигляд тонких тяжів, яким в основному притаманна поздовжня орієнтація (рис. 10, в). В корневих волосків після комбінованої дії температури $+0,5^{\circ}\text{C}$ та SNP в концентрації 100 мкМ спостерігались залишки F-актину по периферії клітин, що також свідчить про початковий етап відновлення актинових філаментів (рис. 10, г, д).

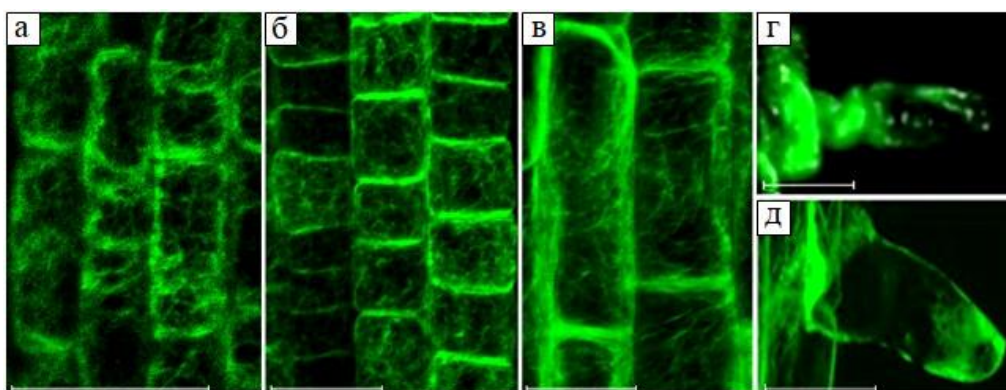


Рис. 10. Вплив низької температури ($+0,5^{\circ}\text{C}$) та донора NO SNP (100 мкМ) на організацію актинових філаментів в клітинах головного кореня проростків *A. thaliana*: а – епідермальні клітини на рівні меристеми; б – клітини меристеми; в – епідермальні клітини на рівні зони розтягу; г, д – кореневі волоски. Масштаб: 20 мкм

Зміни нативної організації актинових філаментів в різних зонах головних коренів *A. thaliana* також відбувались і після обробки проростків скавенджером оксиду азоту сРТЮ, однак вони носили інший характер. Так, після попередньої обробки сРТЮ (100 мкМ) мікрофіламенти набували неупорядкованої організації одночасно з їх частковою деполімеризацією та фрагментацією. Після комбінованого впливу холоду ($+4^{\circ}\text{C}$, $+0,5^{\circ}\text{C}$) та сРТЮ (100 мкМ) мікрофіламенти в епідермальних клітинах на рівні меристеми і власне клітинах меристеми не візуалізувались взагалі, що свідчить про їх руйнування і повну деполімеризацію в даній області (рис. 11, а, б). Після обробки сРТЮ в концентрації 100 мкМ в клітинах зони розтягу актинова сітка розріджувалась і частково деполімеризувалась. Після комбінованого впливу холоду та сРТЮ (100 мкМ) відбувалась деполімеризація актинової сітки, лише в окремих клітинах можна було спостерігати довгі поодинокі тяжі мікрофіламентів (рис. 11, в). В корневих волосках комбінована дія низької температури і сРТЮ призводила до більш сильних змін, що супроводжувалось руйнуванням актинових філаментів. Лише на периферії клітини можна було спостерігати короткі точкові структури F-актину (рис. 11, г, д). Зміни вихідної організації актинових філаментів в різних типах клітин головних коренів *A. thaliana* внаслідок обробки холодом та донором (SNP) і скавенджером (сРТЮ) оксиду азоту підсумовані в таблиці 2.

Раніше було показано, що NO опосередковує реорганізацію мікротрубочок як одного з основних компонентів цитоскелету, що є рушійною силою морфогенезу. Було виявлено стимулюючий вплив донора NO SNP в концентраціях 10-500 мкМ на ріст коренів, що узгоджується зі зміною орієнтації та організації мікротрубочок у клітинах певних ростових зон кореня проростків *A. thaliana* (Красиленко и др., 2011). В онтогенезі рослин NO залучається до відповіді на стресові фактори різної природи, але найбільш важливо, що NO є незамінним учасником реалізації фізіологічних програм також і при відсутності впливу стресових факторів.

