

С. Г. Плоховская, В. А. Заславский,
член-корреспондент НАН Украины А. И. Емец,
академик НАН Украины Я. Б. Блюм

Участие актиновых филаментов в ответе клеток корня *Arabidopsis thaliana* на действие низкой температуры

Изучено влияние пониженной температуры (+4 °C) на организацию актиновых филаментов (микрофиламентов) клеток разных ростовых зон корня Arabidopsis thaliana (L.). Для визуализации этих структур и детального прижизненного анализа изменений их структуры была использована линия A. thaliana, экспрессирующая химерный ген gfr-abd2-gfr. Установлено, что обработка холодом приводит к ингибированию роста главного корня, а также нарушает его морфологию, вызывая появление большого количества деформированных (эктопических) корневых волосков в зоне дифференциации. Показана временная взаимосвязь нарушений ориентации и организации актиновых филаментов и изменений роста и морфологии корней в условиях воздействия холодого фактора. Обнаружено, что наиболее чувствительными к действию холода являются актиновые филаменты меристематических клеток, а также эпидермальных клеток всех исследуемых зон корня A. thaliana.

Ключевые слова: цитоскелет, актиновые филаменты, микротрубочки, низкая температура.

Известно, что цитоскелет вовлечен в ответ любой эукариотической клетки на действие различного рода факторов абиотической природы (гравитация, низкие и высокие температуры, ультрафиолет, свет и др.). Показано, что в большинстве случаев такой ответ сопровождается наряду с другими внутриклеточными процессами изменением организации и/или ориентации основных составляющих цитоскелета: микротрубочек и актиновых филаментов (микрофиламентов) [1, 2]. Эти цитоскелетные структуры ответственны за поддержание формы клетки, ее рост и деление, внутриклеточный транспорт органелл и везикул, позиционирование ядра и передачу внутриклеточных сигналов [3] и, соответственно, играют ключевую роль в процессах роста и морфогенеза клеток, тканей и органов растений, а также их дифференциации [4].

Недостаточно изученной на сегодня остается функциональная роль цитоскелета растительной клетки в ответ на действие низкой температуры. В большинстве работ по исследованию влияния холодого фактора на цитоскелет основное внимание уделялось изучению микротрубочек. Ряд полученных данных свидетельствуют в пользу того, что растительные микротрубочки разбираются в ответ на действие низкой температуры [5–8]. Такая деполимеризация микротрубочек растений связана с индуцированной холодом экспрессией ряда генов и активацией соответствующих сигнальных путей в ответ на действие низкой температуры [9]. В частности, показана важная роль в этом процессе фосфорилирования основного белка микротрубочек, тубулина, что указывает на его вовлечение в динамический ответ микротрубочек на действие холода у растений [5, 6, 8].

Значительно меньше исследовано влияние холода на актиновые филаменты. Ранее Н. Aström с соавт. [10] установили, что актиновые филаменты в пыльцевых трубках табака

Nicotiana tabacum оставались неповрежденными после воздействия +4 °С, в то время как микротрубочки при таких условиях полностью разрушались. Однако обнаружено, что после экспозиции культуры клеток BY-2 *N. tabacum* в условиях более низких температурных значений (0 °С) происходит нарушение организации микрофиламентов, сопровождающееся формированием неупорядоченной сети толстых и разветвленных структур, а при продолжительном действии холодого фактора — даже частичной деполимеризацией актиновых филаментов [11]. При протеомном анализе ответа мха *Physcomitrella patens* на холодого стресс показано усиление синтеза актина [12].

Поскольку сведения об эффектах холода на актиновые филаменты ограничены, нами исследовалось влияние низкой температуры на особенности прижизненной организации микрофиламентов в клетках главного корня *Arabidopsis*, а также изучались их морфологические изменения, вызванные холодого стрессом.

