

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

**ГОРЮНОВА ІННА ІВАНІВНА**

УДК 581.17 + 576.311.348.7 + 546.95 + 632.95.02

**ВПЛИВ  $Cd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  ТА  $Cu^{2+}$  НА ОРГАНІЗАЦІЮ ЦИТОСКЕЛЕТУ  
КЛІТИН КОРЕННЯ *ARABIDOPSIS THALIANA***

03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія

**АВТОРЕФЕРАТ**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ – 2016

Дисертація є рукописом

Робота виконана в ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»

**Науковий керівник**

доктор біологічних наук, професор,  
член-кореспондент НАН України  
**Ємець Алла Іванівна,**  
ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», завідувач лабораторії клітинної біології та нанобіотехнології

**Офіційні опоненти:**

доктор біологічних наук, професор  
**Лихолат Юрій Васильович,**  
Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара МОН України, завідувач кафедри фізіології та інтродукції рослин, заступник декана з наукової роботи факультету біології, екології та медицини

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 «24» травня 2016 р. о 15.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.254.01 ДУ «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](mailto:d26.254.01@ukr.net)

Автореферат розісланий «\_\_» квітня 2016 р.

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



Баєр Г. Я.

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Однією з найбільш гострих проблем сьогодення є проблема забруднення ґрунтів токсичними (в першу чергу, важкими) металами, що негативно впливає як на ріст та морфогенез рослин, так і на здоров'я людей і тварин, які споживатимуть такі рослини в їжу. З'ясування особливостей токсичного впливу таких металів на ріст і морфогенез рослин, а також на клітинні та молекулярні механізми, які лежать в основі цих процесів, може слугувати підґрунтям для розвитку ефективних стратегій боротьби з негативними наслідками цих впливів. За найбільш розповсюдженою класифікацією під визначення «важкі метали» підпадають елементи з металічними властивостями і відносною атомною масою 40–50 Да і густиною  $4\pm 1 \text{ г/см}^3$  (Duffus, 2002). Ключовим поняттям в реалізації токсичності важких металів є їх концентрація, оскільки багато з них, зокрема, залізо, мідь, цинк, молібден та інші виконують ряд регуляторних функцій у клітинах про- і еукаріот (Jadia and Fulekar, 2009). Проте при перевищенні фізіологічних концентрацій вказані елементи здатні викликати цитотоксичні ефекти (Ghosh and Singh, 2005).

Фізіологічні аспекти впливу металів-полютантів добре висвітлені, зокрема, відома здатність металів впливати на ріст, розвиток, фотосинтез та інші процеси у рослин (Gosh and Singh, 2005). Проте внутрішньоклітинні мішені для впливу токсичних металів залишаються не повною мірою досліджені. Так, у клітинах рослин у відповідь на підвищення концентрації токсичних металів відбуваються зміни властивостей клітинної стінки, деградація плазмалем, компартменталізація у вакуолях, порушення функціонування хлоропластів і мітохондрій, зміна фітогормонального балансу, посилений синтез поліамінів, фітохелатинів, металотіонеїнів та інших стресових сполук (Meharg and Masnair, 1990). Одним із специфічних проявів цитотоксичного впливу металів є зміни швидкості проліферації клітин, а отже, організації клітинних структур, які її контролюють, а також запрограмована клітина загибель або некроз у клітин (Krzeslowska, 2011).

Оскільки більшість з токсичних і важких металів впливають на ріст і морфогенез у рослин, то ймовірною мішенню їхнього впливу у клітинах рослин можуть виступати компоненти цитоскелету, а саме мікротрубочки і актинові філаменти (мікрофіламенти). Саме тому вивчення впливу металів-полютантів на мікротрубочки і актинові філаменти є дуже актуальним питанням для більш повного виявлення внутрішньоклітинних мішеней їх впливу. Мікротрубочки це високодинамічні компоненти рослинної клітини, які забезпечують ряд важливих клітинних процесів, зокрема, поділ і ріст клітин, позиціонування органел, підтримку постійної форми і полярності клітин, мікрокомпартменталізацію і внутрішньоклітинний транспорт (Ehrhardt et al., 2006; Hashimoto, 2013; Shen, 2013). Організація мікротрубочок дуже чутлива як до різноманітних біотичних і абіотичних факторів (Nick, 2008), так і до дії внутрішньоклітинних сигналів, зокрема, фітогормонів (Блум и др., 2012),

оксиду азоту (Yemets et al., 2011) і речовин з антимітотичною активністю (таксол, колхіцин и др.) (Nagle et al., 2006).

Мікрофіламенти або актинові філаменти також беруть участь в забезпеченні окремих етапів поділу клітини, підтримують її постійну форму і рухливість одночасно, процеси внутрішньоклітинного транспорту і рух органел (Kim et al., 2005; Hussey et al., 2006; White et al., 2011). Організація та динамічні властивості актинових філаментів також регулюються гормонами та іншими типами внутрішньоклітинних сигнальних молекул (Блюм и др. 2012). Мікрофіламенти також є чутливими до впливу різних біотичних і абіотичних факторів: патогенів вірусної, бактеріальної або грибової природи (Schmidt and Panstruga, 2007; Song et al., 2012), осмотичного стресу (Komis et al., 2002), низьких температур (Shibasaki et al., 2009), сили тяжіння (Yamamoto et al., 2002; Veseleska and Janisch, 2000), ультрафіолету (Grzanka et al., 2006), тощо.

Останнім часом накопичується все більше даних про дію токсичних металів на цитоскелет рослинних клітин, проте в більшій мірі вони стосуються впливу на поділ клітин, в якому провідну роль відіграють цитоскелетні структури. В той же самий час проблема впливу токсичних металів на прижиттєву організацію мікротрубочок і мікрофіламентів інтерфазних клітин залишається практично не дослідженою. Саме тому дослідження впливу токсичних металів на прижиттєву організацію мікротрубочок і актинових філаментів як потенційних мішеней для їх впливу і визначає актуальність нашого дослідження.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами.** Дисертаційну роботу виконано у рамках бюджетних тем відділу геноміки та молекулярної біотехнології ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки» «Створення нових ліній трансгенних рослин із застосуванням генів стійкості до біотичних та абіотичних факторів та генів для покращення їх харчової якості» (2007-2011 рр., номер держреєстрації 0107U003581) та «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., номер держреєстрації 0111U001597).

**Мета та завдання дослідження.** Метою роботи було з'ясування залежності процесів росту і морфогенезу клітин головних коренів проростків *Arabidopsis thaliana* і, відповідно, організації мікротрубочок і актинових філаментів від впливу таких токсичних металів, як  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  і  $\text{Zn}^{2+}$ .

Для досягнення поставленої мети було необхідно вирішити наступні завдання:

1. Дослідити закономірності впливу солей металів  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  і  $\text{Zn}^{2+}$  ( $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{CdSO}_4$ ,  $\text{NiSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ) на ріст головних коренів *A. thaliana* у різних концентраціях.
2. Вивчити вплив іонів  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  і  $\text{Zn}^{2+}$  на морфологію головних коренів *A. thaliana* та життєздатність їх клітин.
3. Дослідити закономірності впливу іонів  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  і  $\text{Zn}^{2+}$  на прижиттєву організацію мікротрубочок в клітинах коренів *A. thaliana*.

4. Порівняти чутливість мікротрубочок клітин різних зон коренів *A. thaliana* до дії іонів  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  і  $\text{Zn}^{2+}$ .
5. Вивчити вплив іонів  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  і  $\text{Zn}^{2+}$  на прижиттєву організацію актинових філаментів коренів *A. thaliana*.
6. Порівняти чутливість мікрофіламентів клітин різних зон коренів *A. thaliana* до дії іонів  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  і  $\text{Zn}^{2+}$ .

**Об'єкт дослідження** – організація цитоскелету рослинних клітин під впливом важких металів.

**Предмет дослідження** – зміни в рості, морфогенезі клітин коренів та особливості просторової організації мікротрубочок та мікрофіламентів у результаті дії іонів металів  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  і  $\text{Zn}^{2+}$ .

**Методи дослідження** – світлова і люмінісцентна мікроскопія, конфокальна лазерна скануюча мікроскопія, методи статистичного аналізу.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше показано залежне від дози і часу інгібування такими важкими металами, як  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  і  $\text{Cu}^{2+}$  (у вигляді солей  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{CdSO}_4$ ,  $\text{NiSO}_4$ ) росту головних коренів *A. thaliana*. Встановлено, що у відповідь на дію цих металів протягом 24-72 год мають місце зміни морфології головних коренів, а саме: відмирання клітин кореневого апексу, свелінг епідермальних клітин різних ростових зон коренів, збільшення довжини і кількості кореневих волосків. Продемонстровано, що як мікротрубочки, так і актинові філаменти є потенційними мішенями для дії використаних металів. Вперше отримано дані стосовно змін прижиттєвої організації цитоскелету клітин коренів *A. thaliana* (мікротрубочок і мікрофіламентів) під впливом  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  і  $\text{Zn}^{2+}$ . Встановлено, що кортикальні мікротрубочки усіх типів інтерфазних клітин кореню виявились чутливими до впливу досліджуваних металів у різних концентраціях, що може бути однією з головних причин виявлених змін приросту і морфології головного кореня *A. thaliana*. Продемонстровано, що найбільш чутливими до дії іонів  $\text{Cd}^{2+}$  виявились мікротрубочки клітин апікальної меристеми та перехідної зони, до впливу  $\text{Ni}^{2+}$  - кортикальні мікротрубочки зони клітинних поділів та елонгації, для  $\text{Cu}^{2+}$  - мікротрубочки клітин зони клітинних поділів, а для  $\text{Zn}^{2+}$  - мікротрубочки клітин епідермісу перехідної зони. Щодо впливу використаних токсичних металів на актинові філаменти, то найбільш чутливими до дії іонів  $\text{Cd}^{2+}$  виявились мікрофіламенти клітин меристематичної і перехідної зони, до дії  $\text{Ni}^{2+}$  - актинові філаменти перехідної зони та зони елонгації, до дії  $\text{Cu}^{2+}$  – актинові філаменти клітин зони клітинних поділів та диференціації, в той час, як  $\text{Zn}^{2+}$  не викликав суттєвих змін в організації актинових філаментів.

