

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

Кваліфікаційна наукова праця  
на правах рукопису

**ПЛОХОВСЬКА СВІТЛАНА ГРИГОРІВНА**

УДК:576.311.348.3+543.272.32+58.036.5

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

03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія  
091 – біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук  
(доктора філософії)

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.



С.Г. Плоховська

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор, академік НАН  
України Блюм Ярослав Борисович

Київ – 2018

## 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 (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія (091-біологія). – Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», Київ, 2018.

Актинові філаменти або мікрофіламенти являють собою високодинамічну сітчасту цитоплазматичну структуру, задіяну у різних клітинних процесах у еукаріотів. Актинові філаменти складаються з висококонсервативного білка актину, який може існувати в клітині у формі мономера (G-актин) або полімера (F-актин). Організація актинових філаментів у рослин, як і в інших еукаріотичних організмів, регулюється рядом допоміжних білків, які визначають сукупність F- або G-актину. Деякі з цих білків швидко зв'язують F-актин, щоб полегшити його взаємодію з іншими клітинними компонентами та/або компонентами цитоскелету. Мікрофіламенти задіяні у таких клітинних процесах у рослин, як підтримання форми клітини і забезпечення її змін, диференціювання та поділ клітин, внутрішньоклітинне переміщення цитоплазматичних структур, відповідь на атаку патогенів.

Одним із швидкозростаючих напрямів досліджень цитоскелету рослинної клітини є вивчення відповіді актинових філаментів на дію різних факторів навколишнього середовища, таких, як гравітація, механічний стрес, важкі метали, високі та низькі температури. Температура є одним із основних абіотичних факторів, який регулює функції рослин під час її розвитку. Аклімація до низьких температур є дуже складним процесом, що включає багато біохімічних та фізіологічних змін. В ряді досліджень показано, що низькі температури призводять до значних змін в організації мікротрубочок

та мікрофіламентів, включаючи їх деполімеризацію. Оскільки існують суперечливі дані щодо впливу холоду на актинові філаменти у різних видів рослин, необхідним є поглиблене вивчення впливу даного стресового фактору на цитоскелетні структури.

Вплив на рослини стресових умов може призвести до посиленого утворення внутрішньоклітинного оксиду азоту (NO) та його похідних, що викликає серію внутрішньоклітинних змін, відомих як нітрозативний стрес. NO являється біологічно-активною сигнальною молекулою, яка бере участь в регуляції різноманітних фізіологічних процесів у рослин. Відомо, що NO залучений до реалізації таких процесів у рослин, як поділ, ріст та диференціація клітин, а також цвітіння, запилення та проростання насіння, формування адаптаційної пластичності рослин при зараженні патогенами різної природи, підтримання адаптивної відповіді рослин на світло, силу тяжіння, осмотичний, оксидативний, низько- та високотемпературні стреси.

Саме тому метою нашого дослідження було з'ясування взаємозв'язку між дією холоду як абіотичного стресового фактору, NO як вторинного посередника в забезпеченні відповіді рослин на дію стресів з однієї сторони, і актиновими філаментами як потенційним компонентом внутрішньоклітинних сигнальних шляхів оксиду азоту з іншої сторони. Для вирішення цього питання було вивчено комбінований вплив попередньої обробки проростків *A. thaliana* донором NO нітропрусидом натрію (SNP) та його скавенджером карбокси-2-феніл-4,4,5,5-тетраметилімідазолін-1-оксил-3-оксид (сРТЮ) з подальшим впливом низьких температур (+4°C; +0,5°C) на ріст і морфологію первинних коренів *A. thaliana*, а також організацію актинових філаментів в клітинах різних ростових зон кореня.

В результаті проведених досліджень встановлено, що експозиція проростків *A. thaliana* при температурах +4°C і +0,5°C призводить до значних змін параметрів росту і розвитку головних коренів. Після експозиції при температурі +4°C через 24 год відбувається інгібування росту коренів приблизно в 2,8 рази, через 48 год – в 3,1 рази, а через 72 год – в 3,6 рази в

порівняні з необробленими проростками. Зі зниженням температури до  $+0,5^{\circ}\text{C}$  посилюється інгібування росту коренів *A. thaliana*. Так, через 24 год інтенсивність росту зменшувалась в 3 рази, через 48 год – в 3,2 рази, а через 72 год – в 4 рази.

Виявлено, що низькі температури призводять до значних порушень морфології первинних коренів проростки *A. thaliana*. Зокрема, експозиція при температурі  $+4^{\circ}\text{C}$  ініціює деформацію кореневого апексу, укорочення зони росту, а також розбухання і формування ектопічних кореневих волосків в безпосередній близькості від меристематичної зони кореня. При цих же умовах спостерігалася поява великої кількості кореневих волосків з порушеною морфологією в зоні диференціації. Крім того, нами виявлено, що більш низька температура,  $+0,5^{\circ}\text{C}$ , спричиняє анізотропне розбухання епідерманих клітин (свелінг) перехідної зони та зони розтягу кореня *A. thaliana*. Очевидно, що гальмування росту коренів та порушення їх морфології є прямим результатом дії низьких температур на видовження кореня та поділ клітин, а до реалізації цих ефектів можуть бути пов'язані з порушенням організації їх цитоскелету, зокрема мікрофіламентів.

У зв'язку з цим на наступному етапі наших досліджень було вивчено вплив низьких температур на організацію актинових філаментів в різних типах клітин кореня *A. thaliana*. Виявлено, що в епідермальних клітинах і клітинах власне меристеми контрольних зразків мікрофіламенти представлені у вигляді тонкої високодинамічної сітчастої структури та розміщуються по всій цитоплазмі клітини. В перехідній зоні кореня актинові філаменти мають вигляд пучків F-актину, що розміщуються навколо ядра і приєднуються поперечними тяжами до клітинної стінки. В зоні розтягу пучки F-актину також розміщуються навколо ядра, а біля поверхні клітини спостерігаються більш товсті і помітні пучки F-актину. Актинові філаменти представлені також в клітинах з апікальним типом росту, зокрема в кореневих волосках. 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. Отримані результати узгоджуються з літературними даними щодо закономірностей організації актинових філаментів в клітинах кореня *A. thaliana*.

Вплив низьких температур на проростки *A. thaliana* призводить до чітких змін у початковій організації актинових філаментів у клітинах усіх досліджуваних зон кореня. У епідермальних клітинах кореневого апексу і в клітинах власне меристеми вже через 1 год після початку експозиції при температурі  $+4^{\circ}\text{C}$  спостерігалася більш тонка і розріджена мережа мікрофіламентів. Через 2 год після початку впливу холоду розріджена мережа актинових філаментів стає ще більш тонка та спостерігається її часткова деполімеризація. Відбуваються також зміни організації мікрофіламентів у зоні розтягу кореня *A. thaliana* після експозиції при температурі  $+4^{\circ}\text{C}$ , де вони зазнають реорієнтації, стають більш тонкими вже через 1 год і були видимими як короткі пучки F-актину через 2 год. Виявлено, що значно підвищена чутливість до холоду є характерною для актинових філаментів в трихобластах і атрихобластах зони диференціації та корневих волосках. Вже через 1 год після впливу температури  $+4^{\circ}\text{C}$  в корневих волосках можна було спостерігати тонку мережу мікрофіламентів та їх часткову деполімеризацію. Через 2 год можна було побачити тільки яскраві точкові структури або короткі пучки F-актину.

У епідермальних клітинах кореневого апексу після впливу температури  $+0,5^{\circ}\text{C}$  також відбуваються зміни нативної організації актинових філаментів. Через 2 год впливу холоду спостерігали більш розріджену мережу мікрофіламентів і їх часткову деполімеризацію. В клітинах зони меристеми після впливу температури  $+0,5^{\circ}\text{C}$  вже через 1 год можна спостерігати більш тонку і розріджену мережу актинових філаментів. Через 2 год в окремих клітинах відбувається їх повна деполімеризація. В епідермальних клітинах зони розтягу кореня через 1 год після експозиції при температурі  $+0,5^{\circ}\text{C}$

утворюється мережа актинових філаментів з більш вираженою поперечною орієнтацією у порівнянні з контролем. Через 2 год після початку впливу холоду в окремих клітинах спостерігалася часткова або повна деполімеризація мікрофіламентів, що, можливо, є причиною порушень морфології коренів в даній області. В корневих волосках мережа актинових філаментів поступово перетворюється на рідкі поодинокі яскраві стрижні або точки F-актину. Через 2 год після початку експозиції при температурі  $+0,5^{\circ}\text{C}$  спостерігаються яскраві точки F-актину та часткова деполімеризація актинових філаментів, що може призвести до порушення ініціації формування та росту корневих волосків.

На наступному етапі наших досліджень було вивчено комбінований вплив низьких температур та донора (SNP) і скавенджера (сРТІО) оксиду азоту на організацію актинових філаментів в різних типах клітин кореня *A. thaliana*. Виявлено, що ріст і диференціація головних коренів чутливі до вмісту екзогенного NO. При комбінованій дії холоду та донора NO SNP в концентрації 100 мкМ відбувається часткове стимулювання росту коренів і формуються численні зачатки корневих волосків. Зворотна картина спостерігається при комбінованій дії холоду та скавенджера NO сРТІО в концентрації 100 мкМ. Відбувається зменшення швидкості росту коренів і формуються кореневі зачатки з порушеною морфологією, частина з яких є роздутими, інші є розгалуженими або викривленими, і їх подальший ріст припиняється.

Після комбінованого впливу температури  $+4^{\circ}\text{C}$  та SNP в концентрації 100 мкМ вже через 1 год відбувається часткове відновлення сітки актинових філаментів в епідермальних клітинах кореневого апексу, утворюються тонкі закручені актинові тяжі, що рівномірно заповнюють весь об'єм клітини. Тоді, як в клітинах меристеми комбінований вплив температури  $+4^{\circ}\text{C}$  і донора NO призводить до відновлення сітки актинових філаментів в цих клітинах. Спостерігається зменшення клітин з частковою і повною деполімеризацією, мікрофіламенти знову починають закручуватись і скупчуватись, утворюючи

сітку навколо ядра клітини. Після комбінованого впливу температури  $+4^{\circ}\text{C}$  та SNP в концентрації 100 мкМ в клітинах зони розтягу скупчення ниток в товсті пучки не спостерігається, а відбувається їх дезорієнтація і реорієнтація у порівнянні з контрольними зразками. В клітинах зони диференціації та корневих волосках комбінована дія холоду та SNP (100 мкМ) призводить до скупчення актинових філаментів і вони заповнюють весь об'єм клітини, візуалізуються у вигляді сітчастої структури.