Эксперименты проводили на четырехдневных проростках линии *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., экспрессирующей химерный ген 35::GFP-ABD2-GFP (F-актин связывающий домен (ABD) гена фибрина (*AtFIM1*) из *A. thaliana*, слитый с геном *gfp* как с С-, так и с N-конца ABD2), что позволяет визуализировать актиновые филаменты в живых клетках этой линии [13]. Для этого семена *A. thaliana* (GFP-ABD2-GFP) стерилизовали в 6%-м растворе гипохлорида натрия в течение 6–10 мин с последующим пятикратным промыванием в дистиллированной воде. Затем их высаживали на питательную среду, содержащую 2,2 г/л набора макро- и микросолей среды MS (Murashige and Skoog salts, “Duchefa”, Нидерланды), 10 г/л сахарозы, 4 г/л джелрайта, рН 5,7. Высаженные семена стратифицировали при +4 °С в течение 24 ч. В дальнейшем чашки Петри с семенами оставляли для проращивания в вертикальном положении в течение 4 сут при постоянной температуре +22 °С и 16/8-часовом фотопериоде.

Влияние низкой температуры (+4 °С) на рост и морфологию корней проростков *A. thaliana* (GFP-ABD2-GFP) исследовали через 24, 48 и 72 ч. Изображение корней фиксировали с помощью цифровой фотокамеры Canon Power Shot G6 (“Canon”, Тайвань) в режиме макросъемки. Измерение длины корней проводили с помощью программы ImageJ (версия 1.38d), находящейся в свободном доступе на сайте <http://rsb.info.nih.gov/ij/>. Значение длины корней (мм) приводили как среднее арифметическое (M) ± среднее отклонение (m). Для оценки влияния +4 °С на рост корней *A. thaliana* (GFP-ABD2-GFP) через 24, 48 и 72 ч определяли показатели относительного прироста корней (%), рассчитанные как соотношение фактического прироста (мм) обработанных корней к фактическому приросту корней контроля (мм):

$$\Delta = \frac{L_{\text{ср}} - L_0}{L_0} \cdot 100$$

в программе Microsoft Office Excel 2007, где Δ — показатель относительного прироста главного корня, %; $L_{\text{ср}}$ — средние значения длины корней обработанных проростков, мм; L_0 — средние значения длины корней необработанных проростков (контроль), мм.

Изменения морфологии главного корня проростков *A. thaliana* (GFP-ABD2-GFP) в условиях холодого стресса изучали с помощью светового микроскопа Axioskop 40 (“Carl Zeiss”, Германия), объективы Plan-Neofluar 10x/0.30, 20x/0.5 и 40x/1.30 Oil DIC. Организацию актиновых филаментов после влияния +4 °С через 1 и 2 ч изучали *in vivo* с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 5 PASCAL (“Carl Zeiss”, Германия). Для получения трехмерного изображения использовали аргоновый лазер с длиной

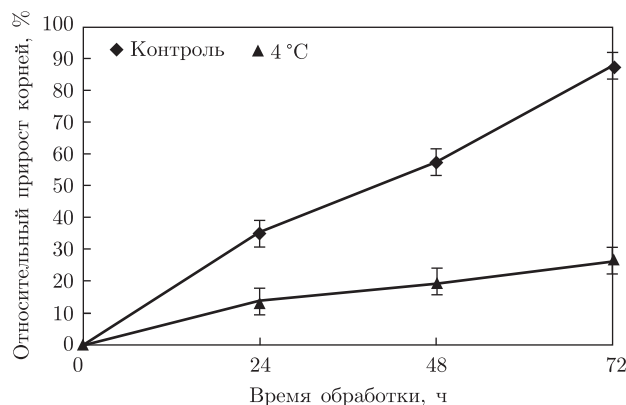


Рис. 1. Изменение прироста главного корня проростков *A. thaliana* при различных сроках экспозиции в условиях пониженной температуры (+4 °C)

волны 488 нм, разделительный фильтр HFT 405/488, эмиссионный фильтр BP 505–530, объективы Plan Achromat 40x/1.4 DIC и 60x/1.4 Oil DIC. Индивидуальную конфигурацию определяли для каждого объекта путем изменения параметров скорости сканирования, точечной диафрагмы и детектора луча. Трехмерные изображения организации актиновых филаментов получали на основе серии оптических срезов (Z-стеков) с интервалом 0,2–0,7 мкм с помощью программного обеспечения версии 4SP2 LSM 510 META (“Carl Zeiss”, Германия).