**Практичне значення одержаних результатів.** Отримані результати щодо особливостей впливу  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  і  $\text{Zn}^{2+}$  на ріст і морфологію головних коренів *A. thaliana*, а також на організацію мікротрубочок та актинових філаментів можуть бути використані для подальшого дослідження клітинних та молекулярних механізмів стійкості рослин до інтоксикації токсичними концентраціями металів, що дасть змогу розробити нові більш

ефективні стратегії для моніторингу і боротьби із забрудненням ґрунтів цими токсичними металами.

Результати досліджень можуть бути використані у навчальному процесі під час підготовки фахівців з клітинної біології та біоінженерії Київського національного університету ім. Тараса Шевченка у курсах лекцій «Скелетні структури клітини та їх функції» і на базі інших університетів в курсах лекцій з клітинної біології.

**Особистий внесок здобувача.** Автором особисто опрацьовано літературні джерела за темою дисертаційної роботи, підібрано ефективні токсичні концентрації важких металів, отримано всі основні експериментальні результати, проведено їх аналіз, статистичну обробку і узагальнення. Спільно з науковим керівником визначено напрямки проведення, об'єкт та методи дослідження, проведено обговорення, інтерпретацію та узагальнення отриманих результатів, а також підготовлені наукові статті, написано і оформлено текст дисертаційної роботи. Викладені у дисертаційній роботі ідеї, наукові висновки і положення сформульовані автором самостійно або у співавторстві з науковим керівником.

**Апробація результатів дослідження.** Матеріали дисертації були представлені на Всеукраїнській конференції для молодих вчених «Актуальні проблеми ботаніки та екології (Щолкіне, Україна, 18-22 червня, 2013 р.), II Міжнародній науково - практичній конференції «Природничі та медичні науки: актуальні проблеми і перспективи розвитку» (Київ, Україна, 14 листопада 2013р.), науково-практичній конференції молодих вчених “Plant Genomics and Biotechnology” (Київ, Україна, 23-24 грудня 2013 р.), Міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених «Проблеми и перспективы исследований растительного мира» (Ялта, Україна, 13-16 травня, 2014 р.), на Міжнародному конгресі біології рослин «Plant Biology Europe FESB/EPSO 2014 Congress» (Дублін, Ірландія, 22-26 червня, 2014 р.), 4-й з'їзді Українського товариства клітинної біології (Ужгород, Україна, 17-20 вересня, 2014), 4-му з'їзді Українського біохімічного товариства (Київ, Україна, 6-10 жовтня, 2014), Міжнародній конференції «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира» (Ялта, Україна, 12-17 жовтня, 2014 р.), конференції молодих вчених «Регуляція росту і розвитку: фізіолого-генетичні і біохімічні аспекти» (Харків, Україна, 11-12 листопада, 2014 р.), «Фактори експериментальної еволюції організмів» (Чернівці, Україна, 14-18 вересня, 2015).

**Публікації.** За результатами дисертаційної роботи опубліковано 16 наукових праць, з них 6 статей у фахових виданнях та 9 тез у збірках матеріалів вітчизняних та зарубіжних конференцій.

**Структура та обсяг роботи.** Дисертація викладена на 154 сторінках друкованого тексту з 9 таблицями, 50 рисунків і складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, результатів дослідження їх обговорення та узагальнення, висновків і переліку використаних джерел, який містить 237 посилань.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У літературному огляді висвітлено сучасні уявлення про організацію цитоскелету рослинних клітин, а також проаналізовано відомі дані щодо впливу токсичних металів на організацію мікротрубочок та актинових філаментів у рослинній клітині, а також можливі молекулярні механізми їх впливу. Підкреслюється, що в більшій мірі описано вплив металів на організацію та орієнтацію мікротрубочок та актинових філаментів клітин, які знаходяться на стадії мітозу клітинного циклу, в той час як мікротрубочки і, в більшій мірі, актинові філаменти інтерфазних клітин виявились дослідженими не в повному обсязі. Більш дослідженим виявився вплив  $\text{Cd}^{2+}$  на цитоскелет клітин рослин, тоді як майже відсутні дані про вплив  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  і  $\text{Zn}^{2+}$  на організацію мікротрубочок та актинових філаментів в інтерфазних рослинних клітинах.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для дослідження рослинного цитоскелету використовували корені 4-денних проростків ліній *A. thaliana* (GFP-MAP4) (Marc et al., 1998) і *A. thaliana* (GFP-FABD2) (Voight et al., 2005), які є модельними об'єктами для прижиттєвої візуалізації мікротрубочок і актинових філаментів, відповідно. Для поверхневої стерилізації насіння *A. thaliana* (GFP-MAP4) і *A. thaliana* (GFP-FABD2) обробляли 6%-ним (v:v) розчином гіпохлориту натрію протягом 10-15 хв з подальшим п'ятиразовим відмиванням стерильною дистильованою водою. Далі насіння висаджували в асептичних умовах на стерильне живильне середовище Мурасіге-Скуга (МС) (Murashige and Skoog, 1962), яке містило половинний набір мікро- і макро- солей МС, збагачене вітамінами (тіаміном і міо-інозитолом) (2 г/л), з додаванням 10 г/л сахарози і 4 г/л джелрайту, рН 5,7. Далі насіння стратифікували при  $+4^{\circ}\text{C}$  протягом 24 год, потім пророщували за постійної температури  $+24^{\circ}\text{C}$  і 16-годинному фотоперіоді.

Для дослідження впливу іонів  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  і  $\text{Zn}^{2+}$  на ріст головних коренів *A. thaliana* (GFP-MAP4) і *A. thaliana* (GFP-FABD2) чотириденні проростки поміщали у чашки Петрі з розчинами  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{CdSO}_4$ ,  $\text{NiSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$  в концентраціях 1–20 мкМ. Результати досліджень росту головних коренів фіксували за допомогою цифрової фотокамери Canon Power Shot в режимі макрозйомки через 24, 48 і 72 год після початку обробки. Довжину коренів вираховували за допомогою програми Image J (версія 1.38 d) (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Для обробки результатів використовували показники відносного приросту коренів (%), розраховані як співвідношення фактичного приросту головних коренів (мм) *A. thaliana*, оброблених солями металів, до фактичного приросту коренів у контролі, які визначались за формулою  $\Delta = ((L_{\text{cp.}} - L_0)/L_0) * 100\%$  у програмі Microsoft Office Exell 2010, де  $\Delta$  – показник відносного приросту головних коренів %;  $L_{\text{cp.}}$  – середнє значення довжини головних коренів, мм;  $L_0$  – середнє значення довжини необроблених коренів(контроль), мм. Довжину коренів вираховували як середнє арифметичне значення (M)  $\pm$  середнє відхилення (m). Фітотоксичний ефект

вираховували за наступною формулою  $FE = (L_0 - L_x / L_0) * 100\%$  (Ибрагимова и др., 2006).

Морфологію головних коренів 4-денних проростків *A. thaliana* досліджували за допомогою мікроскопу Axioskop 40 (Carl Zeiss, Германия), використовуючи об'єктиви Plan-Neofluar 10x/0.30, 20x/0.5 і 40x/1.30. Зображення обробляли за допомогою програмного забезпечення AxioVisionsRel4.7 (CarlZeiss, Німеччина). Для встановлення ознак відмирання або життєздатності клітин апікальної меристеми та епідермальних клітин, проводили їх прижиттєве фарбування інтеркалюючими флюорохромами пропідій йодидом (1 мг/мл) і флюоресцеїндацетатом (0,3 мкМ) протягом 5 хв з подальшим 3-х кратним відмиванням зразків у натрієво-фосфатному буфері (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,76 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, рН 7,4). Зображення отримували за використання наступних фільтрів: FS 15 – довжина хвилі збудження BP 546/12, роздільний фільтр FT580 та емісійний фільтр LP 590 (пропідій йодид); FS 44 – довжина хвилі збудження BP 475/40, роздільний фільтр FT 500 та емісійний фільтр BP 530/50 (флюоресцеїндацетат).

Вплив досліджуваних іонів металів на прижиттєву організацію мікротрубочок та актинових філаментів оцінювали в епідермальних клітинах кореневого апексу, клітинах апікальної меристеми, клітинах епідермісу і кортексу перехідної зони, зони елонгації, клітинах кортексу зон елонгації та трихобластах, атрихобластах і корневих волосках після обробки протягом 1 год коренів *A. thaliana* солями металів у досліджуваних концентраціях. Візуалізацію мікротрубочок та мікрофіламентів у клітинах *A. thaliana* здійснювали за допомогою сигналу від зеленого флуоресцентного білка, злитого з доменом білка, асоційованого з мікротрубочками (*A. thaliana* GFP-MAP4), або до F-актин зв'язуючого домену (ABD) гена фімбрину (AtFIM1) (*A. thaliana* GFP-FABD2). Для цього використовували лазерний скануючий конфокальний мікроскоп LSM 5 Pascal (CarlZeiss, Німеччина) з наступною конфігурацією сканування: канал FITC, збудження аргонним лазером з довжиною хвилі 488 нм, роздільний фільтр HFT 405/488/543/633, дзеркало, роздільний фільтр HFT 545, фільтр емісії BP 505-570. І об'єктивів Plan-Neofluar 40x/1.30 і 63x/1,4 Oil DIC. Індивідуальну конфігурацію визначали для кожного об'єкту зміною параметрів швидкості сканування, точкової діафрагми і детектору променів. За допомогою програмного забезпечення 4SP2 LSM 510 META (Carl Zeiss, Німеччина) отримували трьохвимірне зображення організації мікротрубочок та актинових філаментів на основі серії оптичних зрізів (Z-стеків), дотримуючись інтервалу 0,2-0,7 мкм. Всі дослідження виконували у трикратних повторях, у кожному окремому досліді аналізували не менше 10 проростків. Визначення кореляційної залежності між отриманими кількісними даними, їх збереження і обробку та побудову графіків проводили за допомогою програми Microsoft Office Excel 2010 (MS Windows). Використовували аналіз середніх значень – як загально прийнятий в біології метод математичної статистики (Лакин, 1980). Вираховували середнє арифметичне значення показника (%) та стандартну середню похибку для відносного значення за стандартними формулами.



## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

**Вплив  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  і  $\text{Zn}^{2+}$  на ріст та морфологію головних коренів *A. thaliana*.** Результати проведених експериментів свідчать про те, що процеси росту та диференціації головних коренів *A. thaliana* є чутливими до дії іонів  $\text{Cd}^{2+}$  (1-20 мкМ) і  $\text{Ni}^{2+}$  (5-20 мкМ),  $\text{Cu}^{2+}$  (5-20 мкМ),  $\text{Zn}^{2+}$  (5-20 мкМ) (Табл. 1). Зокрема, через 24 год ріст головних коренів уповільнювався в 3,4 рази після обробки іонами  $\text{Cd}^{2+}$  в концентрації 5 мкМ, в 6,1 рази - в концентрації 10 мкМ і в 8,5 разів - в концентрації 20 мкМ. У свою чергу, через 48 і 72 ч обробки  $\text{Cd}^{2+}$  спостерігалось уповільнення росту коренів у 3,7 і 3,1 рази (5 мкМ), в 3,8 і 3,7 рази (10 мкМ), в 4,5 і 4,7 рази (20 мкМ), відповідно. При обробці  $\text{Ni}^{2+}$  в концентрації 5 мкМ через 24 год ріст коренів уповільнювався приблизно в 1,5 рази, в 2,2 рази - при використанні концентрації 10 мкМ і в 2,7 - при використанні концентрації 20 мкМ. У свою чергу, обробка  $\text{Ni}^{2+}$  протягом 48 і 72 год приводила до уповільнення росту коренів в 1,8 і 1,75 рази (5 мкМ), в 2,7 і 2,25 рази (10 мкМ), в 3,04 і 3,6 (20 мкМ), відповідно.

Таблиця 1

### Вплив $\text{Cd}^{2+}$ , $\text{Ni}^{2+}$ , $\text{Cu}^{2+}$ і $\text{Zn}^{2+}$ на ріст і морфологію головних коренів *A. thaliana*

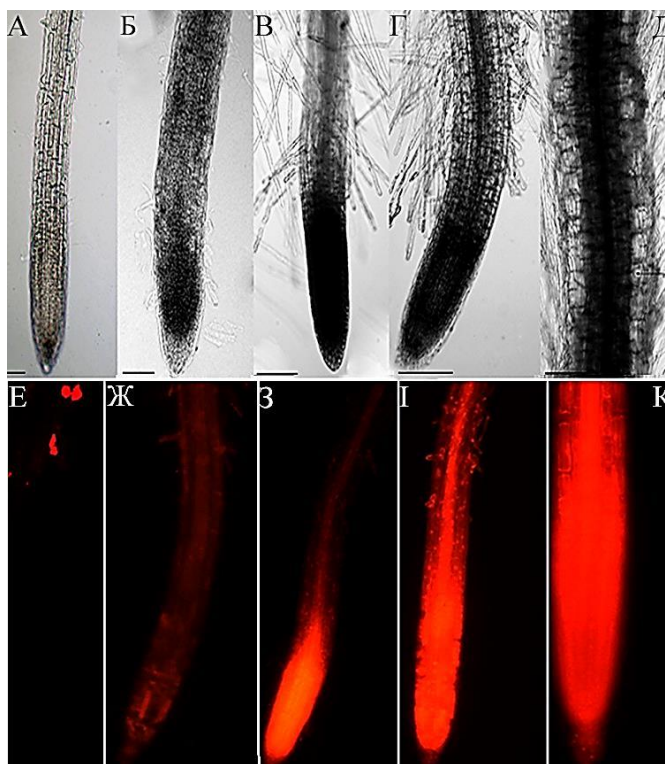
Іони металів	Концентрація металів, мкМ	Ріст головних коренів	Свелінг			Відмирання клітин кореневого апексу	Зачатки бічних коренів	Кореневі волоски	
			Кореневий апекс	Зона елонгації	Зона диференціації			Ріст	Ініціація
$\text{Cd}^{2+}$	1	↓	-	-	-	+	↓	↑	+
	5	↓	-	-	-	+	↓	↑	+
	10	↓	-	-	+	+	↓	↑	+
	20	↓	-	-	+	+	↓	↑	+
$\text{Ni}^{2+}$	5	↓	+	+/-	-	+	↓	↓	+
	10	↓	-	-	+	+	↓	↓	+
	20	↓	-	-	+	+	↓	↓	+
$\text{Cu}^{2+}$	5	↓	-	-	-	+	↓	↓	+
	10	↓	-	-	+	+	↓	↓	+
	20	↓	-	-	+	+	↓	↓	+
$\text{Zn}^{2+}$	5	↓	-	-	-	-	-	-	-
	10	↓	-	-	-	-	-	-	-
	20	↓	-	-	-	-	-	↓	-

Умовні позначення: ↓ пригнічення росту; - - ефект відсутній; + - ефект спостерігається в усіх зразках; +/- - ефект проявляється частково; ↑ - стимуляція росту головних коренів.

Зміни інтенсивності росту головних коренів під впливом  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  у різних концентраціях супроводжувалась змінами їх морфології, в той час як

$Zn^{2+}$  викликав незначне стимулювання росту головних коренів і не порушував їх морфології. Раніше проведені дослідження стосовно впливу іонів  $Cd^{2+}$  свідчать про наявність різноманітних порушень морфології у вигляді пригнічення росту, відмирання і розтягнення клітин кореневого апексу (Довгалюк и др., 2001; Wierzbicka, et al 2007, Fiala et al., 2013). Подібні зміни спостерігались нами при обробці іонами  $Cd^{2+}$  у всіх концентраціях, починаючи з 24-годинної обробки (Рис. 1 Б–Д).

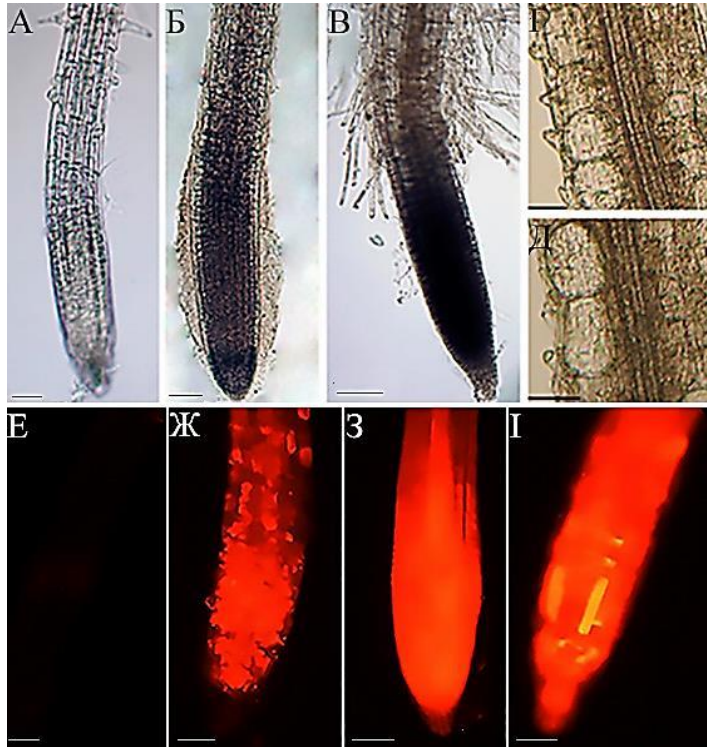
Нами вперше виявлено подовження корневих волосків після обробки  $CdSO_4$  у всіх зазначених концентраціях, хоча раніше навпаки з'являлися повідомлення про пригнічення росту корневих волосків іонами  $Cd^{2+}$  (Fan et al., 2011). Подібну різницю можна пояснити використанням більш високих концентрацій  $Cd^{2+}$ . У той же час результати фарбування пропідій йодидом, який фарбує мертві клітини, свідчать про відмирання клітин цих зон кореня (Рис.1 Ж–К).



**Рис.1** Морфологія головних коренів *A. thaliana* після 48 год обробки  $CdSO_4$  у концентраціях 1, 5, 10 і 20 мкМ прохідному світлі (Б–Д) та після фарбування пропідій йодидом (Е–К): А, Е – контроль; Б, Ж – 1 мкМ; В, З – 5 мкМ, Г, I – 10 мкМ, Д, К – 20 мкМ. Масштаб: А–Г, Е–К – 250 мкм; Д – 500 мкм.

Подібні ефекти, а саме потемніння клітин зони поділів, перехідної зони та зони елонгації спостерігались при збільшенні часу обробки іонами  $Ni^{2+}$  (починаючи з 24-год обробки) (Рис. 2, Б–Д). Пригнічення росту коренів і формування латеральних бічних коренів, а також посилене відмирання клітин епідермісу та кортексу після обробки  $Ni^{2+}$  було зафіксовано в однодольних – *Triticum aestivum* (Demchenko et al., 2004), *Allium cepa* (Akbas et al., 2009) і *Zea mays* L. (Fiala et al., 2013). Проте нами вперше виявлено, що обробка 5 мкМ

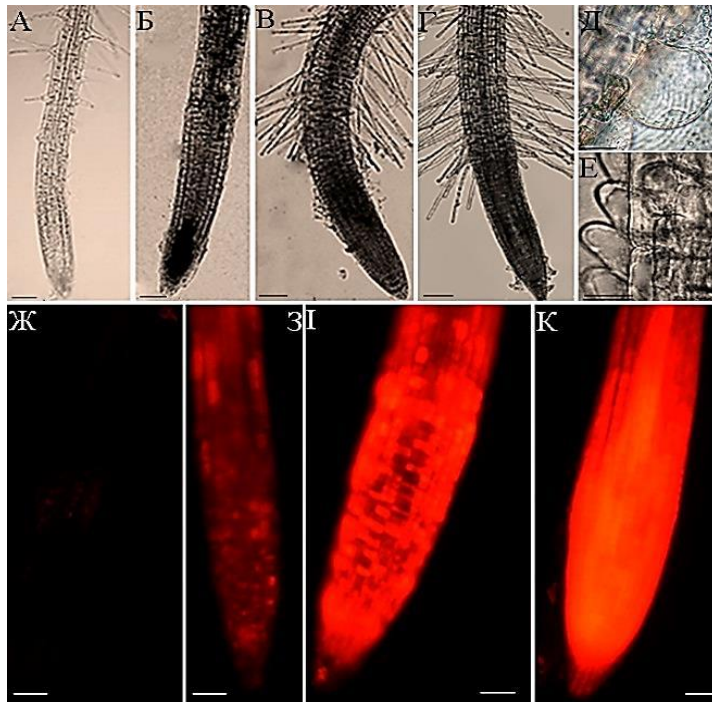
провокує розростання, нашарування і відмиранням клітин кореневого чохла з подальшим розбуханням клітин епідермісу перехідної зони і частково зони елонгації (Рис. 2, Б). Одночасно обробка  $\text{Ni}^{2+}$  в концентрації 10-20 мкМ призводила до роздування епідермальних клітин і клітин кортексу зони диференціації з інгібуванням росту корневих волосків (Рис. 2, Г, Д). Фарбування зразків за допомогою пропідій йодиду підтвердило відмирання клітин описаних вище зон досліджуваних коренів (Рис. 2 Ж, З, І)