Комбінований вплив температури  $+0,5^{\circ}\text{C}$  та SNP (100 мкМ) також призводить до часткового відновлення сітки мікрофіламентів, але в меншій мірі, що 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. Після комбінованої дії температури  $+0,5^{\circ}\text{C}$  та SNP в концентрації 100 мкМ в епідермальних клітинах зони розтягу кореня актинові філаменти спостерігаються у вигляді тонкої сітчастої структури, що заповнює весь об'єм клітин. В клітинах корневих волосків повна деполімеризація актинових філаментів не спостерігається, а можна спостерігати залишки F-актину по периферії клітин, що також свідчить про початковий етап відновлення актинових філаментів.

Після комбінованого впливу холоду ( $+4^{\circ}\text{C}$ ,  $+0,5^{\circ}\text{C}$ ) та сРТЮ в концентрації 100 мкМ мікрофіламенти в епідермальних клітинах і власне клітинах меристеми не візуалізувались взагалі, що свідчить про їх руйнування і повну деполімеризацію в даній області. Як і в епідермальних клітинах кореневого апексу, так і в епідермальних клітинах зони розтягу головного кореня *A. thaliana* актинові філаменти являють собою систему довгих пучків мікрофіламентних структур, рівномірно розташованих в середині клітини. Після обробки сРТЮ в концентрації 100 мкМ актинова сітка розріджувалася і частково деполімеризувалась. Після комбінованого впливу низьких температур та сРТЮ (100 мкМ) відбувається деполімеризація актинової сітки, лише в окремих клітинах можна було

спостерігати довгі поодинокі тяжі мікрофіламентів. Комбінована дія низьких температур і скавенджера NO в корневих волосках призводила до більш сильних змін, що супроводжувалось руйнуванням актинових філаментів. Лише на периферії клітини можна було спостерігати короткі точкові структури F-актину.

Нами вперше було використано програмне забезпечення MicroFilament Analyzer (MFA) для дослідження орієнтації актинових філаментів в середині клітини після впливу холодового фактору та комбінованого впливу донора (SNP) і скавенджера (сРТЮ) оксиду азоту та виявлено, що дана програма є зручним інструментом, який стандартизує обробку складних зображень і доповнює наші дані щодо змін організації мікрофіламентів під час впливу низьких температур в живих клітинах. Вперше було встановлено, що під впливом холоду та комбінованого впливу змін концентрації ендogenous NO, індукованих дією донора (SNP) та скавенджера (сРТЮ) 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. 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. Отже, холодоровий сигнал може передаватися на актинові філаменти за допомогою NO, викликаючи зміни їх організації та орієнтації залежно від значення температури. Таким чином, виявлення взаємозв'язку між дією холоду, оксидом азоту та актиновими філаментами свідчить про залучення останніх до загального внутрішньоклітинного каскаду реалізації ефектів оксиду азоту на рослинний організм.



**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 (сРТІО), реорганізація мікрофіламентів.

## Список публікацій за темою дисертаційної роботи

### Статті:

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 // Доповіді Національної академії наук 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 // Cytology and Genetics. – 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 Biology International. – 2017. – doi: 10.1002/cbin.10931. (Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).

Тези:

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 4<sup>th</sup> 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.

## SUMMARY

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

Dissertation for scientific 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 actin filaments (AFs) or microfilaments are cytoskeletal filamentous structures involved in different cellular processes in plants. Actin filaments consist of a highly conserved protein actin, which can exist in a cell in the form of a monomer (G-actin) or a polymer (F-actin). The organization of plant actin filaments, as in other eukaryotic systems is regulated by a numerous proteins that interact with F- and globular G-actin in order to determine their populations. Some of these proteins bind filamentous (F-) actin immediately to relieve its interaction with other cellular components and/or cytoskeletal compounds. Several cellular processes in plant cells, as cell division and differentiation, cell shape determination, cell wall deposition, organelle movement, response to biotic and abiotic stress, depend on microfilament organization.

Study the response of actin filaments on the effect of various environmental factors, such as gravity, mechanical stress, high and low temperature and heavy metals is one of the rapidly developing areas of plant cell cytoskeleton research. One of the important features of cytoskeletal structures is their sensitivity to low (not freezing) temperatures, which is accompanied by the reversible assembly of depolymerizing structures. Temperature is a one with basic abiotic factor that regulates plant function during development. Low temperature acclimation is very complex process, that include many biochemical and physiological changes. Cold is one of the most important abiotic factors limiting growth and development in the plant. In a number of studies show that low temperature leads to significant

changes in the organization of microtubules and actin filaments, including their depolymerization. Since, there are exist conflicting data concerning cold influence on actin filaments in different plant species the further profound study of cold stress on these cytoskeleton structures has to be continued.

Prolonged exposure of plants to stress conditions may result in the enhanced production of NO and its derivatives, which would produce a series of intracellular alterations, known under common term of NO-stress (nitrosative stress). Nitric oxide (NO) is a small, highly diffusible gas and a ubiquitous bioactive molecule. Its chemical properties make NO a flexible signal molecule that functions through interactions with cellular target via either redox or additive chemistry. The role of NO in plants is considerable: NO is involved in the cell cycle regulation, differentiation and morphogenesis, including flowering and root formation. Furthermore, NO promotes the adaptive plasticity upon pathogen infections, accounts for the hypersensitive response and the acquired systemic response, and increases resistance to abiotic stresses through its antioxidant action.

Thus, the aim of the present study was to investigate the influence of low temperature and combined effect of the donor/scavenger NO and cold on growth, morphology and organization of actin cytoskeleton in living plant cells sing.

It was found that the treatment of *A. thaliana* seedlings with the temperature of +4°C resulted in significant changes in the parameters of growth and development of the primary roots. The intensity of the primary root growth decreased approximately by 2.8–2.9 times (compared with control) after 24 h, 3.1–3.2 times after 48 h, and 3.6–3.7 times in 72 h of low temperature treatment. It has been revealed that root treatment with +0.5°C has clear inhibitory effect on primary root growth as comparable with untreated seedlings. Thus, treatment of *A. thaliana* seedlings with +0.5°C during 24 h caused about 3 fold decrease of primary roots growth rate, during 48 h - 3.2 fold decrease and during 72 h - 4 fold decrease of growth rate. It is known that the inhibition of primary root growth is a consequence of negative effect of low temperature on root cell division and

elongation, which, in turn, may be associated with impaired organization of cytoskeleton and, in particular, microfilaments.

We have also found that the exposure of *A. thaliana* roots at low positive temperature led to significant disruptions of primary root morphology. In particular, cold treatment initiated the deformation of the root apex, shortening of the growth zone, swelling, and the formation of ectopic root hairs near meristematic zone. Under the same conditions, the appearance of a large number of root hairs with impaired morphology in the differentiation zone was observed. Also, we have found that treatment of *A. thaliana* roots with +0,5°C leads to a significant impairment in the morphology of the primary roots. In particular, the cold causes anisotropic increase of epidermal cells in elongation zone.

The next step of our research was to study the organization of the AFs *in vivo* in various cell types of *A. thaliana* primary roots after a cold treatment. It is known that plant cells from the meristematic zone of root have thin and highly dynamic network structure of microfilaments, filling the entire cytoplasm. AFs are represented in the cells of root transition zone as the bundles of F-actin that are arranged around the nucleus and attached to the cell wall with transverse strands. The bundles of F-actin in the cells of elongation zone are located in the perinuclear area, and thicker and more visible accumulations of F-actin bundles oriented radially or in a random manner are observed in the peripheral cell cytoplasm. Microfilaments are uniformly distributed in the cells of differentiation zone throughout the cytoplasm and consist mainly of thick F-actin bundles oriented mainly in the longitudinal direction. A dense network of F-actin bundles that fill the cell cytoplasm forms in the early phases of root hair development. In a further stage of root hair development, the bundles of F-actin are stretched and oriented in the direction of hair growth and form a very thin, dense, and dynamic network of microfilaments in the apex.

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 was observed in the epidermal

cells of the meristematic zone already after 1 h from the beginning of exposure at +4°C. After 2 h of cold treatment, disordered network of microfilaments became sparser and its partial depolymerization was observed. Changes in the microfilament organization, including their partial depolymerization, also occurred in the meristematic cells after 1 h from the beginning of exposure at +4°C. Severe damage of microfilaments and even their full depolymerization were observed in individual cells after 2 h of exposure. We have also found changes in the native organization of actin filaments in the elongation zone of *A. thaliana* after exposure at +4°C, where they reoriented, became thinner after 1 h and were visible as short bundles of F-actin after 2 h (Fig. 4, 8, 9). It was found that the increased sensitivity to cold 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 already after 1 h root treatment at +4°C. Only brightly colored dot structures or short bundles of F-actin could be seen after 2 h.

In epidermal cells of the root apex after cold treatment (+0,5°C) happen changes in orientation of the actin filaments as compared to cells untreated seedlings. After 2 h of cold treatment, disordered network of microfilaments became sparser and its partial depolymerization was observed. After root treatment with + 0.5°C for 1 h in meristematic cells thinner and sparser network of AFs was observed. Exposure to cold during 2 h caused partial depolymerization of AFs and in some cells their complete depolymerization was observed. In epidermal cells of the elongation zone after treatment with +0,5°C for 1 h AFs formed network with more pronounced transverse orientation as compared to a control. After 2 h of the cold treatment in individual cells of the elongation zone partial or complete depolymerization of microfilaments was observed that is possibly the cause of violations root morphology in this area. It has been found that highly sensitive to low temperature the AFs are present in cells of differentiating zone, including root hairs. First observed effects of cold treatment, which became apparent after 1 h, were the disruption of AFs. This network is gradually becoming rare only bright shining rods or point of actin were observed. After 2 h of cold treatment a bright



stains F-actin and a partial depolymerization of microfilaments were observed that can lead to disruption of initiation of formation and growth of root hairs.

The next step of our research was the study of combined effects of low temperature and NO donor or scavenger on the organization of AFs in living cells of *A. thaliana* primary roots. We found that the growth and differentiation of the main roots of *A. thaliana* are 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 c-PTIO (NO scavenger) treatment it was found the size increase of cells (swelling) in transition and elongation zones of primary roots, induction of primordial formation of root hairs.