В результате проведенных исследований установлено, что экспозиция проростков *A. thaliana* при +4 °C приводила к значительным изменениям параметров роста и развития первичного корня (рис. 1). Так, через 24 ч прирост главного корня уменьшался примерно в 2,8–2,9 раза, через 48 ч — в 3,1–3,2 раза, а через 72 ч — в 3,6–3,7 раза. Очевидно, что ингибирование роста первичного корня является результатом отрицательного влияния низкой температуры на деление и удлинение клеток корня, что может быть сопряжено с нарушениями организации их цитоскелета, в частности микрофиламентов.

Также было обнаружено, что экспозиция корней *A. thaliana* при данной температуре приводит к значительным нарушениям морфологии первичного корня. В частности, обработка холодом инициировала формирование эктопических корневых волосков в непосредственной близости к меристематической зоне корня (рис. 2, б, в). В этих же условиях наблюдалось появление большого количества корневых волосков с нарушенной морфологией в зоне дифференциации (см. рис. 2, г, д).

Как уже сообщалось ранее, нарушения процессов роста и дифференциации специализированных типов клеток табака вследствие обработки холодом напрямую связаны с изменениями организации микрофиламентов [10, 11]. Поэтому следующим этапом наших экспериментов было изучение влияния пониженной температуры на реорганизацию актиновых филаментов *in vivo* в разных типах клеток главного корня *A. thaliana*. Установлено, что в интерфазных меристематических клетках необработанных корней *A. thaliana* микрофиламенты представляют собой тонкую сетчатую структуру (рис. 3, II, а), а в эпидермальных клетках (рис. 3, I, а) и клетках кортекса зон растяжения (рис. 3, III, а) и дифференциации — удлиненные закрученные толстые тяжи. Полученные результаты полностью подтверждают ранее наблюдавшиеся закономерности организации актиновых филаментов в клетках *A. thaliana*, экспрессирующих химерный ген *gfp-abd2-gfp* [14].

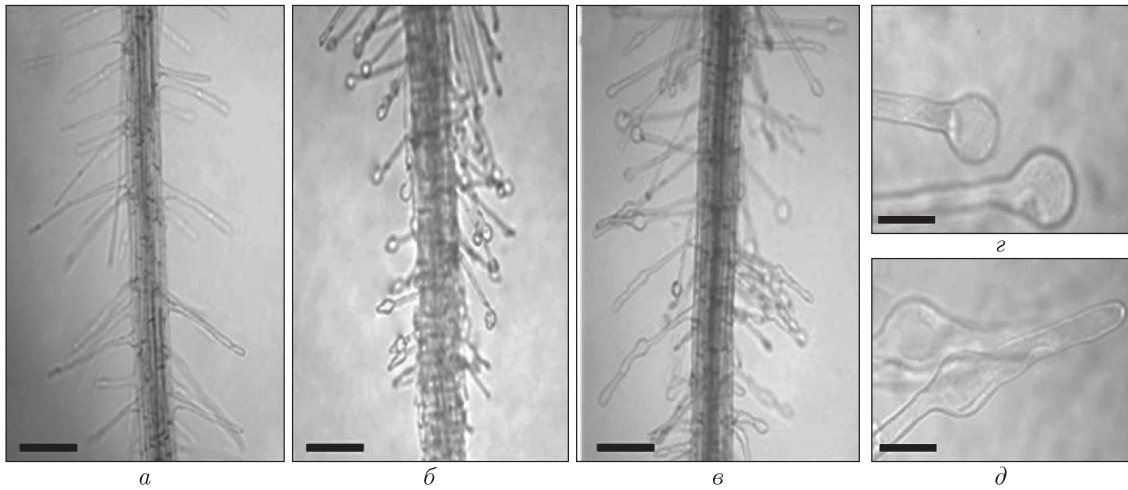


Рис. 2. Разбухание корневых волосков корней проростков *A. thaliana* после их экспозиции при +4 °С: *a* — контроль; *б, г* — через 24 ч; *в, д* — через 48 ч. Масштаб: 20 мкм (*a, б, в*), 40 мкм (*г, д*)