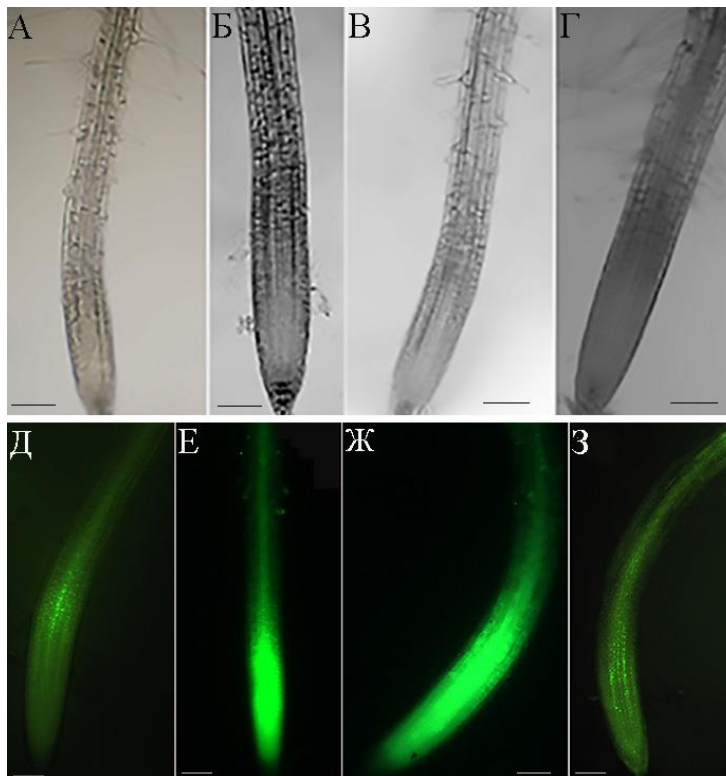
**Рис. 2.** Морфологія головних коренів *A. thaliana* після 48 год обробки іонами  $\text{Ni}^{2+}$  у концентраціях 5, 10 і 20 мкМ в прохідному світлі (Б–Д) та після фарбування пропідій йодидом (Ж–І): А, Е – контроль; Б, Ж – 5 мкМ; В, Г, З – 10 мкМ, Д, І – 20 мкМ. Масштаб: А–В, Е–І – 250 мкм; Г, Д – 20 мкм.

Раніше було продемонстровано, що мідь пригнічує ріст латеральних коренів *Zea mays* L. (Jiang et al., 2001), а також порушує та інгібує ріст корневих волосків, відмирання клітин апікальної меристеми та епідермісу, викликає розростання і розбухання клітин кореневого чохла в *Rhodes grass* (Sheldon and Menzies, 2005) і *Glycine max* L. (Kulikova et al., 2011). Подібні зміни спостерігались і в наших дослідженнях, а саме відмирання клітин кореневого апексу, розбухання клітин або свелінг епідермальних і кортикальних клітин зон елонгації і диференціації, а також подовження корневих волосків (Рис. 3, В–Д).

Морфологія головних коренів *A. thaliana* практично не була змінена під впливом  $\text{Zn}^{2+}$  в концентраціях 5-10 мкМ після обробки ним протягом 6, 24, 48 72 год; лише при 20 мкМ спостерігалось незначне видовження корневих волосків (Рис. 4, Г).



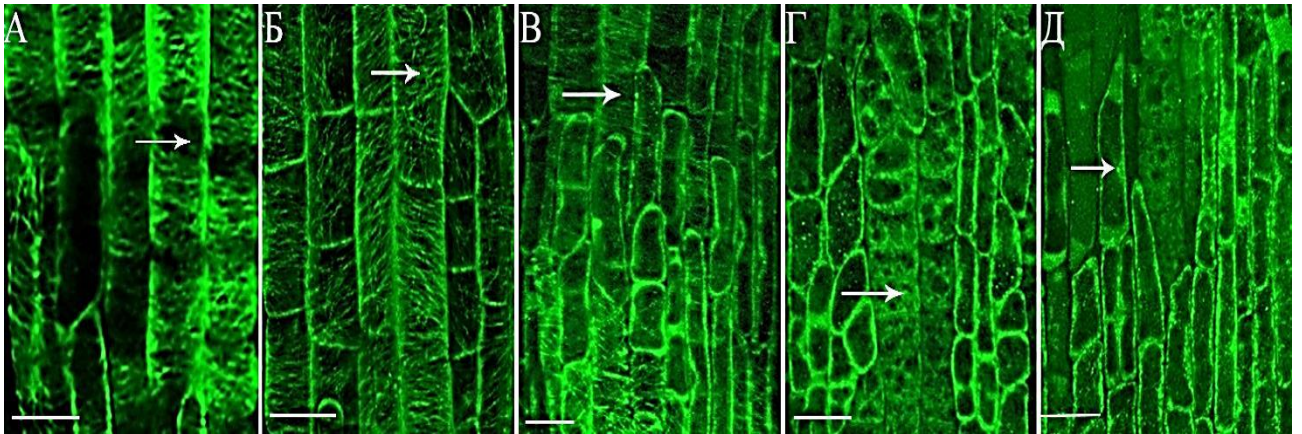
**Рис. 3.** Морфологія головних коренів *A. thaliana* після 48 год обробки  $\text{Cu}^{2+}$  у концентраціях 5, 10 і 20 мкМ в прохідному світлі (Б–Е) та після фарбування пропідій йодидом (Ж–К): А, Ж – контроль; Б, З – 5 мкМ; В, Д, І – 10 мкМ; Г, Е, К – 20 мкМ. Масштаб: А–Г, Ж–К – 250 мкм; Д – 2 мкм, Е – 40 мкм.



**Рис. 4.** Морфологія головних коренів *A. thaliana* після 48 год обробки  $\text{Zn}^{2+}$  у концентраціях 5, 10 і 20 мкМ в прохідному світлі (Б–Г) та після фарбування флюоресцеїндиацетатом (Е–З): А, Д – контроль; Б, Е – 5 мкМ; В, Ж – 10 мкМ; Г, З – 20 мкМ. Масштаб: А–З – 250 мкм.

Відомо, що обробка більш  $Zn^{2+}$  у високих концентраціях (більше 1мМ) викликає інгібування проліферації клітин головних коренів і різноманітні порушення морфології коренів *Allium cepa* L. (Donghua et al., 1996), *A. thaliana* (Staňová et al., 2009), і *Phyllostachys pubescens* (Liu et al., 2014), тоді як концентрації 5, 10 мкМ  $Zn^{2+}$  викликали в *P. chrysipubescens* також стимуляцію росту коренів (Liu et al., 2014), подібно тій, що спостерігалась нами.

**Визначення впливу  $Cd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  і  $Zn^{2+}$  на організацію мікротрубочок у клітинах головних коренів *A. thaliana*.** Нами було з'ясовано, що кортикальні мікротрубочки в клітинах коренів *A. thaliana* виявилась чутливими до впливу різних концентрацій  $Cd^{2+}$ , що є однією з причин описаних нами змін росту і морфології головного кореня. Найбільш чутливою до дії всіх зазначених концентрацій  $Cd^{2+}$  виявились клітини перехідної зони (дистальної зони розтягу), адже організація їх мікротрубочок змінювалась на невпорядковану (1, 5 мкМ), або вони частково чи навіть повністю деполімеризувались (Рис. 5).



**Рис. 5.** Організація мікротрубочок у клітинах перехідної зони головних коренів проростків *A. thaliana* після після обробки протягом 1 год  $Cd^{2+}$ : А – контроль, Б – 1 мкМ, В – 5 мкМ, Г – 10 мкМ, Д – 20 мкМ. Масштаб – 20 мкм.

Дуже чутливими до дії  $Cd^{2+}$  виявились також клітини апікальної меристеми, в яких також спостерігали реорієнтацію та деполімеризацію мікротрубочок, що ймовірно спричиняло гальмування проліферації клітин. Зміни організації мікротрубочок в клітинах епідермісу та кортексу різних ростових зон кореня після обробки  $Cd^{2+}$  у концентраціях 1–20 мкМ узагальнені в Табл. 2.

Дослідження впливу використаних концентрацій  $Cd^{2+}$  на організацію кортикальних мікротрубочок в рослинних клітинах проводилися вперше. В цілому, існуючі на сьогоднішній день дані свідчать про те, що мікротрубочки є однією із внутрішньоклітинних мішеней для  $Cd^{2+}$ . Зокрема показано, що різноманітні аномалії в проходженні мітозу (поява к-мітозів, одинарних або подвійних мостів, передчасне розходження хромосом, тощо) внаслідок деполімеризації мітотичних фігур спостерігалися в меристематичних клітинах *Pisum sativum* (Fusconi, et al., 2007), *Vicia faba* (Parween et al., 2011), *Hordeum vulgare* (Liu, 2003/4). В культурі одноклітинних водоростей *Spirogyra decimina*

спостерігали реорієнтацію та деполімеризацію кортикальних мікротрубочок та мітотичних фігур під впливом різних концентрацій  $\text{Cd}^{2+}$  (Příbyl et al., 2005).