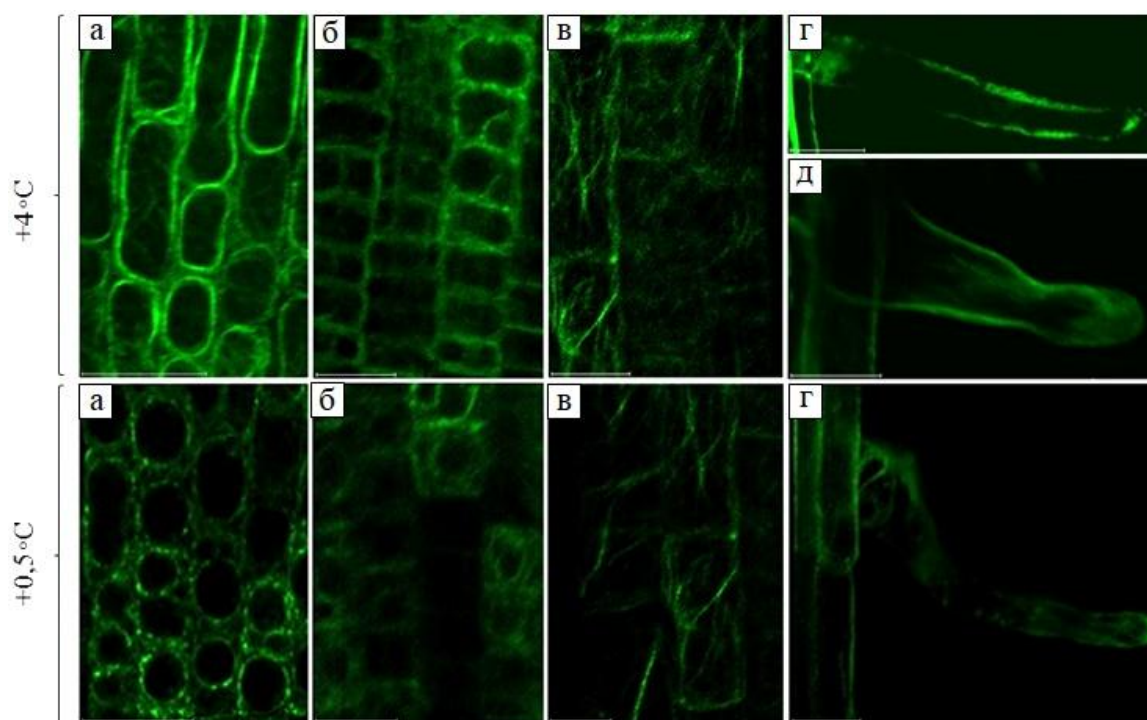


Рис. 11. Вплив низьких температур (+4°C, +0,5°C) та скавенджера NO сРТЮ (100 мкМ) на організацію актинових філаментів в клітинах головного кореня *A. thaliana*: а – епідермальні клітини на рівні меристеми; б – клітини меристеми; в – епідермальні клітини на рівні зони розтягу; г – кореневі волоски. Масштаб: 20 мкм

Наші дані вперше демонструють залежність прижиттєвої організації мікрофіламентів у різних типах клітин кореня проростків *A. thaliana* від комбінованого впливу низьких температур та ендогенного NO, вміст якого регулюється донором (SNP) і скавенджером (сРТЮ) оксиду азоту. Сигнал від холоду може передаватись на актинові філаменти за допомогою NO, викликаючи зміни їх організації та орієнтації залежно від температури. Таким чином, взаємозв'язок між низькими температурами, NO та актиновими філаментами може полягати в залученні їх до загального внутрішньоклітинного сигнального каскаду, що регулює відповідь клітин на вплив факторів зовнішнього середовища.

Схематичне зображення змін організації мікрофіламентів у клітинах коренів *A. thaliana* після дії холоду та донора (SNP) і скавенджера (сРТЮ) оксиду азоту

Показники температури та тип донора/скавенджера NO	Кореневий апекс		Перехідна зона		Зона розтягу		Зона диференціації		
	епі-дерміс	меристема	епі-дерміс	кора	епі-дерміс	кора	трихобласти	атрихобласти	кореневі волоски
Контроль									
+4°C									
+0,5°C									
SNP									
сРТЮ									
+4°C+SNP									
+4°C+сРТЮ									
+0,5°C+SNP									
+0,5°C+сРТЮ									

Умовні позначення положення актинових філаментів відносно основної осі кореня: – нативна гетерогенна; – повздовжня/навскісна; – радіальна; – неупорядкована; – деполімеризація. У кореневих волосках: – повздовжня; – неупорядкована; – актинові філаменти не візуалізуються

Узагальнення впливу низьких температур та екзогенного NO на орієнтацію мікрофіламентів в клітинах головного кореня проростків *A. thaliana*. Аналіз конфокальних зображень клітин з різних зон кореня *A. thaliana* за допомогою програмного забезпечення MFA уточнює та суттєво доповнює інформацію щодо впливу досліджуваних температур на організацію актинових філаментів. В результаті проведеного аналізу встановлено, що під дією холоду в епідермальних клітинах на рівні меристеми орієнтація мікрофіламентів з часом поступово змінюється з випадкової на повздовжню, а в клітинах власне меристеми та перехідної зони – з випадкової на переважно поперечну. В клітинах зони розтягу після впливу понижених температур орієнтація актинових філаментів змінюється з хаотичної на переважно

повздовжню. В корневих волосках в основному зберігалася повздовжня та коса орієнтація по відношенню до основної осі кореня (рис. 12).