Thus, the combined effects of low temperature and 100  $\mu$ M SNP as a donor of NO led to restoration of the microfilament mesh in all types of cells after +4°C treatment. In epidermal cells the thin wreathed threads that uniformly filled the entire volume of cells were formed. There was a decrease of cell number with partial and complete depolymerization in meristematic cells, AFs again began to twist and accumulate and formed a network around the cell nucleus. A partial recovery of AFs mesh in epidermal cells of the elongation and differentiation zones was occurred. In elongation cells the thin network was also visualized as compared to treated with cold only roots where AFs did not visualized. The combined effect of low temperature and 100  $\mu$ M SNP also resulted in stabilization of actin filaments in cells of differentiation zone and root hairs. We have shown earlier what SNP stimulates restoration of AFs after treatment with temperature +0,5°C. It was found a network of renewal filaments structures after combined influence SNP and cold treatment. Also disoriented microfilaments restored their orientation by exogenous donor of NO, which correlates positively with response to cold.

Reversible changes observed after the combined influence of cold and NO scavenger. However, treatment with 100  $\mu$ M c-PTIO only caused randomization and fragmentation of AFs in epidermal cells. After the combined action of cold and scavenger c-PTIO AFs did not visualized in epidermal and meristematic cells,

indicating on full depolymerization in these cells. In epidermal cells of elongation zone the partial depolymerization of AFs network was found, and long threads of AFs were observed in some cells. In root hairs treatment with low temperature and c-PTIO led to more severe changes that accompanied with the disruption of actin cytoskeleton. Only short F-actin structures or dots could be detected on the periphery of cells. Treatment with cold led to disorganization and partial depolymerization of AFs, and in some cells they were not visualized that proves the negative influence of c-PTIO.

The analysis with MicroFilament Analyzer (MFA) software has shown that cold stress and exposure time are important factors affecting the orientation of actin filaments. We have found that not only the sparseness of actin network and AFs polymerization/depolymerization in cells of different zones of the root apex occurs, but microfilament orientation changes also after cold treatment and combined treatment with low temperature and exogenous NO. Using MFA software to determine the effects of low temperatures on microfilaments is essential for a more accurate and detailed understanding of cold effect on the behavior of these filamentous structures in *A. thaliana* in a quickly and standardized manner. 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. Thus, the detection of the relationship between the effect of cold, nitric oxide and actin filaments testifies to the involvement of the latter in the general intracellular cascade of the effects of nitric oxide on the plant organism.

**Keywords:** plant cytoskeleton, actin filaments (microfilaments), low temperature, nitric oxide, donor NO, sodium nitroprusside (SNP), scavenger NO,

2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (cPTIO),  
microfilament reorganization.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	23
ВСТУП.....	24
РОЗДІЛ 1. СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНА ОРГАНІЗАЦІЯ АКТИНОВИХ ФІЛАМЕНТІВ В РОСЛИННИХ КЛІТИНАХ.....	32
1.1. Особливості організації актинових філаментів та їх динамічні властивості.....	32
1.2. Білки, асоційовані з актиновими філаментами.....	33
1.3. Особливості організації актинових філаментів в ході клітинного циклу та різних типах рослинних клітин.....	36
1.4. Джерела гетерогенності популяцій актинових філаментів.....	38
1.4.1. Ізотипи рослинних актинів.....	38
1.4.2. Посттрансляційні модифікації актину тварин та рослин.....	39
РОЗДІЛ 2. КЛІТИННІ МЕХАНІЗМИ ВІДПОВІДІ РОСЛИН НА ХОЛОДОВИЙ СТРЕС.....	42
2.1. Фізіологічні аспекти впливу холоду на рослину.....	42
2.2. Відповідь рослинних клітин на дію екстремальних температур.....	43
2.2.1. Молекулярно-генетичні механізми впливу холоду на рослинні клітини.....	44
2.2.2. Роль вторинних посередників в рослинній клітині під час холодового стресу.....	45
2.2.3. Ca <sup>2+</sup> як вторинний посередник.....	47
2.3. Вплив низьких температур на цитоскелет рослинної клітини.....	48
РОЗДІЛ 3. ЗАЛУЧЕННЯ ОКСИДУ АЗОТУ НА СТРЕС У РОСЛИН.....	52
3.1. Функціональна роль NO у рослин.....	52
3.2. Протекторні властивості NO при впливі на рослини біотичних та абіотичних стресових факторів.....	54

РОЗДІЛ 4. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	60
4.1. Рослинний матеріал.....	60
4.2. Характеристика використаних у роботі реактивів.....	60
4.3. Підготовка та обробка рослинного матеріалу.....	61
4.3.1. Умови вирощування проростків ліній <i>A. thaliana</i> та режими їх обробки низькими температурами.....	61
4.3.2. Умови впливу модуляторів вмісту оксиду азоту на проростки <i>A. thaliana</i> та його комбінований вплив з холододовим стресом.....	62
4.4. Методи досліджень.....	62
4.4.1. Вивчення впливу холоду на ріст коренів <i>A. thaliana</i> .....	63
4.4.2. Вивчення впливу низьких температур та модуляторів вмісту NO на морфологію первинних коренів <i>A. thaliana</i> і організацію актинових філаментів у його клітинах.....	64
4.4.3. Визначення змін орієнтації актинових філаментів під впливом холододового стресу за допомогою програмного забезпечення Microfilament Analyzer.....	65
РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР ТА КОМБІНОВАНА ДІЯ ЕКЗОГЕННОГО NO І ХОЛОДУ НА РІСТ ТА МОРФОЛОГІЮ ПЕРВИННИХ КОРЕНІВ <i>A. THALIANA</i> .....	66
5.1. Особливості будови кореня <i>A. thaliana</i> .....	66
5.2. Вплив низьких температур на ріст головного кореня проростків <i>A. thaliana</i> .....	69
5.3. Вплив низьких температур на морфологічні показники головних коренів <i>A. thaliana</i> .....	71
5.4. З'ясування особливостей комбінованого впливу екзогенного NO та низьких температур на ріст і морфологію первинних коренів <i>A. thaliana</i> .....	76
РОЗДІЛ 6. ВПЛИВ НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР ТА КОМБІНОВАНА ДІЯ ДОНОРА (SNP) І СКАВЕНДЖЕРА (сРТЮ) ОКСИДУ АЗОТУ ТА ХОЛОДУ НА ОРГАНІЗАЦІЮ АКТИНОВИХ ФІЛАМЕНТІВ У КЛІТИНАХ	

КОРЕНЯ <i>A. THALIANA</i> .....	81
6.1. Особливості організації актинових філаментів в різних типах клітин первинних коренів <i>A. thaliana</i> .....	81
6.2. Вплив температури +4°C на організацію актинових філаментів в різних типах клітин кореня проростків <i>A. thaliana</i> .....	84
6.3. Вплив температури +0,5°C на організацію актинових філаментів в різних типах клітин кореня проростків <i>A. thaliana</i> .....	88
6.4. Комбінований вплив донора/скавенджера NO (SNP/cPTIO) та низьких температур на організацію актинових філаментів в різних типах клітин головного кореня проростків <i>A. thaliana</i> .....	91
<b>РОЗДІЛ 7. УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ВПЛИВУ НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР ТА ЕКЗОГЕННОГО NO НА ОРІЄНТАЦІЮ МІКРОФІЛАМЕНТІВ В КЛІТИНАХ КОРЕНЯ <i>A. THALIANA</i> ЗА ДОПОМОГОЮ ПРОГРАМНОГО ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ.....</b>	<b>97</b>
7.1. Визначення основних закономірностей орієнтації актинових філаментів в різних типах клітин кореня проростків <i>A. thaliana</i> .....	97
7.2. Визначення орієнтації актинових філаментів в клітинах головного кореня проростків <i>A. thaliana</i> після комбінованого впливу низьких температур та донора/скавенджера NO (SNP/cPTIO).....	100
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	106
ВИСНОВКИ.....	114
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	117

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

- GFP – зелений флуоресцентний білок;
- SNP – нітропрурид натрію (натрій нітрузофериціанід дегідрат); донор NO
- cPTIO – карбокси-2-феніл-4,4,5,5-тетраметилімідазолін-1-оксил-3-оксид; скавенджер NO
- ADF/cofilin – білок, що деполімеризує актинові філаменти (actin depolymerizing factor/cofilin);
- Arp 2/3 – білок, що спричиняє нуклеацію актинових філаментів (actin-related protein 2/3 complex);

## ВСТУП

**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  $\alpha$ - і  $\beta$ - тубуліну. Актинові філаменти утворюються закрученими один навколо одного тяжами, які складаються з глобулярних молекул актину [19, 97, 134, 185]. Одним із швидкозростаючих напрямів досліджень цитоскелету рослинної клітини є вивчення його відповіді на дію різних факторів навколишнього середовища, таких, як гравітація [24, 205, 187], механічний стрес [242, 57], високі [181, 230] та низькі температури [65, 248, 69], важкі метали [188, 68, 268] 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 [167, 248, 179].

До цих пір в більшості робіт головна увага приділялась вивченню впливу холодowego 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 [159, 262, 14]. 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* [204]. 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 [70].

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°C, в той час як мікротрубочки за таких умов деполімеризуються [9]. 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 невпорядкованої 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 [184].

Відомо, що при дії різних абіотичних факторів зростає внутрішньоклітинний вміст ендogenousного оксиду азоту (NO) – універсального вторинного посередника у клітинах еукаріот [165, 23]. Відомо, що NO залучений до регуляції численних процесів у рослин, зокрема, поділу, росту та диференціації клітин [174], цвітіння, запилення та проростання насіння [28, 263], адаптивної відповіді рослин на світло, силу тяжіння, осмотичний, оксидативний, а також низько- та високотемпературні стреси [178, 261, 131, 213]. Показано, що обробка донором NO нітропрусидом натрію (SNP) стимулює утворення та ріст бокових коренів у томатів, інгібуючи при цьому ріст головного кореня. При додаванні скарвенджера NO сРТЮ відбувається інгібування росту головного і бокових коренів [49]. Тривала чи короткочасна дія абіотичних або біотичних чинників середовища на рослину може спричинити розвиток нітрозативного стресу, який проявляється у посиленні синтезу ендogenousного NO [234, 47]. Температурний стрес викликає збільшення концентрації ендogenousного NO в клітинах, отож застосування донорів NO підвищує холодостійкість в таких рослин, як томати, пшениця та кукурудза [165]. 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:

1. 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*.