Таблиця 2

**Схематичне зображення змін організації мікротрубочок в клітинах коренів *A. thaliana* після обробки  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  і  $\text{Zn}^{2+}$**

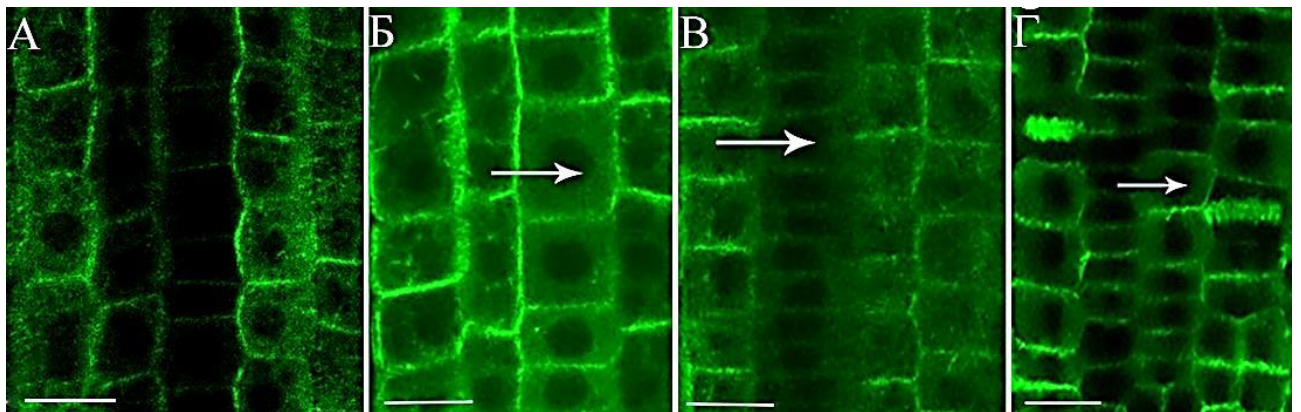
Іони металу		Кореневий апекс		Перехідна зона		Зона елонгації		Зона диференціації	
		епідерміс	меристема	епідерміс	кортекс	епідерміс	кортекс	трихобласти, атрихобласти	кореневі волоски
<b>Контроль</b>									
$\text{Cd}^{2+}$	1 мкМ								
	5 мкМ								
	10 мкМ								
	20 мкМ								
$\text{Ni}^{2+}$	5 мкМ								
	10 мкМ								
	20 мкМ								
$\text{Cu}^{2+}$	5 мкМ								
	10 мкМ								
	20 мкМ								
$\text{Zn}^{2+}$	5 мкМ								
	10 мкМ								
	20 мкМ								

Умовні позначення орієнтації мікротрубочок відносно основної вісі коренів: поперечна орієнтація мікротрубочок; – радіальна орієнтація; – навскісна орієнтація; – поздовжня орієнтація; – орієнтація мікротрубочок, притаманна корневим волоскам, – невпорядкована орієнтація мікротрубочок; – часткова деполімеризація мікротрубочок, – повна деполімеризація мікротрубочок.

Причинами виникнення описаних вище порушень мікротрубочок є зв'язування іонів  $\text{Cd}^{2+}$  з сульфгідрильними групами  $\beta$ -тубуліну (Bandyopadhyay et al., 1997; Parween et al., 2011), різноманітні порушення рівня різних посттрасляційних модифікацій тубуліну, зокрема тирозилування, детирозилування, ацетилювання, поліглутамілювання, а також зниження рівня експресії генів, відповідальних за утворення  $\alpha/\beta$ -тубулінів (Gzyl et al., 2015).

Загалом, найбільш чутливою до дії іонів  $\text{Cd}^{2+}$  виявились мікротрубочки перехідної зони та зони клітинних поділів, менш чутливими мікротрубочки зони елонгації та диференціації.

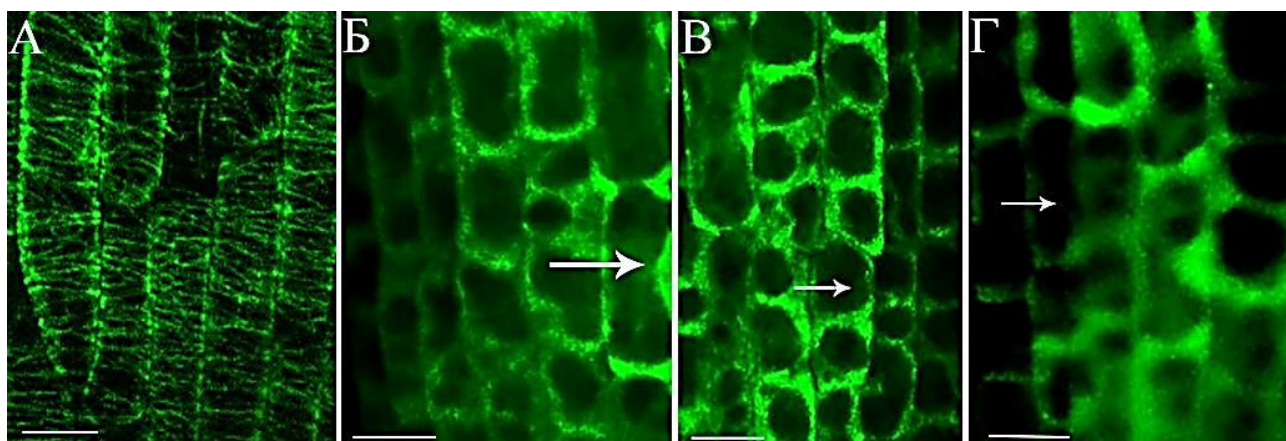
У результаті досліджень нами виявлено дозозалежний вплив іонів  $\text{Ni}^{2+}$  (5, 10 та 20 мкМ) на прижиттєву організацію кортикальних мікротрубочок в різних типах клітин головних коренів *A. thaliana* (GFP-MAP4), зміни якої є причиною дозозалежного інгібування росту головних коренів, а також змін їх морфології. Найбільш чутливою до дії іонів  $\text{Ni}^{2+}$  виявилась мікротрубочки меристематичної зони (Рис. 6, Б–Г) та елонгації, менш чутливими – мікротрубочки перехідної зони та зони диференціації (Табл. 2). До сьогоднішнього дня повноцінні дослідження впливу цього токсичного металу на організацію мікротрубочок не проводились. Раніше лише було встановлено, що у клітинах апікальної меристеми коренів *A. sera* після обробки іонами нікелю спостерігалось інгібування проліферації клітин, яке супроводжувалось порушенням мітотичного індексу, наявністю різноманітних аномалій у проходженні мітозу внаслідок деполімеризації веретена поділу, а також відбувалась стабілізація кортикальних мікротрубочок (Dovgalyuk et al., 2003).



**Рис. 6.** Організація мікротрубочок в меристематичних клітинах головних коренів проростків *A. thaliana* після обробки протягом 1 год  $\text{NiSO}_4$ : А – контроль, Б – 5 мкМ, В – 10 мкМ, Г – 20 мкМ. Масштаб – 20 мкм.

Іони міді виявились найбільш ефективними руйнівниками мікротрубочок серед усіх досліджуваних нами металів. Отримані результати вказують на те, що вже при використанні найменшої концентрації  $\text{CuSO}_4$  відбуваються значні зміни в організації мікротрубочок. Найбільш чутливими до дії  $\text{Cu}^{2+}$  виявились мікротрубочки епідермальних та меристематичних клітин кореневого апексу (Рис. 7, Б–Г), менш чутливими – мікротрубочки клітин перехідної зони, зони

елонгації і диференціації (Табл. 2). Раніше було виявлено, що іони  $\text{Cu}^{2+}$  здатні інгібувати поділ клітин в коренях *Vigna unguiculata* (Blamey et al., 2011) та *A. sativum* (Liu et al., 2009), а також стабілізувати кортикальні мікротрубочки (Liu et al., 2009). Ймовірним поясненням отриманих нами результатів може бути приєднання  $\text{Cu}^{2+}$  до вільних сульфгідрильних груп тубуліну; а також властивість металів конкурувати з  $\text{Mg}^{2+}$ , впливаючи таким чином, на ГТФ-залежну полімеризацію мікротрубочок, як було показано для інших двовалентних токсичних металів. Припускається, що існують також специфічні для цього металу сайти приєднання, однак механізми безпосереднього впливу  $\text{Cu}^{2+}$  на мікротрубочки потребують подальшого дослідження.



**Рис. 7.** Організація мікротрубочок в клітинах епідермісу кореневого апексу головних коренів проростків *A. thaliana* після обробки протягом 1 год  $\text{CuSO}_4$ : А – контроль, Б – 1 мкМ, В – 5 мкМ, Г – 10 мкМ, Д – 20 мкМ. Масштаб – 20 мкм.

Натомість, при вивченні здатності іонів цинку впливати на мікротрубочки спостерігались незначні зміни організації кортикальних мікротрубочок в клітинах, які першими безпосередньо контактували з розчином  $\text{ZnSO}_4$  (епідермальні клітини кореневого апексу та перехідної зони) (Рис. 8, Б–Г). В той же самий час глибинні шари коренів при використанні  $\text{ZnSO}_4$  в тих же концентраціях залишались неушкодженими.

Таким чином, найбільш чутливими до дії іонів  $\text{Zn}^{2+}$  в низьких (близьких до фізіологічних) концентраціях виявились мікротрубочки клітин перехідної зони, менш чутливими – мікротрубочки зони клітинних поділів, зони елонгації і диференціації (Табл. 2). Результати інших досліджень свідчать про те, що більш високі концентрації  $\text{Zn}^{2+}$  проявляють антимітотичну активність в клітинах коренів *Oryza sativa* (Chang et al., 2005) і *A. cepa* L. (Andrioli et al., 2012). Добре відомо, що  $\text{Zn}^{2+}$  нарівні з  $\text{Mg}^{2+}$  і  $\text{Mn}^{2+}$  стимулює полімеризацію димерів тубуліну тваринного походження в протофіламенти у присутності ГТФ (Gascin, Kress, 1978; Eagle et al., 1983). Також іони  $\text{Zn}^{2+}$  здатні утворювати зв'язуючі мости між субодинаціями димерів тубуліну (Lowe et al., 2001).