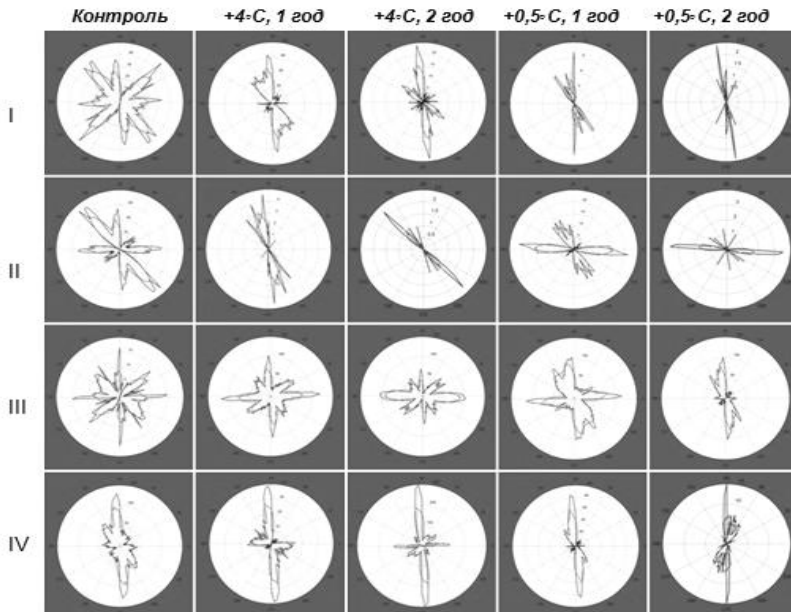


Рис. 12. Результати аналізу орієнтації мікрофіламентів за допомогою програми MFA в різних типах клітин кореня *A. thaliana* після впливу низьких температур: I – епідермальні клітини на рівні меристеми; II – клітини меристеми; III – зона розтягу; IV – кореневі волоски

За допомогою програми MFA встановлено, що після комбінованої дії температури $+0,5^{\circ}\text{C}$ та скавенджера NO сРТЮ в концентрації 100 мкМ в епідермальних клітинах на рівні меристеми орієнтація актинових філаментів з часом поступово змінюється з випадкової на повздовжню, а після комбінованого впливу температури $+0,5^{\circ}\text{C}$ і донора NO SNP в концентрації 100 мкМ – на навскісну (рис.13, I). В клітинах меристеми та перехідної зони після комбінованої дії температури $+0,5^{\circ}\text{C}$ та сРТЮ (100 мкМ) відбувається перехід від випадкової до переважно повздовжньої орієнтації, а після комбіновано впливу холоду і SNP (100 мкМ) зберігається випадкова організація актинових філаментів (рис. 13, II).

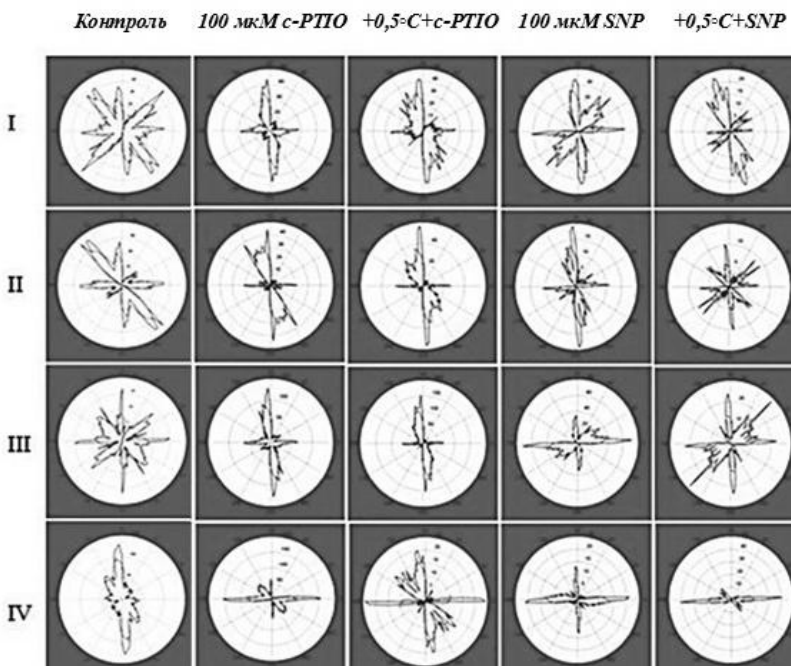


Рис. 13. Результати аналізу орієнтації мікрофіламентів за допомогою програми MFA в різних типах клітин кореня *A. thaliana* після комбінованого впливу температури $+0,5^{\circ}\text{C}$ (1 год) та донора (SNP) і скавенджера (сРТЮ) оксиду азоту: I – епідермальні клітини на рівні меристеми; II – клітини меристеми; III – зона розтягу; IV – кореневі волоски