2. Дослідити вплив низьких температур (+4°C, +0,5°C) та скавенджера NO карбокси-2-феніл-4,4,5,5-тетраметилімідазолін-1-оксил-3-оксид (сРТІО) на ріст та морфологію головних коренів проростків *A. thaliana*.

3. Вивчити вплив низьких температур на особливості просторової організації актинових філаментів в клітинах різних зон головного кореня проростків *A. thaliana*.

4. 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*.

5. 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*.

6. 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).

7. 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 холодного 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 конференції.

**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.

\*\*\*

Дисертант висловлює щиру подяку науковому керівнику академіку НАН України, професору, д.б.н. Блюму Ярославу Борисовичу за наукове керівництво та обрання актуальної теми дисертаційної роботи, допомогу при інтерпретації отриманих результатів та написанні дисертаційної роботи. Автор дякує член-кореспонденту НАН України, професору, д.б.н. Ємець Аллі Іванівні за цінні поради та допомогу під час проведення досліджень та аналізу результатів. Здобувач висловлює подяку співробітникам Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України: члену-кореспонденту НАН України, професору, д.б.н. Кордюм Єлизаветі Львівні, м.н.с. Заславському Віктору Абрамовичу, в.о. провідного інженера Івасі Вікторії Леонідівні за допомогу в проведенні досліджень. Дисертант також висловлює подяку колегам та співробітникам ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки» НАН України за допомогу та консультації при плануванні експериментів. Також, автор дякує рідним та близьким за розуміння і підтримку під час виконання дисертаційної роботи.

# РОЗДІЛ 1

## СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНА ОРГАНІЗАЦІЯ АКТИНОВИХ ФІЛАМЕНТІВ В РОСЛИННИХ КЛІТИНАХ

(Огляд літератури)

### 1.1. Особливості організації актинових філаментів та їх динамічні властивості

Актинові філаменти відіграють вирішальну роль в розвитку рослини, регулюючи низку таких фундаментальних клітинних процесів, як диференціація та ріст клітини, міжклітинні взаємодії, клітинна моторика, зокрема рухливість органел та транспорт везикул, відповідь на дію стресових факторів та ін. [185, 248, 60, 97, 134]. Актинові філаменти складаються з висококонсервативного білка актину, який може існувати в клітині у формі мономера (G-актин, «глобулярний актин») або полімера (F-актин, «фібрилярний актин»). G-актин – асиметричний глобулярний білок, що складається з двох доменів і має молекулярну масу 42 кДа. В процесі підвищення іонної сили G-актин зворотно агрегує, утворюючи в процесі полімеризації лінійний, скручений в спіраль полімер – F-актин, товщиною 8 нм [41, 239, 201]. На кінці нитки актину, що росте, вбудовуються мономери, які містять АТФ. По мірі наростання полімеру відбувається їх гідроліз, тобто F-актин проявляє властивості АТФази [25].

Волокна F-актину мають два кінці – (+) і (-), які полімеризуються з різною швидкістю. Ці кінці не стабілізовані спеціальними білками, і при критичній концентрації G-актину плюс-кінець видовжується, а мінус-кінець вкорочується. Для утворення довгих мікрофіламентів необхідна наявність початкового агрегату із такої кількості мономерів, якої буде достатньо для стабілізації. Такий агрегат називається ядром, а процес його утворення – нуклеацією. Для ініціації утворення мікрофіламентів ядро повинно складатись мінімум із трьох субодиниць [215]. У вільних мономерах актину



гідроліз нуклеотидів відбувається дуже повільно. Для пришвидшення цього процесу необхідна дія певного фактора – білків, які активують ГТФази або АТФази. Актинові філаменти можуть існувати у двох формах: «Т-формі» (мономери зв'язані із ГТФ чи АТФ) та «Д-формі» (мономери зв'язані із ГДФ чи АДФ). Імовірність того, що певна субодиниця філаменту цитоскелету гідролізує зв'язаний нуклеотидтрифосфат і перейде у Д-форму, тим більша, чим довше ця субодиниця перебуває у складі полімеру. Тому посередині філаменту, де всі мономери вже «давні», вони мають у своєму складі нуклеотиддифосфати. До кінців приєднуються переважно нові молекули у Т-формі (оскільки концентрація АТФ чи ГТФ у цитоплазмі в десятки разів перевищує концентрацію АДФ та ГДФ відповідно). На мінус-кінці полімеризація відбувається повільно, тому гідроліз «встигає» за нею, і не відбувається накопичення субодиниць у Т-формі. Натомість на плюс-кінці, де полімеризація значно швидша, утворюється «кеп» з кількох субодиниць, що містять негідролізовані нуклеотидтрифосфати. Таким чином один кінець (плюс) філамента перебуває у Т-формі, а інший (мінус) – у Д-формі і при концентрації вільних філаментів плюс-кінець ростиме, а мінус-кінець – вкорочуватиметься, а загальна довжина не буде змінюватись. Цей процес називається **тредмілінгом**. Він спостерігається як у мікротрубочок, так і в мікрофіламентів, але характерніший для останніх [239, 97, 186].

## 1.2. Білки, асоційовані з актиновими філаментами

На сьогодні добре відомо, що актин здатний утворювати різноманітні структури разом з великою кількістю актин-зв'язуючих білків. В цитоплазмі налічується близько 50 різних типів білків, які специфічно взаємодіють з актином, в тому числі білки нуклеації, деполімеризації, роз'єднання, кепування, стабілізації F-актину та ізоляції G-актину [97, 59, 60, 232].

Існують білки, що зв'язують мономери актину, таким чином даючи їм змогу полімеризуватися і регулювати об'єм G-актинового пулу, наприклад,

профілін, ADF/кофілін (actin depolymerizing factor/cofilin), AIP1 (actin interacting protein 1), CAP (capping actin protein), аденілат синтазо-зв'язуючий білок [60, 147, 136]. Профілін (12-15 кДа) розміщується на кепуючому кінці філамента і тим самим ізолює G-актин, запобігаючи його полімеризації, а також викликає спонтанну нуклеацію нових мікрофіламентів [110]. ADF/кофілін (15-19 кДа) впливає на динамічні властивості актинових філаментів і виступає як посередник в процесах деполімеризації актину [16, 31]. ADF/кофілін зв'язується як з F-актином, так і з G-актином, і його діяльність регулюється безпосередньо зв'язуванням із специфічними фосфоінозидами, змінами рН, і опосередковано за допомогою  $\text{Ca}^{2+}$  через процеси фосфорилування [142, 5, 17]. AIP1 – актин-регуляторний білок, який підсилює розбирання актину, індуковане ADF/кофіліном, кепуючи кінці розірваних філаментів, таким чином запобігаючи подовженню загострених кінців [172].

Інша група актин-зв'язуючих білків – кепуючі білки, до яких відносяться гельзолін, CP (capping protein), CapG, CapZ, фрагінін,  $\beta$ -актинін, cap32/34. Кепуючі білки є гетеродимерним білковим комплексом, який складається з  $\alpha$ - (32-36 кДа) та  $\beta$ - (28-32 кДа) субодиниць [33, 45]. Дані білки контролюють процеси збирання/розбирання актинових філаментів, запобігаючи приєднанню чи відщепленню мономерів на кінцях фібрили. Біохімічні дослідження показують, що CP зв'язуються з високою спорідненістю ( $K_d$  values 0,06-5 нм) з гострим кінцем філамента, запобігаючи втраті субодиниць і блокуючи приєднання нових мономерів до плюс кінця [95, 46]. Гельзолін (знайдений у пилкових трубках маку) та подібні білки ініціюють процес полімеризації актину з мономерів. На С-кінці молекули гельзоліну розміщений  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливий актин-зв'язуючий сайт, а на N-кінці молекули знаходиться інгібуючий PIP2 сайт зв'язування полімеру актину. Гельзолін може щільно приєднуватися до загостреного кінця філаменту, чим дозволяє подовжуватися лише плюс кінцю філамента [103, 130, 151].

Білки нуклеації впливають на збирання мікрофіламентів шляхом створення затравки для полімеризації актину. До даної групи відносять формін, Arp2/3 комплекс, Pan1, Nap125, PIR121, BRICK1, WASp, SCAR, WAVE [60]. Формін – одна з важливих груп білків, асоційованих з актином, що стимулює актинову нуклеацію і ріст загостреного кінця. У *A. thaliana* знайдено чотири форміни AtFH1, AtFH4, AtFH5 і AtFH8, які здатні нуклеатувати чистий актин і дозволяють видовжувати загострений мінус-кінець філамента [99, 154, 254]. В клітинах дріжджів і тварин активація комплексу Arp2/3 спричиняє нуклеацію F-актину з боку існуючих мікрофіламентів під кутом  $70^\circ$  і забезпечує формування пучків F-актинової сітки [90]. Гени, що кодують субодиниці комплексу Arp2/3 добре дослідженні на геномі *A. thaliana* [152].

До актин-зв'язуючих білків, що відповідаються за зшивання і укладку актину відносять гелъзолін, вілін, фімбрін,  $\beta$ -актинін, філамін, фасцин, епсин. Вілін – тканинспецифічний актин-зв'язуючий білок, який приєднується до С-кінця і служить як «ковпачок» (headpiece – HP). Вілін спочатку локалізується в ядрі (в доменах G1 і G2), а потім приєднується для зшивання мікрофіламентів. Віліни можуть утворювати димери, розташовуючись паралельно за допомогою N-кінцевого домену і активують виключно один актин-зв'язуючий домен [78]. Фімбріни ж складаються з двох актин-зв'язуючих доменів (ABD1 та ABD2) кожний з яких містить тандем доменів [117]. Дослідження з використанням зеленого флуоресцентного білка (GFP) злитого з першим доменом із *A. thaliana* (AtFIM1) показали вирішальну роль, яку відіграє ABD2 в зв'язуванні F-актину *in vivo* [246].

### **1.3. Особливості організації актинових філаментів в ході клітинного циклу та різних типах рослинних клітин**

Інтерфаза. Актинові філаменти відіграють важливу роль в багатьох клітинних процесах, включаючи клітинний цикл у рослин [163, 257, 211].

Під час інтерфази мікрофіламенти розміщуються в кортексі, у вигляді тонкої сітки з хаотично орієнтованих структур, відомих як кортикальні актинові філаменти, що локалізуються біля мембрани. Також мікрофіламенти можна спостерігати в цитоплазмі у вигляді великих пучків, розміщених глибоко в цитоплазмі поблизу ядра, де вони утворюють спеціальні структури у формі «кошиків» [40, 148], що беруть участь в пре- та постмітотичному русі ядра [114, 82].