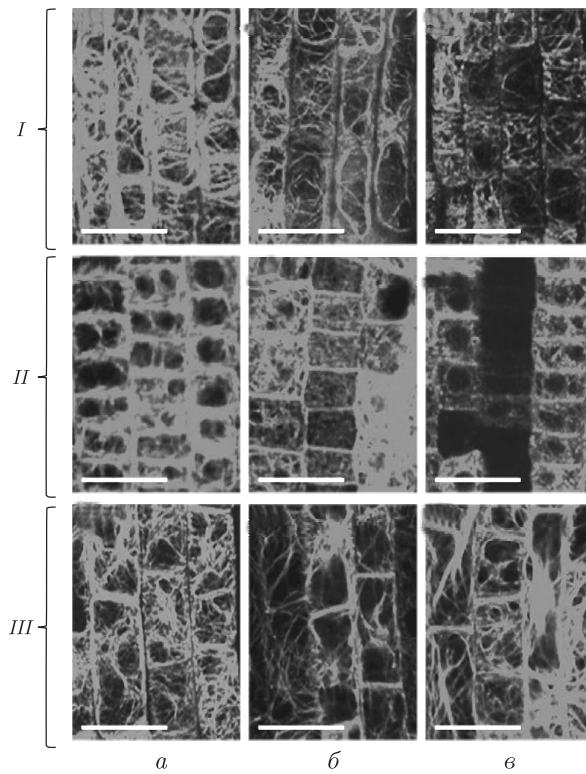


Рис. 3. Организация актиновых филаментов в клетках главного корня *A. thaliana* (GFP-ABD2-GFP) после экспозиции при +4 °С: *I* — эпидермальные клетки меристематической зоны, *II* — клетки меристемы, *III* — клетки кортекса переходной зоны; *a* — контроль, *б* — через 1 ч, *в* — через 2 ч. Масштаб: 20 мкм

После обработки корней *A. thaliana* холодом наблюдали изменения исходной организации актиновых филаментов в эпидермальных клетках (см. рис. 3, *I, б, в*) всех зон главного корня. Уже через 1 ч обработки холодом актиновые филаменты в клетках меристемы частично деполимеризировались (см. рис. 3, *II, б*), а через 2 ч в некоторых клетках наблюдали

их полное разрушение (см. рис. 3, II, в). В большинстве клеток кортекса переходной зоны микрофиламенты изменяли свою ориентацию (см. рис. 3, III, б) либо формировали неупорядоченную сеть утолщенных актиновых филаментов (см. рис. 3, III, в). Установлено, что повышенная чувствительность к действию холода характерна для актиновых филаментов в дифференцированных клетках, а именно в корневых волосках, где они дезориентируются или полностью деполимеризируются после экспозиции при +4 °С. При этом отмечается нарушение инициации их образования, формы, а также роста (см. рис. 2), что связано, вероятнее всего, с нарушениями организации и ориентации микрофиламентов, приводящими к их разбуханию.

Ранее при изучении действия холодого фактора на актиновые филаменты растительной клетки было установлено, что экспозиция суспензионной культуры клеток *Nicotiana tabacum* L. ВУ-2 при 0 °С в течение 5 мин приводила к исчезновению радиальных нитей микрофиламентов, а через 20 мин — к формированию неупорядоченной сети толстых и разветвленных структур [11]. Эта сеть становилась более разреженной через 6 ч холодной обработки, а через 12 ч наблюдались ярко светящиеся короткие тяжи или отдельные скопления актина по периферии клетки и вокруг ее ядра [11]. В то же время исследования, проведенные ранее на клетках лука, выявили нечувствительность актиновых филаментов к холодому стрессу, вызванному воздействием температур от 0 до +4 °С в течение 1 ч, тогда как микротрубочки при этом почти полностью деполимеризировались [15]. Возможно, это объясняется наличием вторичной клеточной стенки или видоспецифичной чувствительностью растений к действию низких температур.

Таким образом, впервые показано выраженное влияние низкой температуры (+4 °С) на прижизненную организацию и ориентацию актиновых филаментов в различных типах клеток главного корня *A. thaliana*, что сопряжено во времени с изменениями показателей роста и морфологии корней. Полученные данные позволяют предположить, что обнаруженные нарушения ориентации актиновых филаментов являются одной из причин изменения морфологии и роста корней в условиях холодого стресса. Наиболее чувствительными к действию холода оказались корневые волоски, меристематические клетки, а также эпидермальные клетки всех исследуемых зон корня *A. thaliana*. Поэтому дальнейшее выяснение закономерностей влияния низких температур на микрофиламенты растительной клетки будет иметь крайне важное значение для понимания механизмов действия этого абиотического фактора на растительный организм в целом, что должно способствовать созданию практических подходов для поиска путей уменьшения негативного влияния холода на растение.