В клітинах зони розтягу після комбінованого впливу температури $+0,5^{\circ}\text{C}$ та скавенджера NO сРТЮ в концентрації 100 мкМ хаотична організація мікрофіламентів

змінюється на переважно повздовжню орієнтацію, яка зберігається також і після комбінованого впливу холоду та донора NO SNP в концентрації 100 мкМ (рис. 13, III). В корневих волосках після комбінованої дії температури +0,5°C та сРТЮ (100 мкМ) повздовжня орієнтація змінюється на навскісну, а після комбінованого впливу холоду і SNP (100 мкМ) зберігається поперечна орієнтація мікрофіламентів по відношенню до основної осі кореня (рис. 13, IV).

Також встановлено, що зміни орієнтації мікрофіламентів відбуваються після комбінованого впливу температури +4°C та донора/скавенджера NO (SNP/сРТЮ). Виявлено, що після комбінованої дії температури +4°C та донора NO SNP в концентрації 100 мкМ в епідермальних клітинах на рівні меристеми орієнтація актинових філаментів з часом поступово змінюється з випадкової на поперечну, а після комбінованого впливу температури +4°C та скавенджера NO сРТЮ в концентрації 100 мкМ зберігаються поодинокі пучки F-актину з хаотичною орієнтацією (рис. 14, I). В клітинах меристеми орієнтація актинових філаментів після комбінованого впливу холоду (+4°C) та донора NO (SNP) змінюється з випадкової на переважно повздовжню, а комбінована дія температури +4°C та скавенджера NO (сРТЮ) призводить до переорієнтації актинових філаментів, які набувають в основному косої орієнтації (рис. 14, II). В клітинах зони розтягу після комбінованого впливу температури +4°C та донора NO SNP (100 мкМ) напрямок орієнтації актинових філаментів змінюється від хаотичного на переважно поперечний, а після комбінованого впливу холоду (+4°C) та скавенджера NO сРТЮ (100 мкМ) в клітинах зберігається хаотична орієнтація мікрофіламентів (рис. 14, III).

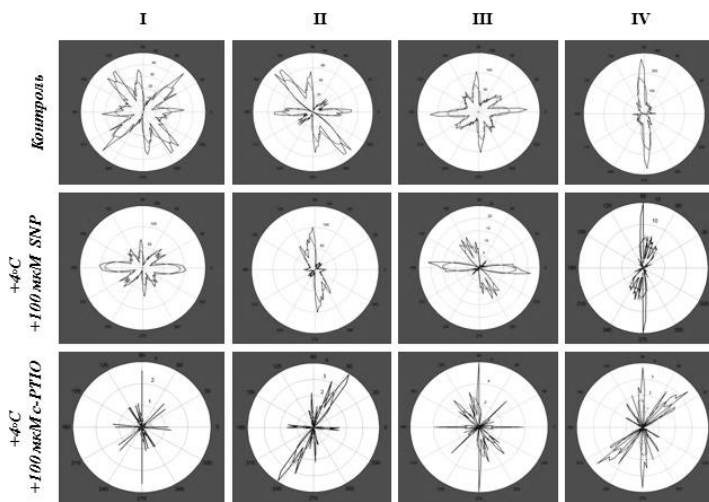


Рис. 14. Результати аналізу орієнтації мікрофіламентів за допомогою програми MFA в різних типах клітин кореня *A. thaliana* після комбінованого впливу температури +4°C (1 год) та донора (SNP) і скавенджера (сРТЮ) оксиду азоту: I – епідермальні клітини на рівні меристеми; II – клітини меристеми; III – зона розтягу; IV – кореневі волоски

В клітинах зони диференціації кореня, зокрема в клітинах корневих волосків, повздовжня орієнтація актинових філаментів зберігається після комбінованої дії холоду (+4°C) та донора NO SNP в концентрації 100 мкМ, а при комбінованій дії температури +4°C та скавенджера NO сРТЮ в концентрації 100 мкМ відбувається реорієнтація мікрофіламентів, які при цьому набувають в основному повздовжньої та косої орієнтації по відношенню до основної осі кореня (рис. 14, IV). Раніше за допомогою програми MFA було також узагальнено закономірності організації мікротрубочок в епідермальних клітинах на рівні зони розтягу кореня *A. thaliana* під час гравістимуляції (Jacques et al., 2013 a).

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі узагальнено взаємозв'язок між дією холоду на морфологію та ріст головного кореня проростків *Arabidopsis thaliana* і прижиттєвими змінами організації та орієнтації актинових філаментів в різних типах клітин кореня під впливом холодowego фактору, а також отримано експериментальні докази залучення оксиду азоту до реалізації відповіді рослинної клітини на дію цього стресового фактору за участі мікрофіламентів.