Встановлено, що в рослинній клітині протягом G2-фази і до початку ранньої М-фази, кортикальні мікрофіламенти вибудовуються з мікротрубочками в препрофазну стрічку, яка необхідна для визначення точного розташування площини поділу [157, 66]. В ендоспермі та клітинних стінках вакуолізованих клітинах, що зазнають мітозу, «кошик» актину, асоційований з веретеном, може слугувати якорем і контролювати боковий рух веретена [88, 113, 134].

Мітоз. Коли клітина входить в мітоз, ядро переміщується в центр клітини, де знаходяться довгі тяжі актину, що радіально відходять від ядра до периферії клітини і утворюють щільну кортикальну сітку [139, 211]. В препрофазі маса цієї інтерфазної щільної кортикальної сітки дещо зменшується, але помічено, що сукупність актинових філаментів була локалізована в місці майбутньої екваторіальної препрофазної стрічки. На цьому етапі відмічається велика кількість F-актинових пучків навколо ядра і везикул, розміщених у центрі клітини [139, 257].

На початку метафази число мікрофіламентів в кортексі знижується, але вони сконцентровуються посередині клітинної площини, утворюючи мітотичну веретеноподібну структуру. Хромосоми в цей час розміщуються на екваторіальному рівні, а пучки F-актину утворюють веретено в центрі клітини. В середині метафази актинові філаменти знаходяться на периферії і в серединній площині веретена, внаслідок чого відбувається його скорочення [257].

В анафазі, після розходження двох наборів дочірніх хромосом, в середній площині клітини виявлено два шари актинових філаментів між дочірніми хромосомами. В пізній анафазі, під час формування фрагмопласту, мікрофіламенти являють собою два антипаралельні масиви по обидва боки від площини поділу, з загостреними кінцями в центральній ділянці [108]. Дослідження з використанням речовин, що провокують деполімеризацію F-актину, таких як цитохалазин В або D, показали, що актинові філаменти відіграють значну роль в орієнтації розміщення первинної клітинної стінки [41, 212].

Під час телофази в кортексі мікрофіламенти переважно зникають, і фрагмопласт переміщується до клітинної пластинки і відбувається формування перинуклеарних (перихромосомних) каркасів F-актину. Встановлено, що актинові філаменти є основним структурним компонентом цитокінетичного апарату, і подальші дослідження показали, що вони відіграють вирішальну роль в належному протіканні процесу цитокінезу [235, 160, 255].

Клітини з апікальним типом росту. У вищих рослин існує два типи клітин, які не ростуть дифузно: клітини пилкових трубок і корневих волосків. Цим клітинам притаманна особливість утворювати певні побудови з мікрофіламентів на периферії клітини, до яких вибірково залучають везикули екзоцитозу для їх росту. Мікротрубочки в клітинах із верхівковим типом росту орієнтовані так само, як і актинові філаменти у цитоплазмі, у формі масивів, розташованих вздовж основної осі клітини [138, 80].

Доведено, що пилкові трубки відіграють важливу роль в статевому розмноженні вищих рослин шляхом перенесення чоловічої частини зародка в яйцеклітину, де і відбувається запліднення [72]. В пилковій трубці мікрофіламенти організовані в пучки, які паралельно або злегка спірально скручені відносно осі трубки. Ці пучки забезпечують шлях для цитоплазматичного потоку, який здійснює доставку везикул від комплексу Гольджі, необхідних для екзоцитозу в зоні росту. Очевидно, що

полімеризація і деполімеризація актинових філаментів має чітко регулюватися згідно швидкості росту пилкових трубок [155, 80, 75].

При створенні перших моделей клітин з верхівковим типом росту вважалося, що густа сітка актинових філаментів в цих клітинах підтримує їх куполоподібну форму, незважаючи на відсутність целюлози у клітинних стінках. Згідно цих припущень, зросли спроби використання родамін-фалоїдинової візуалізації густих сіток F-актину у верхівкових клітинах пилкових трубок, як в умовах *in vivo* та *in vitro* [216, 75]. Однак, подальші дослідження клітин із верхівковим типом росту за допомогою застосування методики заморожування-заміщення під впливом високого тиску та електронної мікроскопії вказали на протилежне, що верхівкові клітини пилкових трубок позбавлені F-актину [155]. Відсутність щільної сітки F-актину у даних клітинах остаточно було підтверджено за допомогою візуалізації локалізації GFP-таліну з актином [126].

За допомогою використання лазерного скануючого мікроскопу, групою дослідників було візуалізовано в кортексі та в ендоплазмі верхівки пилкової трубки хаотично розташовані тоненькі актинові філаменти [72, 75]. Отже, мікрофіламенти у вигляді коротких пучків F-актину або щільних сіток тонких актинових філаментів є важливим компонентом в клітинах з верхівковим типом росту, проте, їхня функція досі залишається до кінця не з'ясована.

## **1.4. Джерела гетерогенності популяцій актинових філаментів**

### **1.4.1. Ізотипи рослинних актинів**

В процесі аналізу нуклеотидних послідовностей генів, що кодують актин було встановлено, що варіабельність і різноманітність актину рослин значно вища, ніж варіабельність актину тварин та інших організмів [19]. Так, наприклад, актин *A. thaliana* кодується 10 генами. Детектовано вісім ізотипів

актину у *A. thaliana* [149] та п'ять у *Vicia faba* [102]. У порівнянні, лише дві немязові ізоформи ( $\beta$  і  $\gamma$ ) виділенні у хребетних тварин [107]. Багато ізотипів актину спільні для певних органів рослин, встановлено, що деякі специфічні і для коренів. Використання конструції з GUS дозволило виявити в кореневому чохлаку і кореневій меристемі *A. thaliana* два гени, що кодують актин – *ACT1* і *ACT2* [4]. З'ясовано, що в коренях рису існує чотири ізотипи актину: *Rac1*, *Rac2*, *Rac3* і *Rac7*. Кількість мРНК двох ізотипів *Rac2* і *Rac3* під час транскрипції становить близько 80%, тоді як кількість мРНК для ізотипу *Rac7* залишається постійною. На сьогодні залишається нез'ясованою локалізація відповідних білків в різних типах клітин коренів [150].

В коренях квасолі (*Phaseolus vulgaris* L.) було знайдено два основні ізотипи актину, але лише один з них був присутній на коренях у бульбочках, індукованих симбіозом з бактеріями роду *Rhizobium*. Походження цього ізотипу залишається не з'ясованим [180]. Відомо, що протягом розвитку *Bradyrhizobium*– індукованих бульбочок на коренях сої відбувається комплекс перебудов мікрофіламентів, що формують патерни у вигляді сотів. Існують припущення, що їх значення може бути пов'язане з розміщенням симбіосом в інфікованих клітинах. Припускається, що вони можуть брати участь в доставці везикул для створення додаткових мембранних структур [250].

В цілому, актини рослин відрізняються від актину тварин 55-65 амінокислотними залишками. В актинах рослин заміни торкаються значного числа заряджених залишків, тому їх ізоелектричні точки можуть розрізнятися майже на одиницю (рН 5,1 - 5,8) [197].

#### **1.4.2. Посттрансляційні модифікації актину тварин та рослин**

Цитоскелетні білки проходять широкий спектр посттрансляційних модифікацій, які разом з диференційною експресією структурних генів цитоскелету та динамічною нестабільністю мікротрубочок дозволяє

рослинам ставати більш пристосованими до постійно мінливих умов середовища [248]. Наприклад, різноманітність мікротрубочок може бути сформована шляхом експресії шести  $\alpha$ - і дев'яти  $\beta$ -тубулінових ізотопів та широкого спектру посттрансляційних модифікацій [86, 30]. Субдиниці  $\alpha$ -тубуліну рослин проходять зворотне тирозилування [210] і ніротирозилування як її модифікацію [106], фосфорилування серину/треоніну і залишків тирозину [26], ацетилування [210], а також поліглютамінування [30], в той час як субдиниці  $\beta$ -тубуліну піддаються фосфорилуванню і поліглютамінуванню [210, 26].

У порівнянні з тубуліном посттрансляційні модифікації актину рослин добре не вивчені. В еукаріотичних клітинах актин існує як нитчастий полімерний F-актин та глобулярний мономерний G-актин і діє як інтегрована динамічна сітка, яка швидко реорганізується у відповідь на різні стимули [216]. Перебудови актинових філаментів контролюються не прямо, за допомогою фітогормонів,  $\text{Ca}^{2+}$ , фосфоінозитольного шляху і безпосередньо за допомогою посттрансляційних модифікацій таких, як фосфорилування та метилування [109, 51]. Серед нещодавно відкритих модифікацій рослинного актину потрібно згадати моноубіквітинування (52) та трансглютамінування [54]. Рослинний актин разом з актин-деполімеризуючим фактором був ідентифікований як мішень для S-нітросилування у *A. thaliana* [137].

До сьогодні дані про нітрування актином тирозину доступні тільки в клітинах ссавців, що дозволяє припустити, що нітрування тирозину як F-, так і G-актину змінює його полімеризацію з подальшим порушенням функції клітин. Показано, що надвиробництво RNS викликає індукцію NO синтази та подальше нітрування F-актину з наступним розбиранням та втратою захисної функції [18]. Актин може бути потенційною мішенню для пероксинітрит-опосередкованого нітрування полімеризації G-актину та деполімеризації F-actin *in vitro*, що призводить до гальмування клітинної міграції та фагоцитозу [42]. Оскільки актин збагачується залишками тирозину, життєво важливими для його полімеризації, нітрування значних залишків тирозину викликає



стабілізацію ядер актину та утворення ниток, що приводить до скорочення дисфункції кардіоміоцитів [166]. Крім того, нітрування тирозину F-актину в позиціях 91, 198 та 240 погіршує процес полімеризації F-актину в серповидних клітинах, що призводить до рухливості еритроцитів та порушення транспортної функції. Ті ж автори показали, що нітрування актином тирозину *in vitro* та *in vivo* є критичним у багатьох патологічних станах, таких як серповидна хвороба, хронічне обструктивне захворювання легенів, хвороба Чагаса, діабетична кардіоміопатія та деякі інші захворювання [8]. У міогенних клітинах вплив нітротирозину перешкоджає синтезу або активації маркерів міогенної диференціації, включаючи м'язово-специфічний міозин,  $\alpha$ -актин, інтегрин-7 і міогенін [36]. Виявлено, що актин та актин-зв'язуючий білок A2 в епітеліальних аденокарциномічних клітинах нітрується тирозином [10].