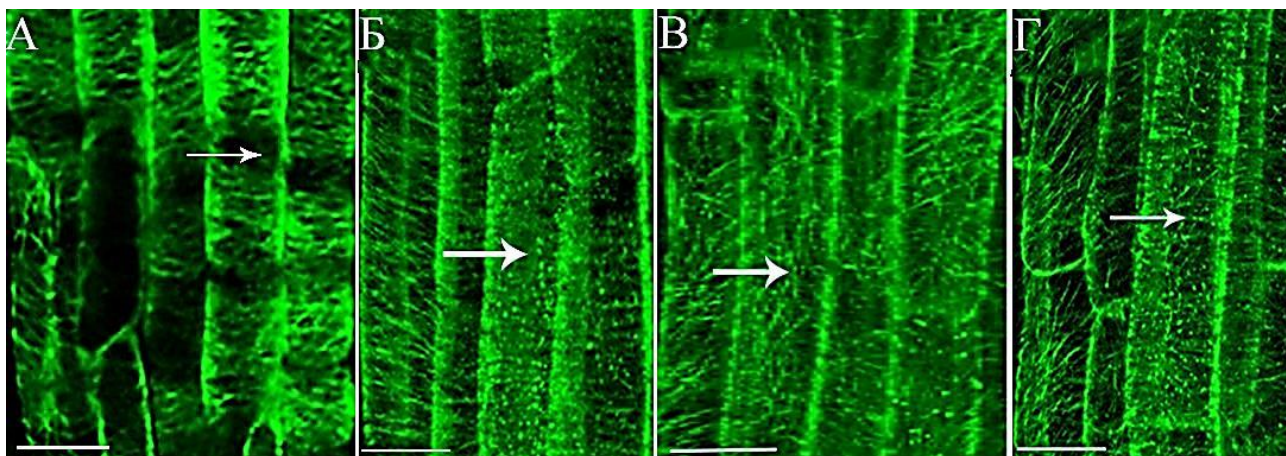


Рис. 8 Організація мікротрубочок у клітинах епідермісу перехідної зони головних коренів проростків *A.thaliana* (GFP-MAP4) після після обробки протягом 1 год  $ZnSO_4$ : А – контроль, Б – 5 мкМ, В – 10 мкМ, Г – 20 мкМ. Масштаб – 20 мкм.

**Дослідження впливу  $Cd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  та  $Zn^{2+}$  на організацію актинових філаментів у клітинах головних коренів *A. thaliana*.** Оскільки доведено, що виникнення роздутих клітин є наслідком порушення організації мікрофіламентів (Mils et al., 1994), а актинові філаменти беруть безпосередню участь в процесах поділу клітин, диференціації та ініціації росту корневих волосків, то безпосередній вплив токсичних металів на мікрофіламенти може виступати причиною описаних раніше змін в рості і морфології коренів.

На першому етапі нами було проведено дослідження прижиттєвої організації та орієнтації мікрофіламентів клітин кореня арабідопсису під впливом  $Cd^{2+}$  в концентраціях 5, 10 і 20 мкМ (Рис. 9). Найбільш чутливими до дії кадмію виявились мікрофіламенти клітин перехідної та меристематичної зони, найменш чутливими – актинові філаменти зони елонгації і диференціації (Табл. 3). Отримані результати корелюють з результатами досліджень інших авторів. Зокрема, раніше було показано зміну орієнтації мікрофіламентів в інтерфазних клітинах зеленої водорості *Spirogyra decimina* (Prybil et al., 2005) і в корневих волосках *A. thaliana* (Fan et al., 2011).

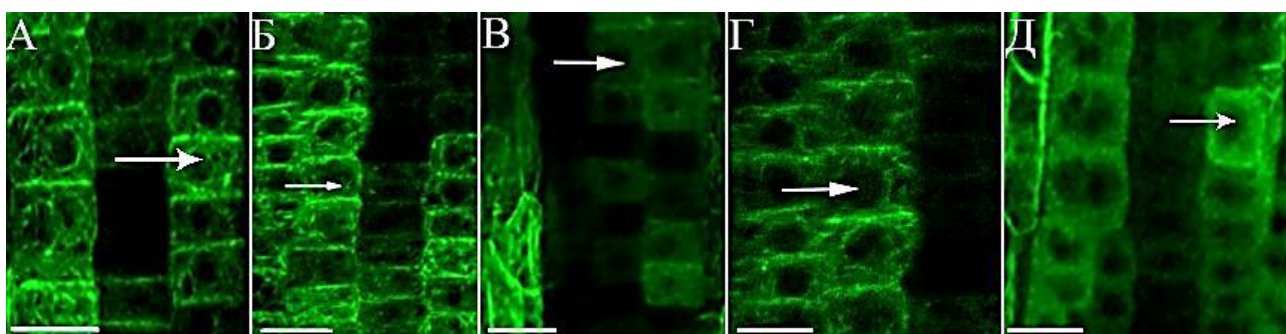


Рис. 9. Організація актинових філаментів у клітинах апікальної меристеми головних коренів проростків *A.thaliana* після після обробки протягом 1 год  $CdSO_4$ : – контроль, Б – 5 мкМ, В – 10 мкМ, Г – 20 мкМ. Масштаб – 20 мкм.

**Схематичне зображення змін організації мікрофіламентів в клітинах  
коренів *A. thaliana* після обробки  $Cd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  і  $Zn^{2+}$**

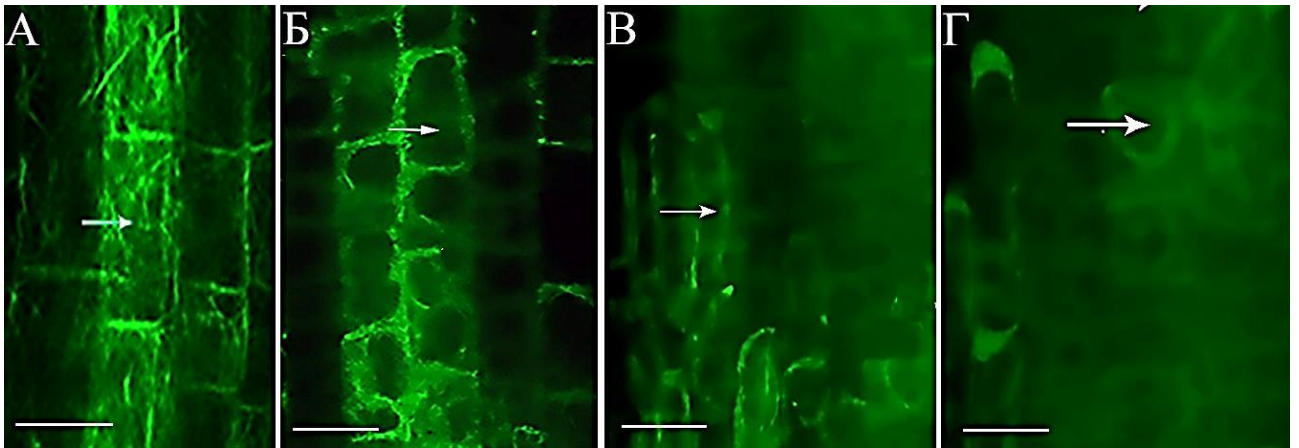
Назва металу	Кореневий апекс		Перехідна зона		Зона елонгації		Зона диференціації		
	епідерміс	меристема	епідерміс	кортекс	епідерміс	кортекс	трихобласти, атрихобласти	кореневі волоски	
<b>Контроль</b>									
$Cd^{2+}$	1 мкМ								
	5 мкМ								
	10 мкМ								
	20 мкМ								
$Ni^{2+}$	5 мкМ								
	10 мкМ								
	20 мкМ								
$Cu^{2+}$	5 мкМ								
	10 мкМ								
	20 мкМ								
$Zn^{2+}$	5 мкМ								
	10 мкМ								
	20 мкМ								

Умовні позначення орієнтації мікрофіламентів відносно основної осі коренів:  
 – нативна гетерогенна, закручена орієнтація мікрофіламентів; – радіальна орієнтація мікрофіламентів; – невпорядкована орієнтація актинових філаментів; – повздовжня орієнтація актинових філаментів; – часткова деполімеризація актинових філаментів; – повна деполімеризація актинових філаментів в клітинах.

Можливі молекулярні механізми впливу  $Cd^{2+}$  на актинові філаменти на сьогоднішній день вивчені не достатньо. Відомо, що  $Cd^{2+}$  здатен заміщувати іони  $Ca^{2+}$  в кальмодуліні, що призводить до активації декількох актин-

полімеризуючих факторів ( $\alpha$ -акініну, гелъзоліну і віліну) (Kazmirski et al., 2002; Apostolova et al., 2006) і замішувати  $Mg^{2+}$  при проходженні полімеризації G-акіну (Dalledonne et al., 1997).

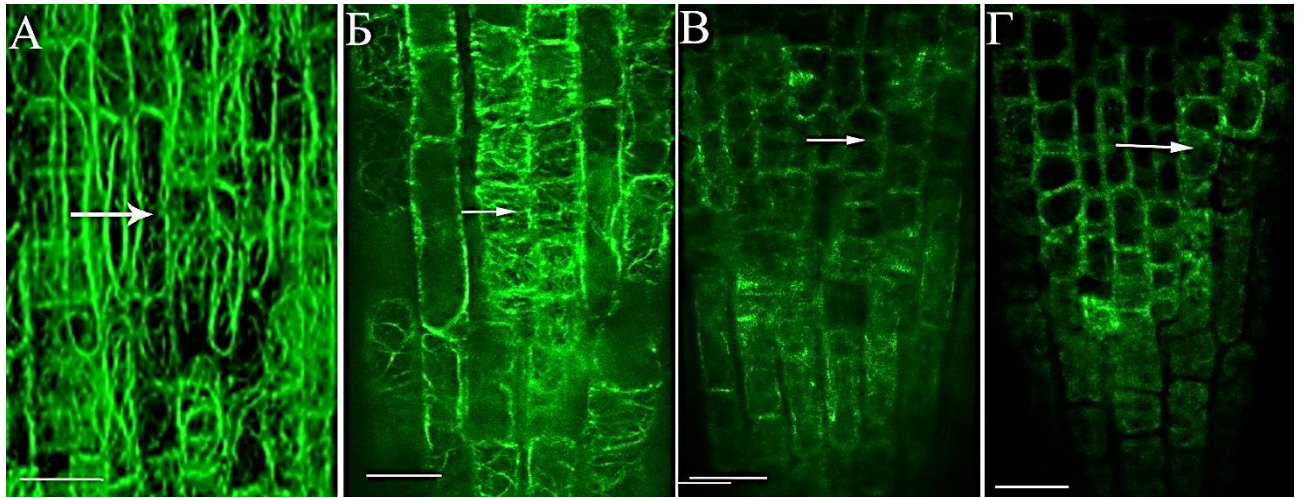
Менш драматичні зміни в організації мікрофіламентів спостерігали під впливом нікелю в тих же самих концентраціях. Найбільш чутливими до дії іонів  $Ni^{2+}$  виявились клітини перехідної зони та зони елонгації (Рис. 10, Б–Г), менш чутливими – актинові філаменти клітин зони клітинних поділів та зони диференціації (Табл. 3). Отримані результати можна порівняти з результатами досліджень, в яких також було виявлено реорганізацію мікрофіламентів в інтерфазних клітинах зеленої водорості *Spirogyra decimina* під впливом нікелю (Prybil et al., 2008). Відомо, що  $Ni^{2+}$  здатен порушувати конформацію G-акіну, впливаючи на полімеризацію/деполімеризацію актинових філаментів (Dalledonne et al., 1999; Prybil et al., 2008). Ще одним потенційним механізмом впливу є здатність  $Ni^{2+}$  окислювати вільні SH-групи в G-акініні (Li et al., 1993; Prybil et al., 2008).