1. Показано, що процеси росту та диференціації головного кореня *A. thaliana* є чутливими до змін температури. Так, вплив низьких температур $+4^{\circ}\text{C}$ та $+0,5^{\circ}\text{C}$ інгібує ріст головного кореня та утворення кореневих волосків. Встановлено, що попередня обробка проростків *A. thaliana* донором оксиду азоту SNP (100 мкМ) за умов подальшого впливу вище зазначених низьких температур сприяє відновленню активності росту та початкової морфології головного кореня.

2. Показано, що експозиція проростків при температурі $+4^{\circ}\text{C}$ ініціює формування деформованих кореневих волосків та збільшення їх кількості у зоні диференціації, а при температурі $+0,5^{\circ}\text{C}$ виникає свелінг епідермальних клітин на рівні зони розтягу кореня. Виявлено, що комбінований вплив холоду ($+4^{\circ}\text{C}$; $+0,5^{\circ}\text{C}$) та скавенджера оксиду азоту сРТЮ (100 мкМ) призводить до формування численних зачатків кореневих волосків з порушеною морфологією, для частини з яких характерний свелінг, інші є розгалуженими або викривленими, їх подальший ріст припиняється. За цих умов також відбувається свелінг епідермальних клітин перехідної зони та власне зони розтягу кореня *A. thaliana*.

3. Виявлено, що низькі температури ($+4^{\circ}\text{C}$; $+0,5^{\circ}\text{C}$) призводять до змін вихідної організації актинових філаментів у різних типах клітин головного кореня проростків *A. thaliana*. Найбільш чутливими до впливу температури $+4^{\circ}\text{C}$ виявились кореневі волоски, де можна було спостерігати лише точкові структури або короткі пучки F-актину, що можливо і являється причиною змін їх морфології і може приводити до порушення ініціювання росту та розвитку кореневих волосків. При експозиції при температурі $+0,5^{\circ}\text{C}$ найбільш чутливими виявились мікрофіламенти зони розтягу, де спостерігали сильну невпорядкованість актинових філаментів з частковою і повною їх деполімеризацією в деяких клітинах. Ці зміни, можливо, є причиною порушення морфології кореня в даній області, а саме розбухання епідермальних клітин на рівні зони розтягу кореня *A. thaliana*.

4. Показано, що комбінований вплив низьких температур ($+4^{\circ}\text{C}$; $+0,5^{\circ}\text{C}$) та SNP в концентрації 100 мкМ сприяє частковому відновленню сітки актинових філаментів. За умов такої комбінованої дії спостерігається зменшення кількості клітин із частковою і повною деполімеризацією мікрофіламентів. Актинові філаменти знову починають закручуватись та заповнюють весь об'єм клітини, візуалізуються у вигляді сітчастої структури. Отримані результати свідчать про функціональний взаємозв'язок між змінами внутрішньоклітинного вмісту NO та організацією актинових філаментів при дії холоду на рослину.

5. Встановлено, що комбінований вплив низьких температур ($+4^{\circ}\text{C}$; $+0,5^{\circ}\text{C}$) та сРТЮ в концентрації 100 мкМ посилює хаотизацію мікрофіламентів і призводить до їх руйнування і повної деполімеризації в різних типах клітин кореня *A. thaliana*, що

опосередковано свідчить про залучення зниження внутрішньоклітинної концентрації ендogenous NO до регуляції процесів руйнування мікрофіламентів.

6. Виявлено, що в результаті впливу низьких температур (+4°C, +0,5°C) в клітинах епідерми на рівні меристеми головного кореня *A. thaliana* орієнтація мікрофіламентів поступово змінюється з випадкової на повздовжню, а в клітинах меристеми та перехідної зони кореня – з випадкової на переважно поперечну. В клітинах зони розтягу орієнтація актинових філаментів змінюється з хаотичної на переважно повздовжню, а в кореневих волосках в основному зберігається повздовжня та коса орієнтація відносно основної осі кореня.

7. Виявлено закономірності змін орієнтації мікрофіламентів в клітинах різних зон головного кореня проростків *A. thaliana* після комбінованого впливу низьких температур (+4°C, +0,5°C) та донора (SNP) і скавенджера (сРТЮ) оксиду азоту. Показано, що під впливом холоду та комбінованого впливу змін концентрації ендogenous NO, індукованих дією оксиду азоту відбувається не тільки розрідження динамічної актинової сітки та зміни просторових характеристик полімеризації/деполімеризації актину в клітинах різних зон кореневого апексу, але й диференційно змінюється орієнтація актинових філаментів відносно основної осі кореня.