Таким чином посттрансляційні модифікації актину в еукаріотичній клітині регулюють її різноманітні функції за рахунок змін в організації сітки мікрофіламентів та/або взаємодії із іншими білками або структурами. Вивчення ролі посттрансляційних модифікацій актину залишається досить актуальним та потребує подальшого дослідження.

## РОЗДІЛ 2

### КЛІТИННІ МЕХАНІЗМИ ВІДПОВІДІ РОСЛИН НА ХОЛОДОВИЙ СТРЕС

#### 2.1. Фізіологічні аспекти впливу холоду на рослину

Одним з ключових несприятливих факторів навколишнього середовища є температура. Температура контролює активність багатьох процесів, що відбуваються в рослині (фотосинтез, дихання, ріст, водний обмін і ін.), і вони змушені постійно пристосовуватись до її коливань [133]. Відносно погодніх умов рослини поділяють на морозостійкі та неморозостійкі. Неморозостійкі сильно пошкоджуються або гинуть при температурах, вищих за точку замерзання води. Загибель пов'язана з інактивацією ферментів, порушенням обміну нуклеїнових кислот і білків, руйнуванням мембран і припиненням дії асиміляторів.

Кожна рослина має оптимальну температуру для її нормального росту і розвитку. Конкретні температурні умови, які є оптимальними для однієї рослини, можуть бути стресовим для іншої. В основному було помічено, що у рослин, які живуть в місцях з теплим кліматом, проявляються симптоми пошкодження при дії низьких температурах [141, 71]. Наприклад, у таких рослин, як кукурудза, соя, бавовна, томат і банан проявляються перші ознаки пошкодження вже при впливі температур нижче 10-15°C [141, 85, 92]. Проте прояви симптомів пошкодження залежать від чутливості рослин до холодного стресу і варіюють від рослини до рослини. Зміни, індуковані холодом у рослин, можуть з'явитися вже через 48-72 год після впливу стресу. У рослин, які піддаються холодному стресу, проявляються різні фенотипові симптоми, що включають: зниження росту, вкорочення листкової пластинки [214, 194], в'янення, зниження кущіння [12], пожовтіння листя [256]. Холод також може привести до загибелі тканин – некрозу [105, 193]. Холодовий стрес також сильно впливає на репродуктивний розвиток рослин, що

характеризується поганою схожістю насіння, погіршенням розвитку стручків у чутливих видів і може привести до стерильності пилку, що є одним з ключових факторів, відповідальних за зниження врожаю сільськогосподарських культур [112, 223, 168, 129].

Низькі температури викликають пошкодження плазматичної мембрани, побудованої з білків і насичених та ненасичених жирних кислот. Ненасичені жирні кислоти мають один або декілька подвійних зв'язків між двома атомами вуглецю, а насичені жирні кислоти (присутні у більшій кількості) повністю збагачені воднем і при високих температурах швидко твердіють, що призводить до зневоднення плазматичної мембрани і перехід мембрани від напівпроникного до напівкристалічного стану [218]. Утворення льоду в апопласті створює градієнт тиску між апопластом і оточуючими клітинами. В результаті цього вода мігрує в апопластичний простір і призводить до механічного навантаження клітинної стінки і плазматичної мембрани, що може призвести до розриву клітин [169].

Холодовий стрес також викликає зміни в складі бішару ліпідів, що впливає на їх плинність [249] і включає в себе синтез і накопичення розчинних речовин, синтез індукованих холодом білків [2008], зміни вуглеводного метаболізму [73, 111], підвищення вільного радикального потенціалу в клітинах [11], перерозподіл внутрішньоклітинних іонів  $\text{Ca}^{2+}$  [120], ультраструктурні зміни в широкому діапазоні клітинних компонентів, в тому числі пластид, тилакоїдів мембран і процесів фосфорилування [260, 227]. Побічні ефекти стресу можуть бути пом'якшені шляхом створення культурних рослин з поліпшеною термотолерантністю. З цією метою обов'язковим є глибоке розуміння фізіологічних реакцій рослин до екстремальних температур, механізмів термотолерантності і можливих стратегій щодо її поліпшення.

## 2.2. Відповідь рослинних клітин на дію екстремальних температур

### 2.2.1. Молекулярно-генетичні механізми впливу холоду на рослинні клітини

Для подолання температурного стресу рослини можуть запускати каскад реакцій, що викликають зміни в експресії генів і, таким чином, викликати біохімічні та фізіологічні зміни для підвищення стійкості рослин [266, 153]. Виявлено, що під час холодowego стресу в клітинах люцерни (*Medicago sativa*) активується експресія індукованих холодом генів, таких як *cas30* і *BN115*. Індукція гену *cas30* і приплив іонів  $\text{Ca}^{2+}$  при холодovому стресі (+4°C) запобігають руйнуванню клітинної мембрани і, навпаки, при дії температури +25°C відбувається порушення плинності мембранах структур [173]. Експресія гена *cas30* індукується лише впливом низької температури, а не іншими абіотичними стресами. Холодова ж активація гена *BN115* супроводжується реорганізацією цитоскелетних структур, припливом іонів  $\text{Ca}^{2+}$  і дією декількох типів протеїнкіназ [199]. Блокування притоку позаклітинного  $\text{Ca}^{2+}$  запобігає експресії індукованих холодом генів і розвитку холодостійкості у *M. sativa* [161] і в *A. thaliana* [225]. HOS15, один з 237 білків в *A. thaliana*, що функціонує як репресор, який модифікує хроматин і таким чином, контролює експресію генів, що беруть участь в холодovій толерантності [265].

Акліматизація при низькотемпературному стресі характеризується глибокими змінами в експресії генів, що призводить до ряду змін в складі транскрипту рослин. Так, наприклад, транскрипційний аналіз *A. thaliana* показав, що 20% із 8000 генів були порушені після впливу температури +13°C, зокрема, ті, що беруть участь в біосинтезі білка [189, 39]. Протеомний аналіз озимої пшениці (*Triticum aestivum*) в відповідній реакції на температурний стрес, показав істотне зниження синтезу декількох білків, таких як NADH-дегідрогеназа і дегідроаскорбатредуктаза [104]. Результати

протеомного аналіз моху (*Physcomitrella patens*) при холодоровому стресі виявили посиленій синтез актину [244]. Білки холодорового шоку відіграють важливу роль в розвитку і стресовій адаптації в різних організмів, починаючи від бактерій до ссавців [34]. Недавно, було показано, що білок холодорового шоку *Arabidopsis* 3 (AtCSP3) бере участь в процесах морозостійкості у рослин [116].

### **2.2.2. Роль вторинних посередників в рослинній клітині під час холодорового стресу**

Рослинні гормони (фітогормони) і стимули навколишнього середовища за посередництвом внутрішньоклітинних сигнальних молекул, таких як вторинні посередники ( $\text{Ca}^{2+}$ , цАМФ, цГМФ, інозитолтрифосфат, ROS, NO, CO і т.д.) координують зміни розвитку і забезпечують пластичність рослин. Перелік «класичних» фітогормонів різноманітної хімічної природи, а саме ауксини, цитокініни, гібереліни, етилен і абсцизова кислота був недавно доповнений нововиявленими гормонами, що включають брасиностероїди, жасминову кислоту, саліцилову кислоту, і пептидний гормон системіну [206, 237]. Фітогормони допомагають регулювати безперервну адаптацію до зовнішніх стимулів. Наприклад, між ауксинами і NO, ROS і абсцизовою кислотою, гіберелінами і брасиностероїдами [176]. Фітогормони присутні на всіх стадіях розвитку рослинного онтогенезу від подвійного запліднення до природного старіння, а також забезпечують реакцію рослин до екологічних стресів (біотичних і абіотичних), будучи критичними посередниками в захисті рослини [146].

Низька температура впливає на певні аспекти адаптації рослин, наприклад, морозостійкість, ріст рослин, абіотичну стійкість і старіння. Серед фітогормонів, абсцизова кислота, ауксин, гіберелін, саліцилова кислота і етилен пов'язані з холодоровою відповіддю позитивно або негативно. Абсцизова кислота служить сигналом, який відіграє певну роль в трансдукції

холодових сигналів через вторинні посередники, такі як  $H_2O_2$  і  $Ca^{2+}$ . Абсцизова кислота може індукувати експресію генів *CBF1*, *CBF2* і *CBF3*, які відповідають за низький рівень абсцизової кислоти при холодovому стресі [121, 171]. Крім того, рівень абсцизової кислоти підвищується у відповідь на низькі температури, хоча це не пов'язано з яровизацією, оскільки екзогенна абсцизова кислота не здатна індукувати експресію маркерного гена *vin3*, що відповідає за яровизацію, але індукує експресію іншого гена регульованого холодом – *adh1*[158].

У випадку з *A. thaliana*, холодова обробка активує ген *ga 2*-оксидази, який кодує гіберелін-каталітичний фермент та інактивує ген *ga 20*-оксидази, що кодує гіберелін-біосинтезуючий фермент. При роботі в холодних або прохолодних умовах рівні ендогенних гібереліна і ауксина знижуються, що призводить до карликового росту сорту пшениці Rht3. Вільна ендогенна саліцилова кислота і глюкозильна саліцилова кислота накопичуються під час охолодження в пагонах *A. thaliana*, пшениці і винограду, в той час як середні концентрації екзогенного впливу саліцилової кислоти підвищують холодостійкість у корені таких рослин, як рис, кукурудза, пшениця, картопля і т.д. Кілька мутантів *A. thaliana*, такі як *cpr1* (*constitutive expresser of pathogenesis-related gene1*) і *acd6* (*accelerated cell death6*), в яких надмірно накопичується саліцилова кислота, мають карликовий фенотип і чутливість до заморожування [158].

Гормональні зміни, що супроводжуються холодovим стресом (+4°C) в листі та колосі озимої і ярої пшениці, характеризувалися фазою тривоги (1-й день) з високим вмістом абсцизової кислоти і збільшенням захисних білків (дегідринів WCS120), що збігається зі зниженням цитокінінів і ауксинів, а також підвищеною дезактивацією гіберелінів і швидким підвищенням регуляції попередника етилену аміноциклопропанкарбонової кислоти [125]. Після впливу холоду через 3-7 днів адаптація рослин до низької температури корелювала зі зниженням рівня абсцизової кислоти, посиленням стимуляції росту (цитокінінів, ауксину і гібереліну) та захисних гормонів (жасминової і

саліцилової кислоти) [125]. Такі поліаміни, як путресцин і спермідин, необхідні для холодової акліматизації та виживання при мінусових температурах [79]. Поліаміни також відіграють велику роль у полегшенні окисного стресу: інгібування синтезу поліамінів призводить до збільшення окисного пошкодження у рослин, оброблених холодом [83]. Ряд генів, залучених до біосинтезу або сигналізації рослинних гормонів, таких як гібереллінова кислота і ауксин, можуть також регулюватись холодним стресом. Нещодавно було описано роль цитокінінів в опосередкуванні темпів росту рослин. У мутантів з підвищеними рівнями цитокінінів (*amp1*) відзначається підвищене ділення клітин при дії температури +4°C [227].