Цитированная литература

1. Khokhlova L. P., Olinevich O. V., Raudaskoski M. Reorganization of the microtubule and actin cytoskeleton in root cells of *Triticum aestivum* L. during low temperature and abscisic acid treatments // Cell Biol. Int. – 2003. – **27**, No 3. – P. 211–212.
2. Ruelland E., Zachowski A. How plants sense temperature // Environ. Exp. Bot. – 2010. – **69**, No 3. – P. 225–232.
3. Baskin T. I. The cytoskeleton // Biochemistry and molecular biology of plants / Eds. B. B. Buchanan, W. Gruissem, R. L. Jones. – Rockville: Courier Companies, 2000. – P. 202–258.
4. Barlow W. P., Baluška F. Cytoskeletal perspectives on root growth and morphogenesis // Plant Mol. Biol. – 2000. – **51**. – P. 289–322.
5. Mizuno K. Induction of cold stability of microtubules in cultured tobacco cells // Plant Physiol. – 1992. – **100**, No 2. – P. 740–748.
6. Zhao J. L., Li X. J., Zhang H., Li Y. Chilling stability of microtubules in root-tip cells of cucumber // Plant Cell Rep. – 2003. – **22**, No 1. – P. 32–37.

7. Baluška F., Mancuso S., Volkmann D., Barlow P. W. Root apex transition zone: a signaling-response nexus in the root // Trends Plant Sci. – 2010. – **15**, No 7. – P. 402–408.
8. Sheremet Ya. A., Yemets A. I., Blume Ya. B. Inhibitors of tyrosine kinases and phosphatases as a tool for the investigation of microtubule role in plant cold response // Cytology and Genetics. – 2012. – **46**, No 1. – P. 1–8.
9. Farajalla M. R., Gulick P. J. The α -tubulin gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.) and differential gene expression during cold acclimation // Genome. – 2007. – **50**. – P. 502–510.
10. Aström H., Virtanen I., Raudaskoski M. Cold-stability in the pollen tube cytoskeleton // Protoplasma. – 1991. – **160**. – P. 99–107.
11. Pokorna J., Schwarzerova K., Zelenkova S., Petrasek J., Janotova I., Capkova V. Sites of actin filament initiation and reorganization in coldtreated tobacco cells // Plant, Cell and Environment. – 2004. – **27**. – P. 641–653.
12. Wang X., Yang P., Zhang X., Xu Y., Kuang T., Shen S., He Y. Proteomic analysis of the cold stress response in the moss, *Physcomitrella patens* // Proteomics. – 2009. – **9**, Iss. 19. – P. 4529–4538.
13. Wang Y.-S., Yoo C.-M., Blancaflor E. B. Improved imaging of actin filaments in transgenic *Arabidopsis* plants expressing a green fluorescent protein fusion to the C- and N-termini of the fibrin actin-binding domain 2 // New Phytologist. – 2008. – **177**. – P. 525–536.
14. Voigt B., Timmers A. C. J., Samaj J., Muller J., Baluska F., Menzel D. GFP-FABD2 fusion construct allows *in vivo* visualization of the dynamic actin cytoskeleton in all cells of *Arabidopsis* seedlings // Eur. J. Cell Biol. – 2005. – **84**. – P. 95–608.
15. Quader H. Cytoskeleton: Microtubules // Progress in Botany. – Heidelberg; Berlin: Springer, 1998. – P. 374–395.