8. Узагальнені закономірності змін орієнтації актинових філаментів в різних типах клітин головного кореня *A. thaliana* свідчать як про чіткі ефекти впливу низьких температур (+4°C, +0,5°C) (залежно від температури), так і про вплив індукованих змін внутрішньоклітинного вмісту оксиду азоту на орієнтацію мікрофіламентів. Таким чином, встановлені закономірності змін орієнтації актинових філаментів в різних типах клітин головного кореня можуть розглядатись як важливий елемент внутрішньоклітинних механізмів інгібування росту головного кореня і утворення корневих волосків *A. thaliana* під впливом низьких температур та відновлення цих процесів шляхом індукції внутрішньоклітинних сигнальних шляхів за участю оксиду азоту.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ НАУКОВИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Плоховская С.Г. Участие актиновых филаментов в ответе клеток корня *Arabidopsis thaliana* на действие низкой температуры / С.Г. Плоховская, В.А. Заславский, А.И. Емец, Я.Б. Блюм // Доп. НАН України. – 2015, № 7. – С. 137-143. (Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).

2. Плоховська С.Г. Вивчення ролі NO та актинових філаментів у відповіді рослин на дію холоду / С.Г. Плоховська, Ю.А. Красиленко, А.І. Ємець, Я.Б. Блюм // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. / [гол. ред. В.А. Кунах]. – К.: Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова. – 2015. – Т. 17. – С. 236-240. (Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).

3. Плоховська С.Г. Аналіз просторової організації мікрофіламентів у відповіді рослин на дію холоду за використання програми Microfilament Analyzer / С.Г. Плоховська, О.А. Кравець, Я.Б. Блюм, А.І. Ємець // Фактори експериментальної

еволюції організмів: зб. наук. пр. / [гол. ред. В.А. Кунах]. – К.: Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова. – 2016. – Т. 19. – С. 176-181. (Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).

4. Plohovska S.G. Influence of cold on organization of actin filaments of different types of root cells in *Arabidopsis thaliana* / S.G. Plohovska, A.I. Yemets, Ya.B. Blume // *Cytol. Genet.* – 2016. – Vol. 50, N 5. – P. 318-323. (Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).

5. Plohovska S.G. Low temperature effects on actin filament organization in *Arabidopsis thaliana* primary root cells / S.G. Plohovska, Yu.A. Krasylenko, A.I. Yemets // *Cell. Biol. Int.* – 2017. – doi: 10.1002/cbin.10931. (Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).

6. Плоховська С.Г. Вплив низьких температур на актинові філаменти клітин кореня *Arabidopsis thaliana* / С.Г. Плоховська, А.І. Ємець // Мат-ли II Міжнародної науково-практичної конференції «Природничі та медичні науки: актуальні проблеми і перспективи розвитку», 14 листопада 2013, Київ, Україна: Центр науково-практичних студій, 2013. – С.16-18.

7. Плоховська С.Г. З'ясування участі актинових філаментів у відповідь на холод клітин кореня *Arabidopsis thaliana* / С.Г. Плоховська, Ю.А. Красиленко, А.І. Ємець, Я.Б. Блюм // Міжнародна конференція «Геноміка рослин та біотехнологія» та Друга конференція молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія», 23-24 грудня 2013, Київ, Україна: тези доп. – Київ, 2013. – С. 50.

8. Плоховська С.Г. Дослідження впливу низьких температур на актинові філаменти клітин *Arabidopsis thaliana* // С.Г. Плоховська, А.І. Ємець // Міжнародна науково-практична конференція молодих вчених «Проблеми і перспективи дослідження рослинного світу», 13-16 травня 2014, Ялта, Україна: мат-ли. – Ялта, 2014. – С. 236.

9. Плоховська С.Г. Дослідження впливу холоду на актинові філаменти клітин *Arabidopsis thaliana* // С.Г. Плоховська, А.І. Ємець // XI Український біохімічний конгрес, 6-10 жовтня 2014, Київ, Україна: мат-ли. – *Ukr. Biochem. J.* – 2014. – Vol. 86, № 5 (Suppl. 1). – P. 193.

10. Plohovska S.G. Low temperature effects actin filaments in *Arabidopsis thaliana* root cells / S.G. Plohovska, A.I. Yemets // International Symposium on Cell Biology jointly with 4th Ukrainian Congress for Cell Biology, 17-20 September 2014, Uzhhorod, Ukraine: Abstracts. – Kyiv, 2014. – P. 49.

11. Плоховская С.Г. Выяснение роли актиновых филаментов в механизмах холодоустойчивости *Arabidopsis thaliana* / С.Г. Плоховская, А.И. Емец // VI Международная научно-практическая конференция «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира», 12-17 октября 2014, Ялта, Республика Крым, Украина: мат-лы. – Симферополь: ИТ «АРИАЛ», 2014. – С. 252-253.