### 2.2.3. Ca<sup>2+</sup> як вторинний посередник

Іони Ca<sup>2+</sup> виконують функцію універсального вторинного посередника в клітинах різних організмів і необхідні на всіх етапах онтогенезу рослин. Кальцій контролює такі процеси, як ріст і диференціація, фото-, морфогенез і ембріогенез, реакції сумісності, граві- і фототропізм, циклоз, рух продихових клітин, полярний ріст клітин, процеси збирання і розбирання компонентів цитоскелету та ін. Ca<sup>2+</sup> бере участь в адаптації до різних стресових впливів, в тому числі і до низьких температур, і являється основним елементом в трансдукції гормональних сигналів [198]. Порушення плазматичної мембрани, індуковане холодом, може викликати реорганізацію актинових філаментів. Це може супроводжуватися активацією кальцієвих каналів і підвищенням рівня цитозольного Ca<sup>2+</sup>, які можуть бути залучені в процеси холодової акліматизації [199].

В трансдукції сигналів і функціонуванні цитоскелетних систем вагому роль відіграє Ca<sup>2+</sup>-зв'язуючий білок – кальмодулін. Ca<sup>2+</sup>/кальмодулін може активно перешкоджати зв'язуванню мікротрубочок в тяжі, в результаті вони стають нестійкі і легко деполімеризуються. Ca<sup>2+</sup>-чутливі ділянки зв'язування кальмодуліну необхідні для захисту мікротрубочок від дестабілізуючої дії

кальмодуліну на  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних сайтах. Показано, що  $\text{Ca}^{2+}$ /кальмодулін інгібує зв'язування віліну – актин-зв'язуючого білка, що бере участь в нуклеації F-актину [61, 50].

### 2.3. Вплив низьких температур на цитоскелет рослинної клітини

Численні внутрішньоклітинні стимули і (а)біотичні фактори викликають не тільки порушення балансу фітогормонів, а також і динамічні перебудови цитоскелету [38]. Цитоскелет рослинної клітини – інтегрована високодинамічна сітка мікротрубочок та актинових філаментів, яка підтримується і модулюється великою кількістю допоміжних білків. Білки, асоційовані з мікротрубочками та мікрофіламенатами, впливають на стабілізацію, збирання/розбирання існуючих полімерів (третрідлінг), баланс між вільними мономерами і полімеризованими компонентами цитоскелету, на фрагментацію зрілих цитоскелетних елементів, а також на зв'язування мономерів з мембраною та органелами [203, 247].

Цитоскелет координує основні фізіологічні процеси, такі як поділ та ріст клітини, диференціація, внутрішньоклітинний і везикулярний транспорт, визначення форми клітини, зшивання мономерів і приєднання до мембрани і відіграє роль перемикача у відповідь на різні абіотичні і біотичні стреси [13, 119, 226]. Орієнтація мікротрубочок та актинових філаментів вздовж основної осі пагона/кореня (поперечна, коса, повздовжня, хаотична) і їх організація (у вигляді пучків, розріджена, стабілізуюча, фрагментаційна, деполімеризована) змінюється протягом клітинного поділу, елонгації та диференціації. Тканинний «статус росту», стадія розвитку і відповідь на стрес відображається в орієнтації мікротрубочок та актинових філаментів [62]. Фітогормони виступають як регуляторні сполуки в рослинній клітині і визначають (модулюють) орієнтацію/організацію мікротрубочок та мікрофіламентів, їх динамічні властивості, експресію генів, що кодують різні ізотипи тубуліну/актину і їх посттрансляційні модифікації [27].



В динамічних перебудовах актинових філаментів беруть участь MAP-кінази (мітоген-активуючі протеїнкінази). Дослідження рослинних MAP-кіназ показало, що високі температури активують HAM-кіназу через підвищення плинності мембран, а низькі – SAM-кіназу через підвищення рухливості (жорсткості) мембран. При цьому деполімеризація мікрофіламентів у відповідь на дію низьких температур являється сигналом, який запускає розвиток адаптаційних процесів. Після обробки проростків люцерни речовинами, що стабілізують мікротрубочки та актинові філаменти (жаспакінолід і таксол) відбувається блокування MAP-кіназ температурним стресом, тоді як інгібітори цитоскелету – латранкулін, цитохалазин Д і оризалін – активують SAMK і HAMK при дії температури +25°C. Зміни плинності мембран, розбірка цитоскелету і підвищення концентрації цитозольного Ca<sup>2+</sup> необхідні для активації MAP-кінази.

Мішенями для каскадів кіназ або Ca<sup>2+</sup>-залежних шляхів передачі сигналу являються актин-зв'язуючі і асоційовані з мікротрубочками білки (MAPs). На кінчику корневих волосків і пилкових трубок відбувається накопичення профіліну, ауксину і віліну. Структурні перебудови актинових фосфоліпідів впливають на активність ряду актин-зв'язуючих білків, викликаючи тим самим реорганізацію актинового цитоскелету [74].

Індукування актин-зв'язуючих білків підвищує стійкість мікротрубочок і може бути використане в якості діагностичного маркера морозостійкості в різних сортів озимої пшениці [115]. Холод так як і тепло викликають структурні зміни в плазматичній мембрані, яка транслює сигнал через цитоскелет, приплив Ca<sup>2+</sup> і мітоген-активовані протеїнкінази, що призводить до активації різних MAPK-каскадів [200].

Акліматизація до низьких температур (загартовування) і обробка абсцизовою кислотою надають більш високу стабільність білкам цитоскелету [170]. Холодова акліматизація різних сортів озимої пшениці, що різняться по морозостійкості, призводить до збирання мікротрубочок, збільшення флуоресценції і стабілізації мікротрубочок та актинових філаментів

переважно в зоні диференціації кореня, тоді як абсцизова кислота індукує подібні зміни в меристемі та зоні розтягу [170]. Вважається, що деполімеризація мікротрубочок, зниження сукупності нестабільних мікротрубочок і збільшення обсягу стабільних є результатом уповільнення росту рослин, оброблених абсцизовою кислотою або рослин на ранніх етапах їх холодової акліматизації. Після акліматизації активується ріст рослин, що очевидно визначається збільшенням кількості динамічних/нестійких мікротрубочок і посиленням деполімеризації мікрофіламентів [229].

Актинові філаменти широко залучені у відповідь рослинної клітини на дію абіотичних факторів, так як вони мають важливе значення для транслокації хлоропластів в умовах високої освітленості [220], модуляції руху амілопластів і гравітропічної передачі сигналу [177], контролю обсягу протопластів протягом плазмолітичного циклу [123], регулювання постійного об'єму клітин і активності іонних каналів у плазматичній мембрані [98], селективної відповіді рослин на електричні поля [22] і запуску запрограмованої клітинної загибелі [29]. Актинові філаменти реорганізуються під впливом холоду, тепла, посухи, засолення, алкалоїдів [15, 242] та інших абіотичних чинників.

З літературних даних відомо, що через короткі інтервали часу після обробки рослини холодом відбувається деполімеризацію цитоскелетних структур, наприклад, у клітинах ріпаку (*Brassica napus*) та люцерни (*Alfalfa*) [173, 199]. Показано, що в цитоплазмі пилкових трубок *N. tabacum* мікрофіламенти залишались непошкодженими після впливу температури +4°C, в той час як мікротрубочки при таких умовах майже повністю руйнувались [9]. Зміни організації актинових філаментів під впливом холоду спостерігаються в пилку груші (*Pyrus pyrifolia*), що супроводжувались вивільненням цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  і активацією  $\text{K}^+$ -каналів [252]. В клітинах суспензійної культури ріпаку під впливом холоду сітка мікрофіламентів розріджувалася, змінювала свою організацію та деполімеризувалася [65]. Показано, що навіть короткочасна експозиція культури клітин *N. tabacum*

ВУ-2 холодом (0°C, 5 хв) призводила до зникнення радіальних актинових філаментів, а більш тривала (20 хв) – до формування невпорядкованої розрідженої сітки мікрофіламентів. Через більш тривалий проміжок часу (12 год) спостерігались лише яскраві короткі пучки або окремі скупчення F-актину навколо ядра і по периферії клітини [184].

Організація актинових філаментів залежить від балансу між G- і F-актином, а також актин-зв'язуючих білків. Профілін і актин-деполімеризуючий фактор є двома з найбільш високо і широко експресуючих типів [69]. Індукція активації актин-деполімеризуючого фактору під час акліматизації до холоду призводить до підвищеної толерантності до заморозків у пшениці [175]. Ці дані свідчать про те, що актин-деполімеризуючий фактор необхідний для переорієнтації цитоскелетних структур, яка спостерігається під час низькотемпературної експозиції. Таке ремоделювання може бути важливим фактором для посилення толерантності до низьких температур.

Побічні ефекти впливу холодового стресу можуть бути пом'якшені шляхом розвитку культурних рослин з поліпшеною термотолерантністю, використовуючи різні генетичні підходи. Обов'язковим є глибоке розуміння фізіологічних та клітинно-біологічних реакцій рослин до низьких температур, механізмів термотолерантності і можливих стратегій щодо її поліпшення.

## РОЗДІЛ 3

### ЗАЛУЧЕННЯ ОКСИДУ АЗОТУ У ВІДПОВІДІ НА СТРЕС У РОСЛИН

#### 3.1. Функціональна роль NO у рослин

Оксид азоту (NO) – біологічноактивна сигнальна молекула, що виконує роль універсального вторинного посередника в клітинах еукаріот. Дана молекула вперше була описана у ссавців, де вона бере участь у таких фізіологічних процесах, як розслаблення гладких м'язів, нервові зв'язки, імунна регуляція, апоптоз і т.д. [118, 202, 217]. Вважається, що NO також відіграє важливу роль в різноманітних фізіологічних процесах у рослин, наприклад, індукції проростання насіння і зниженні спокою насіння [21], регулюванні метаболізму рослин і їх старінні [135], індукції клітинної загибелі [178], регулюванні руху продихів [76], регулюванні фотосинтезу. NO також сприяє адаптаційній пластичності при зараженні патогенами, забезпечуючи реакцію гіперчутливості, підвищує стійкість до абіотичних стресів, надаючи антиоксидативну дію [91, 164].