**Рис. 10.** Організація актинових філаментів у клітинах перехідної зони головних коренів проростків *A.thaliana* (GFP-FABD2) після обробки протягом 1 год  $NiSO_4$ : А – контроль, Б – 5 мкМ, В – 10 мкМ, Г – 20 мкМ. Масштаб – 20 мкм.

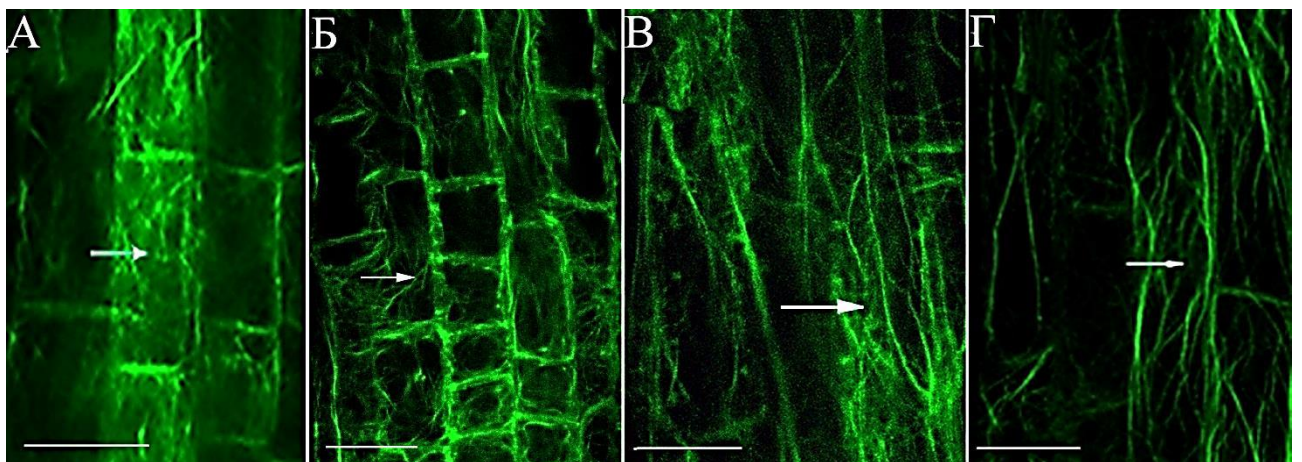
Як і у випадку з мікротрубочками, мідь виявилась найбільш токсичною по відношенню до мікрофіламентів. Виявилось, що прижиттєва організація та орієнтація актинових філаментів є чутливою до підвищення концентрації міді, що, поряд з аналогічним впливом цього металу на мікротрубочки може бути можливою причиною часо- і дозозалежного інгібування росту головних коренів *A.thaliana*, а також порушень їх морфології. Дуже сильні зміни нативної організації та орієнтації актинових філаментів були виявлені в усіх типах клітин головних коренів, проте найбільш чутливими до дії іонів  $Cu^{2+}$  виявились трихобласти, атрихобласти і кореневі волоски зони диференціації, а також клітини епідермісу кореневого апексу (Рис. 11, Б–Г). Менш чутливими виявились клітини перехідної зони та зони елонгації (Табл. 3). Відомо, що  $Cu^{2+}$  в концентраціях 40-300 мкМ викликає дозо- і часозалежні зміни організації

актинових філаментів (від рандомізації до сильної деполімеризації) в інтерфазних клітинах зелених водоростей *Spirogyra decimina* (Prybil et al., 2008).



**Рис. 11.** Організація актинових філаментів у клітинах епідермісу кореневого апексу головних коренів проростків *A.thaliana* після після обробки протягом 1 год  $\text{CuSO}_4$ : А – контроль, Б – 5 мкМ, В – 10 мкМ, Г – 20 мкМ. Масштаб – 20 мкм.

Цинк виявився найменш токсичним по відношенню до актинових філаментів (Рис. 12, Б–Г). Продемонстровано, що іони  $\text{Zn}^{2+}$  у використаних нами концентраціях не викликали суттєвих змін організації та орієнтації актинових філаментів, лише в поодиноких випадках спостерігалась незначна реорієнтація мікрофіламентів клітин епідермісу перехідної зони.



**Рис. 16.** Організація актинових філаментів у клітинах епідермісу кореневого апексу головних коренів проростків *A. thaliana* після обробки протягом 1 год  $\text{ZnSO}_4$ : А – контроль, Б – 5 мкМ, В – 10 мкМ, Г – 20 мкМ. Масштаб – 20 мкм.

Дані стосовно впливу  $\text{Zn}^{2+}$  на організацію актинових філаментів в літературних джерелах відсутні, а молекулярні механізми і потенційні сайти зв'язування  $\text{Zn}^{2+}$  з мікрофіламентами в еукаріотичних клітин досі не відомі.

Проте опираючись на електронну конфігурацію  $Zn^{2+}$  можна припустити, що вони будуть схожі до інших двовалентних важких металів.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі узагальнено закономірності залежності процесів росту і морфогенезу клітин коренів, а також індукції відмирання клітин головних коренів під впливом іонів таких важких металів, як  $Cd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  і  $Zn^{2+}$  у різних концентраціях та проаналізовано прижиттєві зміни організації основних складових цитоскелету рослинних клітин – мікротрубочок і актинових філаментів – різних зон кореню *A. thaliana* у відповідь на дію цих металів.

1. Продемонстровано, що іони  $Cd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  інгібують ріст головних коренів, тоді як іони  $Zn^{2+}$  навпаки стимулюють ріст головних коренів *A. thaliana*.
2. Виявлено, що іони  $Cd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  викликають порушення морфогенезу коренів у вигляді ініціації росту і збільшення довжини кореневих волосків, свелінгу (роздуванню) переважно епідермальних клітин і клітин кортексу зон елонгації і диференціації, в той час як  $Zn^{2+}$  не викликає деструктивних змін морфології головних коренів.
3. Виявлено, що  $Cd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  можуть спричиняти відмирання клітин кореневого апексу і частково перехідної зони кореня *A. thaliana*.
4. За допомогою лазерної скануючої конфокальної мікроскопії показано, що причиною даних порушень є безпосередній вплив іонів важких металів на мікротрубочки клітин різних ростових зон кореня. Порушення нативної організації мікротрубочок спостерігали під впливом усіх використаних токсичних металів.
5. Найбільш чутливими до дії іонів  $Cd^{2+}$  виявились мікротрубочки клітин апікальної меристеми та перехідної зони кореня, до дії  $Ni^{2+}$  – кортикальні мікротрубочки зони клітинних поділів та елонгації, для  $Cu^{2+}$  – мікротрубочки клітин зони клітинних поділів, для  $Zn^{2+}$  – мікротрубочки клітин перехідної зони кореня.
6. Продемонстровані зміни прижиттєвої організації актинових філаментів під впливом іонів  $Cd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  і  $Zn^{2+}$ , що свідчить про клітинну роль цих цитоскелетних структур як потенційних мішеней для важких металів нарівні з мікротрубочками.
7. З'ясовано, що актинові філаменти клітин різних ростових зон кореня *A. thaliana* не в однаковій мірі чутливі до дії різних металів. Зокрема, найбільш чутливими до дії іонів  $Cd^{2+}$  виявились мікрофіламенти клітини зони клітинних поділів і перехідної зони, до дії  $Ni^{2+}$  - актинові філаменти перехідної зони та зони елонгації, до дії  $Cu^{2+}$  – актинові філаменти клітин зони клітинних поділів та диференціації, тоді як  $Zn^{2+}$  не викликав суттєвих змін в прижиттєві організації актинових філаментів.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Горюнова І.І.** Влияние кадмия на организацию актиновых филаментов в клетках корней *Arabidopsis thaliana* / **І.І. Горюнова**, Ю.А. Красиленко, В.А. Заславский, А.І. Емец, Я.Б. Блюм // Доп. НАН України. – 2014, №9. – с. 127-133 (*Дисертантка брала участь у проведенні експериментів, спільно з науковим керівником провела обробку та аналіз результатів дослідження, написала та оформила статтю*).
2. **Горюнова І. І.** Влияние меди на цитоскелет разных типов клеток корней *Arabidopsis thaliana* / **І. І. Горюнова**, А.І. Емец // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2015. – Т. 17. – с. 41 – 45 (*Дисертантка брала участь у проведенні експериментів, спільно з науковим керівником провела обробку та аналіз результатів дослідження, написала та оформила статтю*).
3. **Горюнова І. І.** Вплив цинку на організацію актинових філаментів в клітинах коренів *Arabidopsis thaliana* / **І. І. Горюнова**, А. І. Ємец // Наукові доповіді НУБіП. – 2015. – №8 (57). – [http://nd.nubip.edu.ua/2015\\_8/9.pdf](http://nd.nubip.edu.ua/2015_8/9.pdf) (*Дисертантка брала участь у проведенні експериментів, спільно з науковим керівником провела обробку та аналіз результатів дослідження, написала та оформила статтю*).
4. **Goriunova I. I.** Involvement of plant cytoskeleton in cellular mechanisms of metal toxicity / **I. I. Goriunova**, Yu. A. Krasylenko, A. I. Yemets, Ya. B. Blume // Cytol. Genet. – 2016. – Vol. 50, N 1. – p. 47–59 (*Дисертантка брала участь у аналізі літератури, проведенні експериментів, спільно з науковим керівником провела обробку та аналіз результатів дослідження, написала та оформила статтю*).
5. **Горюнова І. І.** Порівняльний аналіз впливу нікелю і кадмію на організацію мікротрубочок в клітинах коренів *Arabidopsis thaliana* / **І. І. Горюнова**, А.І. Ємец, Я.Б. Блюм // Укр. Ботан. журн. – 2015. – Т. 72, № 6. – с. 603–609. (*Дисертантка брала участь у проведенні експериментів, спільно з науковим керівником провела обробку та аналіз результатів дослідження, написала та оформила статтю*).
6. **Горюнова І.І.** Влияние никеля на организацию актиновых филаментов в клетках корней *Arabidopsis thaliana* / **І.І. Горюнова**, Ю.А. Красиленко, А.І. Емец, Я.Б. Блюм // Доп. НАН України . – 2016. - №2. – с. 109–116. (*Дисертантка брала участь у проведенні експериментів, спільно з науковим керівником провела обробку та аналіз результатів дослідження, написала та оформила статтю*).