12. Плоховська С.Г. Вплив холоду на актинові філаменти клітин кореня *Arabidopsis thaliana* / С.Г. Плоховська, А.І. Ємець // III Міжнародна наукова конференція «Регуляція росту і розвитку рослин: фізіолого-біохімічні і генетичні аспекти», 11-12 листопада 2014, Харків, Україна: тези доп. – Харків, 2014. – С. 128.

13. Плоховська С.Г. Вплив перехоплювача NO та холоду на організацію актинових філаментів в клітинах кореня *Arabidopsis thaliana* / С.Г. Плоховська, А.І. Ємець, Я.Б.

Блюм // Міжнародна науково-практична конференція «Актуальні питання розвитку біології та екології», 3-7 жовтня 2016, Вінниця, Україна: мат-ли. – Вінниця, 2016. – С. 264-267.

14. Плоховська С.Г. Комбінована дія холоду та донора чи перехоплювача NO на організацію актинових філаментів у клітинах кореня *Arabidopsis thaliana* / С.Г. Плоховська, А.І. Ємець, Я.Б. Блюм // Третя конференція молодих учених «Біологія рослин і біотехнологія», 16-18 травня 2017, Київ, Україна: тези доп. – Київ, 2017. – С. 29.

15. Plohovska S.G. Study of spatial organization of plant actin filaments after cold treatment by microfilament Analyzer program / S.G. Plohovska, A.I. Yemets, Ya.B. Blume // IV International Conference «Plant ontogenesis in natural and transformed environments. Physiological, Biochemical and Ecological Aspects», 4-6 October 2017, Lviv, Ukraine: Abstracts. – Lviv: Studia Biologica, 2017. – Vol. 11, N 3-4. – P. 76–77.

АНОТАЦІЯ

Плоховська С.Г. Захисна роль оксиду азоту від впливу низьких температур на організацію актинових філаментів *Arabidopsis thaliana*. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія. – Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», Київ, 2018.

Розглянуто питання участі цитоскелету, а саме мікрофіламентів, як однієї з важливих внутрішньоклітинних мішеней для реалізації впливу оксиду азоту (NO) на клітину. Виявлено, що одночасно з інгібуючим впливом низьких температур (+4°C; +0,5°C) на ріст первинних коренів *A. thaliana* відбувається утворення великої кількості деформованих (ектопічних) кореневих волосків в зоні диференціації при +4°C та анізотропне збільшення діаметру епідермальних клітин (свелінг) зони розтягу при +0,5°C. Так, низькі температури призводять до виражених змін вихідної організації та орієнтації актинових філаментів (мікрофіламентів) у різних типах клітин кореня *A. thaliana*. Також показано, що комбінований вплив низьких температур (+4°C; +0,5°C) та SNP в концентрації 100 мкМ сприяє відновленню сітки актинових філаментів, тоді як комбінований вплив холоду та сРТЮ в концентрації 100 мкМ посилює хаотизацію мікрофіламентів і призводить до їх руйнування і повної деполімеризації. Отримані результати свідчать про існування функціонального взаємозв'язку між змінами внутрішньоклітинного вмісту NO та організацією актинових філаментів при дії холоду на рослинну клітину. Це дозволяє зробити висновок, що мікрофіламенти є важливим посередником в реалізації дії холоду на рослинну клітину, а NO залучається до відповіді клітини на дію низьких температур шляхом сигналізації через ці цитоскелетні структури.

Ключові слова: цитоскелет рослин, актинові філаменти (мікрофіламенти), низькі температури, оксид азоту, донор NO, нітропрурид натрію (SNP), скавенджер NO, карбокси-2-феніл-4,4,5,5-тетраметилімідазолін-1-оксил-3-оксид (сРТЮ), реорганізація мікрофіламентів.

АННОТАЦИЯ

Плоховская С.Г. Защитная роль оксида азота от влияния низких температур на организацию актиновых филаментов *Arabidopsis thaliana*. – Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.11 – цитология, клеточная биология, гистология. – Государственное учреждение «Институт пищевой биотехнологии и геномики Национальной академии наук Украины», Киев, 2018.

Рассмотрены вопросы участия цитоскелета, а именно микрофиламентов, как одной из важных внутриклеточных мишеней для реализации воздействия оксида азота (NO) на клетку. Обнаружено, что одновременно с ингибирующим влиянием низких температур (+4°C; +0,5°C) на рост первичных корней *A. thaliana* происходит образование большого количества деформированных (эктопических) корневых волосков в зоне дифференциации при +4°C та анизотропное увеличение диаметра эпидермальных клеток зоны растяжения при +0,5°C. Так, низкие температуры приводят к выраженным изменениям исходной организации и ориентации актиновых филаментов (микрофиламентов) в различных типах клеток корня *A. thaliana*. Также показано, что комбинированное воздействие низких температур (+4°C; +0,5°C) и SNP в концентрации 100 мкМ способствует восстановлению сетки актиновых филаментов, тогда как комбинированное воздействие холода и сРТЮ в концентрации 100 мкМ усиливает хаотизации микрофиламентов и приводит к их разрушению и полной деполимеризации. Полученные результаты свидетельствуют о существовании функциональной взаимосвязи между изменениями внутриклеточного содержания NO и организацией актиновых филаментов при воздействии холода на растительную клетку. Это позволяет сделать вывод, что микрофиламенты является важным посредником в реализации действия холода на растительную клетку, а NO привлекается к ответу клетки на действие низких температур путем сигнализации через эти цитоскелетные структуры.