References

1. Khokhlova L. P., Olinevich O. V., Raudaskoski M. Cell Biol. Int., 2003, **27**, No 3: 211–212.
2. Ruelland E., Zachowski A. Environ. Exp. Bot., 2010, **69**, No 3: 225–232.
3. Baskin T. I. The cytoskeleton, Biochemistry and molecular biology of plants, Eds. B. B. Buchanan, W. Gruissem, R. L. Jones, Rockville, Courier Companies, 2000: 202–258.
4. Barlow W. P., Baluška F. Plant Mol. Biol., 2000, **51**: 289–322.
5. Mizuno K. Plant Physiol., 1992, **100**, No 2: 740–748.
6. Zhao J. L., Li X. J., Zhang H., Li Y. Plant Cell Rep., 2003, **22**, No 1: 32–37.
7. Baluška F., Mancuso S., Volkmann D., Barlow P. W. Trends Plant Sci., 2010, **15**, No 7: 402–408.
8. Sheremet Ya. A., Yemets A. I., Blume Ya. B. Cytology and Genetics, 2012, **46**, No 1: 1–8.
9. Farajalla M. R., Gulick P. J. Genome, 2007, **50**: 502–510.
10. Aström H., Virtanen I., Raudaskoski M. Protoplasma, 1991, **160**: 99–107.
11. Pokorna J., Schwarzerova K., Zelenkova S., Petrasek J., Janotova I., Capkova V. Plant, Cell and Environment, 2004, **27**: 641–653.
12. Wang X., Yang P., Zhang X., Xu Y., Kuang T., Shen S., He Y. Proteomics, 2009, **9**, Iss. 19: 4529–4538.
13. Wang Y.-S., Yoo C.-M., Blancaflor E. B. New Phytologist., 2008, **177**: 525–536.
14. Voigt B., Timmers A. C. J., Samaj J., Muller J., Baluska F., Menzel D. Eur. J. Cell Biol., 2005, **84**: 95–608.
15. Quader H. Cytoskeleton: Microtubules, Progress in Botany, Heidelberg, Berlin: Springer, 1998: 374–395.

ГУ “Институт пищевой биотехнологии
и геномики НАН Украины”, Киев
Институт ботаники им. Н. Г. Холодного
НАН Украины, Киев

Поступило в редакцию 02.04.2015

С. Г. Плоховська, В. А. Заславський,
член-кореспондент НАН України А. І. Ємець,
академік НАН України Я. В. Блюм

Участь актинових філаментів у відповіді клітин кореня *Arabidopsis thaliana* на дію низької температури

ДІ “Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України”, Київ
Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України, Київ

Вивчено вплив низької температури (+4 °C) на організацію актинових філаментів (мікрофіламентів) клітин різних ростових зон кореня Arabidopsis thaliana (L.). Для візуалізації цих структур і детального прижиттєвого аналізу змін їх структури була використана лінія A. thaliana, що експресує химерний ген gfp-abd2-gfp. Встановлено, що обробка холодом спричиняє інгібування росту головного кореня, а також порушує її морфологію, викликаючи появу великої кількості деформованих (ектопічних) кореневих волосків у зоні диференціації. Показано часовий взаємозв'язок порушень орієнтації та організації актинових філаментів і змін росту та морфології коренів в умовах впливу холодового фактору. Виявлено, що найбільш чутливими до дії холоду є актинові філаменти меристематичних клітин, а також епідермальних клітин усіх досліджуваних зон кореня A. thaliana.

Ключові слова: цитоскелет, актинові філаменти, мікротрубочки, низька температура.

S. G. Plohovska, V. A. Zaslavsky,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine A. I. Yemets,
Academician of the NAS of Ukraine Ya. V. Blume

Participation of actin filaments in the response of *Arabidopsis thaliana* root cells to low-temperature action

Institute of Food Biotechnology and Genomics of the NAS of Ukraine, Kiev
M. G. Kholodny Institute of Botany of the NAS of Ukraine, Kiev

The effect of the low temperature (4 °C) on the organization of actin filaments (microfilaments) of cells of different growth zones of the root of Arabidopsis thaliana (L.) is studied. For the visualization of these structures and detailed in vivo analysis of the changes in their structure, the line A. thaliana expressing the chimeric gene gfp-abd2-gfp was used. It is found that cold treatment inhibits growth of the main root and gives its morphology, causing a large number of deformed (ectopic) root hairs in the zone of differentiation. The temporal relationship of the disorientation and the organization of actin filaments and the detected changes of growth and morphology of roots under conditions of cold factor is shown. It is found that the most sensitive to the effects of the cold actin filaments are meristematic cells and all epidermal cells of the root zone of A. thaliana.

Keywords: cytoskeleton, actin filaments, microtubules, low temperature.