### Тези конференції

1. **Goriunova I.I.** Phytotoxic effects of some metals on the growth and morphology of the *Arabidopsis thaliana* roots / **I. I. Goriunova**, Y. A. Krasylenko, A. I. Yemets // Всеукраїнська конференція для молодих вчених «Актуальні проблеми ботаніки та екології». – Щолкіне, Україна. – 18-22 червня, 2013. – с.221–223.

2. **Горюнова І.І.** Вплив нікелю і кадмію на актинові філаменти коренів *Arabidopsis thaliana* // **І. І. Горюнова, А. І. Ємець** // Заочна конференція «Природничі та медичні науки: актуальні проблеми і перспективи розвитку». – Київ, Україна. – 14 листопада, 2013. – с.8.
3. **Горюнова І.І.** Влияние меди на организацию актиновых филаментов в клетках корней *Arabidopsis thaliana* / **И.И. Горюнова, А.И. Емец** // 2–nd Conference of Young Scientists “Plant Genomics and Biotechnology”. – 23-24 December, 2013. – Kyiv, Ukraine. – с. 45.
4. **Горюнова І.І.** Влияние цинка на организацию актиновых филаментов в клетках корней *Arabidopsis thaliana* // **И.И. Горюнова, А.И. Емец** // 2–nd Conference of Young Scientists “Plant Genomics and Biotechnology”. – 23-24 December, 2013. – Kyiv, Ukraine. – с. 46.
5. **Горюнова І.І.** Влияние цинка на актиновые филаменты клеток *Arabidopsis thaliana* / **И.И. Горюнова, Емец А.И.** // Международная научно-практическая конференция молодых ученых. – Ялта, Україна. – 13-16 травень, 2014. – с. 217.
6. **Horiunova I., Yemets A.** Influence of cadmium on microtubule organization in *Arabidopsis thaliana* / **I. Horiunova, A. Yemets** // 4-й з'їзд Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом. – 17-20 вересня, 2014. – Ужгород, Україна. – с. 15.
7. **Horiunova I.** Effect of cadmium on the organization of microtubules in *Arabidopsis thaliana* root cells / **I. Horiunova, A. Yemets** Influence of cadmium on microtubule organization in *Arabidopsis thaliana* // 4-й З'їзд Українського біохімічного товариства. – Київ, Україна. – 6-10 жовтня, 2014. – с.49.
8. **Горюнова І.І.** Влияние меди на организацию актиновых филаментов в клетках корней *Arabidopsis thaliana* / **И.И. Горюнова, А.И. Емец** // Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира. – 12-17 жовтня, 2014. – Ялта, Україна. – с. 236.
9. **Горюнова І.І.** Влияние никеля на микротрубочки клеток корней *Arabidopsis thaliana* // **И.И. Горюнова, А. И. Емец** // Конференція молодих вчених «Регуляція росту і розвитку: фізіолого-генетичні і біохімічні аспекти». – 11-12 листопада, 2014. – Харків, Україна. – с.109.

#### АНОТАЦІЯ

**Горюнова І. І. Вплив  $Cd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  та  $Cu^{2+}$  на організацію цитоскелету клітин кореня *Arabidopsis thaliana*. – Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія. – ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки», Київ, 2016.

У дисертаційній роботі представлено результати дослідження впливу різних концентрацій токсичних металів – кадмію, нікелю, цинку і міді на ріст і морфологію головних коренів проростків ліній *Arabidopsis thaliana* (GFP-MAR4) і (GFP-FABD2), а також на прижиттєву організацію микротрубочок та микофіламентів в клітинах різних ростових зон їх кореня. Вперше показано,

що кортикальні мікротрубочки в усіх типах інтерфазних клітинах кореню виявились чутливими до впливу різних концентрацій  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  та  $\text{Cu}^{2+}$ , що є однією з причин описаних нами змін приросту і морфології головного кореня. Проте найбільш чутливими до дії  $\text{Cd}^{2+}$  виявились мікротрубочки клітин апікальної меристеми та перехідної зони, до впливу  $\text{Ni}^{2+}$  – кортикальні мікротрубочки зони клітинних поділів та елонгації, для  $\text{Cu}^{2+}$  – мікротрубочки клітин зони клітинних поділів, для  $\text{Zn}^{2+}$  – мікротрубочки клітин перехідної зони. Вперше продемонстровано, що  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  та  $\text{Cu}^{2+}$  викликають порушення нативної організації актинових філаментів, найбільш чутливою до дії  $\text{Cd}^{2+}$  виявились мікрофіламенти клітин епідермісу та апікальної меристеми, для  $\text{Ni}^{2+}$  і  $\text{Zn}^{2+}$  – клітин перехідної зони, для  $\text{Cu}^{2+}$  – клітин зони диференціації. Отримані результати показують безпосередній вплив металів на компоненти цитоскелету, що є однією з причин показаних нами: дозо- і часозалежного інгібування росту головного кореня, відмирання клітин зони меристеми, перехідної зони та частково зони елонгації, свелінгу клітин епідермісу різних ростових зон кореня, а також збільшення довжини та кількості кореневих волосків.

**Ключові слова:**  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  та  $\text{Cu}^{2+}$ , цитоскелет, мікротрубочки, актинові філаменти, цитотоксичність, фітоксичність, *Arabidopsis thaliana*.

### Summary

**Horiunova I. I. Effects of  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  on the organization of the cytoskeleton of *Arabidopsis thaliana* root cells. – Manuscript.**

The thesis of the degree of candidate of biological sciences (specialization 03.00.11 – cytology, cell biology, histology). – Institute of Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2016

The thesis presents the results of the study the effects of different concentrations of toxic metals - cadmium, nickel, zinc and copper on growth and morphology of the primary roots of *Arabidopsis thaliana* seedlings, and on *in vivo* organization of microtubules and microfilaments in cells of different root growth zones. For the first time it has been shown that cortical microtubules in interphase cells of all types of root zones are sensitive to different concentrations of  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$ , which is one of the reasons of observed changes in growth and morphology of the main *A. thaliana* roots. However, microtubules meristematic cells and cells of transition zone were the most sensitive to the  $\text{Cd}^{2+}$  action, cortical microtubules cells division and elongation zones – to the  $\text{Ni}^{2+}$  action, microtubules cells division zone – to the  $\text{Cu}^{2+}$ , microtubules of cells transition zone – to the  $\text{Zn}^{2+}$ . For the first time was demonstrated that  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  disrupt native orientation of actin filaments. However, microfilaments epidermal cells and the apical meristem were most sensitive to the  $\text{Cd}^{2+}$  action, cells transition zone for  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ , cells differentiation zone for  $\text{Cu}^{2+}$ . Our results show a direct metal effect on the cytoskeleton components, which is one of the reasons shown us: concentration- and



time-dependent inhibition of growth of the primary root, cell death of division zone, transition zone and partially elongation zone, epidermal cells swelling of different growth zones of root and increasing the length and quantity of root hairs.

**Keywords:**  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$ , cytoskeleton, microtubules, actin filaments, cytotoxicity, phytotoxicity, *Arabidopsis thaliana*.

### АННОТАЦИЯ

**Горюнова И. Влияние  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  та  $\text{Cu}^{2+}$  на организацию цитоскелета растительных клеток корня *Arabidopsis thaliana*. - Рукопись.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.11 - цитология, клеточная биология, гистология. - ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики», Киев, 2016.

В диссертационной работе представлены результаты исследования влияния различных концентраций токсичных металлов - кадмия, никеля, цинка и меди на рост и морфологию главных корней проростков линий *Arabidopsis thaliana* (GFP-MAP4) і (GFP-FABD2), а также на прижизненную организацию микротрубочек и микрофиламентов в клетках различных ростовых зон их главных корней. С помощью световой, люминисцентной и лазерной сканирующей конфокальной микроскопии впервые показано, что кортикальные микротрубочки во всех типах интерфазных клеток корня оказались чувствительными к воздействию различных концентраций  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  и  $\text{Cu}^{2+}$ , что является одной из причин описанных нами изменений роста и морфологии главного корня. Однако наиболее чувствительными к действию  $\text{Cd}^{2+}$  оказались микротрубочки клеток апикальной меристемы и переходной зоны, к действию  $\text{Ni}^{2+}$  – кортикальные микротрубочки зоны клеточных делений и элонгации, для  $\text{Cu}^{2+}$  – микротрубочки меристематических клеток, для  $\text{Zn}^{2+}$  – микротрубочки клеток переходной зоны. Впервые показано, что  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  и  $\text{Cu}^{2+}$  вызывают нарушения нативной организации актиновых филаментов, наиболее чувствительной к действию  $\text{Cd}^{2+}$  оказались микрофиламенты клеток эпидермиса и апикальной меристемы, для  $\text{Ni}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$  – клеток переходной зоны, для  $\text{Cu}^{2+}$  – клеток зоны дифференциации. Полученные нами результаты показывают непосредственное влияние ионов металлов  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  и  $\text{Cu}^{2+}$  на компоненты цитоскелета, что является одной из причин показанных нами: дозо- и времязависимого ингибирования роста главного корня, отмирание клеток зоны деления, переходной зоны и частично зоны элонгации, раздувание клеток эпидермиса разных ростовых зон корня, а также увеличение длины и количества корневых волосков. В то время как  $\text{Zn}^{2+}$  оказывал незначительную стимуляцию роста главного корня, при этом не вызывая существенных изменений морфологии главного корня. Таким образом, нами

продемонстрировано роль компонентов цитоскелета в стресс-индуцированном ответе растительной клетки на действие разных концентраций  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  и  $\text{Cu}^{2+}$ .

**Ключевые слова:**  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  и  $\text{Cu}^{2+}$ , цитоскелет, микротрубочки, актиновые филаменты, цитотоксичность, фитотоксичность, *Arabidopsis thaliana*