Ключевые слова: цитоскелет растений, актиновые филаменты (микрофиламенты), низкие температуры, оксид азота, донор NO, нитропрурид натрия (SNP), скавенджер NO, карбокси-2-фенил-4,4,5,5-тетраметилимидазолин-1-оксил-3-оксид (сРТЮ), реорганизация микрофиламентов.

SUMMARY

Plokhovska S.H. The protective role of nitric oxide from the low temperatures influence on the organization of actin filaments of *Arabidopsis thaliana*. – Manuscript.

Thesis for the degree of Candidate of Biological Sciences (Ph.D) on a speciality 03.00.11 – cytology, cell biology, histology. – Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2018.

The role of cytoskeleton as one of nitric oxide (NO) downstream targets is gaining the increasing recognition because of its involvement in plenty of NO-controlled processes in plants throughout the entire life cycle – starting from seed germination to pollination as well as (a)biotic stress tolerance. It has been revealed that low temperature has an inhibitory effect on *A. thaliana* primary root growth and causes an anisotropic increase of epidermal

cells diameter in elongation zone (+0.5°C) and a formation of large number of deformed (ectopic) root hairs in differentiation zone (+4°C). Cold treatment of *A. thaliana* roots resulted in distinct changes in the initial organization of actin filaments in the cells of all studied zones of the primary root. A thinner and sparser network of actin filaments in epidermal cells of the meristematic zone after 1 h from the beginning of exposure at +4°C and its partial depolymerization after 2 h was observed. In the elongation zone of *A. thaliana* actin filaments reoriented after 1 h exposure, and after 2 h became thinner and were visible as short bundles of F-actin. It was found that the increased sensitivity to cold (+4°C) was typical for actin filaments in the cells of differentiation zone and root hairs. Thin actin network and a partial depolymerization of microfilaments were observed after 1 h and after 2 h only brightly colored dot structures or short bundles of F-actin could be seen. A change in orientation of the actin filaments in epidermal cells of the root apex after cold treatment with +0.5°C took place after 1 h exposition and after 2 h of cold treatment, disordered network of microfilaments became sparser and its partial depolymerization was observed. After 1 h cold treatment of root thinner and sparser network of actin filaments in meristematic cells was noted and in some cells their complete depolymerization after 2 h was observed. Microfilaments in epidermal cells of the elongation zone formed network with more pronounced transverse orientation after 1 h treatment with +0.5°C and after 2 h partial or complete depolymerization of microfilaments in same cells was observed. Actin filaments network in cells of root hairs is gradually becoming rare only bright shining rods or point of actin were observed and after 2 h of cold treatment at +0.5°C a bright stains of F-actin and a partial depolymerization of microfilaments were observed which can lead to disruption in initiation of root hairs formation and growth.

On next step of our research the low temperature and NO donor or scavenger combined effects on the actin filaments organization in primary root cells of *A. thaliana* were studied. We found that the growth and differentiation of main roots of *A. thaliana* were sensitive to exogenous NO content. SNP (NO donor) stimulated differentiation processes such as the formation of numerous germs of root hairs with active growth. After cPTIO (NO scavenger) treatment the cell size increase (swelling) in transition and elongation zones of primary roots, induction of primordial formation of root hairs were observed. Furthermore, actin filaments organization of epidermal cells in different zones of primary roots is modulated by NO content. Thus, the exogenous NO donor (SNP) favours to microfilaments network reorganization, while both cold and NO scavenger (cPTIO) increase its randomization and fragmentation. We have found that not only the sparseness of actin network and microfilaments polymerization/depolymerization in cells of different zones of the root apex occurs, but actin filaments orientation changes also after cold treatment and combined treatment with low temperature and exogenous NO. The obtained results testify to the existence of a functional relationship between changes in the intracellular NO content and the organization of actin filaments when exposed to cold on the plant cell. This allows us to conclude that microfilaments are important intermediaries in the realization of cold effect on the plant cell and NO is involved in the cell response to the low temperatures by signaling through these cytoskeletal structures.

Keywords: plant cytoskeleton, actin filaments (microfilaments), low temperature, nitric oxide, donor NO, sodium nitroprusside (SNP), scavenger NO, 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide (cPTIO), microfilament reorganization.