Виявлено, що NO бере участь в регуляції поділу клітин із наступною диференціацією мезофільних протопластів *M. truncatula* за наявності ауксинів, але присутність NO є необхідним фактором лише для індукції клітинного циклу, а не для його подальшого проходження. Встановлено, що NO бере участь в диференціації ксилеми *Zinnia elegans*, регулюючи лігніфікацію клітин та їх запрограмовану загибель [6]. Крім того, інгібітори трансдукції сигналу від NO через цГМФ в клітинах здатні впливати на формування аеренхіми в корені *Z. mays*. Виявлено, що NO, Ca<sup>2+</sup> і цГМФ опосередковують підтримку полярності клітин папороті *Ceratopteris richardii* [197].

Відмічено стимулюючу дію NO на ріст всієї рослини, а також її окремих частин: первинного кореня, гіпокотилія, мезокотилія, додаткових і

бокових коренів. В присутності низьких концентрацій донора NO нітропрусиду натрію було відмічено прискорення росту первинного кореня *A. thaliana*, а при його більш високих концентраціях – затримку росту [253]. Було показано, що NO регулює напрямок росту пилкової трубки, що важливо для здійснення запліднення. Встановлено, що взаємодія NO, який виробляється пилком, і активних форм кисню, що синтезуються рильцем, можуть ініціювати опилення шляхом запуску сигнальних каскадів між клітинами пилкового насіння і рильцями.

Показано стимулюючу дію на дозрівання і проростання зерен *A. thaliana*, *L. sativa* та *P. virgatum* під дією NO на світлі і в темряві. Екзогенні донори NO вважаються сильними агентами для виведення рослин із стану спокою, оскільки при обробці насіння *A. thaliana* екотипів C24 і Co1-1 і *Hordeum vulgare* нітропрусидом натрію в мікромольних концентраціях порушується період їх спокою [228]. Існує декілька пояснень такого ефекту NO: вплив на синтез або метаболізм абсцизової кислоти, що пригнічує дозрівання зерен і перешкоджає їх проростанню, або ж стимуляція біосинтезу етилену.

Встановлено, що недостатнє утворення NO призводить до старіння рослин із наступним продукуванням етилену[6]. Так, в старіючих листках *Pisum sativum* відмічено вивільнення NO одночасно з етиленом, який є його антагоністом [96]. Посилене формування етилену при дозріванні *Fragaria ananassa* і *Persea americana* збігається з послабленням емісії NO. Оксид азоту може прискорювати старіння листя *Oryza sativa* або ж, навпаки, викликати затримку старіння листя, індукованого перекисом водню (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [96].

Відомо що ендогенний NO продукується мітохондріальною синтазою NO *A. thaliana*, проявляє антиоксидативну дію і попереджує зміни, пов'язані із старінням [6]. Внесення нітропрусиду натрію впливає на збереження фотосинтетичних пігментів в сім'ядолях *G. max* [48]. Показано, що NO може не тільки ініціювати [55, 132], але й затримувати запрограмовану клітинну загибель [53].

### 3.2. Протекторні властивості NO при впливі на рослини біотичних та абіотичних стресових факторів

Отримані багаточисельні експериментальні докази того, що NO задіяний у регуляції головних і додаткових процесів життєдіяльності клітин рослин як за нормальних умов, так і при дії біотичних та абіотичних стресових факторів, забезпечуючи їх пластичність і адаптацію до (а)біотичних факторів навколишнього середовища.

NO є сигнальною молекулою при біотичних стресах, тобто при внесенні вірусів та патогенів, бактеріальної або ж еукаріотичної природи [6]. Одним із ключових механізмів захисту рослин від патогенів є реакція гіперчутливості, що реалізується у вигляді запрограмованої загибелі клітини в місці інфекції і регулюється співвідношенням активних форм кисню та активних форм азоту [56]. NO також взаємодіє з ключовими ферментами раннього захисту, зокрема, каталазою і аскорбатпероксидазою, поступово підвищуючи рівень  $H_2O_2$  в клітині.

Показано, що рослини *H. annuum* більш сприятливі до дії патогена *Plasmopara halstedii*, що вирізняються підвищеним вмістом S-нітрозотіолів і особливо 3-нітротирозилуванням білків, що є біологічним маркером NO-стресу в рослин, індукованого біотичними факторами [91, 35]. В досліді з інфікуванням *Pennisetum glaucum* показано, що обробка донорами NO призводила до розвитку реакції гіперчутливості, відкладення лігніну та експресії фенілаланінамонійлігази [35].

Локальна реакція гіперчутливості у рослин у більшості випадків буває асоційована із системною набутою стійкістю тканин, віддалених від місця пошкодження. Встановлено, що NO посилює активність синтази NO у рослин *N. tabacum*, стійких до вірусу тютюнової мозаїки, за рахунок експресії генів захисного білку PR-1, а також генів фенілаланінамонійлігази і халконсинтази. Показано, що у *N. tabacum* експресія згаданих захисних генів запускається за допомогою цГМФ і цАДФ-рибози [63].

Гриби роду *Pythium*, *Botrytis* і *Fusarium* можуть продукувати NO в якості одного з факторів вірулентності. Експресія генів, що кодують білки, детоксифікуючі NO, наприклад, *N. tabacum* NOD і NorR, є додатковим фактором вірулентності фітопатогенів бактеріального походження [156]. Прикладами цього є аргіназа *Xylella fastidiosa* і гомолог синтази NO *Streptomyces turgidiscabies*, який забезпечує нітрування дипептиду фітотоксина, що необхідно для появи вірулентності цього патогена [156]. Наведені дані свідчать про те, що у рослин NO є ключовим вторинним посередником в реалізації реакції гіперчутливості та набутої системної стійкості.

Абіотичні стреси порушують клітинний редокс-гомеостаз, що призводить до окислювального стресу [7]. При окислювальному стресі активні форми кисню в різних місцях клітин рослин (мітохондрії, хлоропласти, пероксисоми і ядра) призводить до травм і загибелі клітин [144]. При наявності в невеликих кількостях активні форми кисню виступають як сигнал для активації захисних реакцій. Проте більш високі концентрації активних форм кисню можуть привести до серйозних травм. Вважається, що NO бере участь у перенесенні електронів в мітохондрії, де він виступає посередником модуляції активних форм кисню, а також в підвищенні антиоксидантної системи захисту у рослин в умовах абіотичного стресу [267].

NO здатний регулювати відповідь рослин до різноманітних абіотичних стресів і усувати наслідки деяких з них. Літературні дані показують, що відповідь рослин до таких стресових факторів, як посуха, висока або низька температура, солоність, важкі метали і окислювальний стрес, регулюється NO [231, 264].

Одним з перших абіотичних стресових факторів, який привернув увагу дослідників, було **механічне пошкодження**. Виявилось, що при пораненні рослини відбувається посилене утворення  $H_2O_2$  і NO. Показано, що NO діє як негативний модулятор відповіді на механічне пошкодження *S. lycopersicum*,

послаблюючи синтез інгібітора протеїназ I та  $H_2O_2$ , індукований системіном, олігоуронідами і жасмонової кислотою [23]. У суспензійній культурі *Taxus cuspidata* рівень вільного 3-нітротирозину зростає протягом декількох годин після обрізання листя і стебла рослин, що могло призвести до нітротирозилування глутатіон-S-трансферази, послабивши, тим самим, її активність [37]. Відзначено також зростання концентрації NO в епідемальних клітинах листя тису при моделюванні умов механічного стресу в спеціальній камері [37].

**Засуха** являється одним з найбільш важливих абіотичних чинників, що обмежують ріст, розвиток та врожайність рослин. Arasimowicz-Jelonek з співавт. (2009) повідомили, що в коренях огірків, які піддаються м'якому (від 5 до 10 год) дефіциту води не відбувається великого посилення внутрішньоклітинного синтезу NO в клітинах кінчика кореня і в зоні розтягу в порівнянні з гострим дефіцитом води (17 год), що призводить до інтенсивного продукування NO в коренях. Застосування донора SNP підвищує стійкість рослин до посухи за рахунок зниження водного дефіциту, витоку іонів і інтенсивності транспірації [131]. Показано стимулюючу дію NO на закривання продихів у листі пшениці під час засухи, що супроводжується зниженням рівня транспірації і підвищенням стійкості рослин [2001]. Процес замикання продихів в клітинах мезофілу кукурудзи, індукований гіперіндукцією абсцизової кислоти при засоленні і водному дефіциті, регулюється сигнальними каскадами, в яких беруть участь  $H_2O_2$  і NO [164].

Високі концентрації **солей** викликають підвищення осмотичного тиску та іоної напруги у рослин. Це обмежує їх ріст, розвиток і пов'язано з деякими ключовими метаболічними процесами [87]. Велика частина травм на клітинному рівні викликана сольовим стресом, що пов'язано з окислювальним пошкодженням через активні форми кисню. Екзогенні донори NO, істотно зменшують окислювальні пошкодження засоленості розсади рису [231], люпину [124] і огірків [67]. Обробка проростків *Z. mays*



нітропрусидом натрію посилює поглинання та транспорт  $K^+$ , послаблюючи одночасно поглинання і транспорт  $Na^+$ , ніж запобігає відтоку електролітів [261]. Участь NO в забезпеченні стійкості рослин до засолення може бути пояснена регуляцією експресії специфічних генів, зокрема, *Osnoa1*, гена синтази NO рису, експресія якого виявлена у мутанта *A. thaliana*, дефектного по синтазі NO (*Atnoa1*) [190].

Рослини виявляють підвищену чутливість до таких компонентів сонячного **випромінювання**, як УФ-А і УФ-В, що проявляється в порушенні продукції вторинних метаболітів, зміні активності фотосинтетичного апарату, формуванні захисних морфологічних структур, вразливості їх спадкового матеріалу та інших реакціях. Роль NO в реалізації відповіді рослин на опромінення УФ-А і УФ-В двояка. Після попередньої обробки бульб *S. tuberosum* і проростків *Z. mays* донорами NO спостерігали зменшення пошкоджуючої дії УФ-А і УФ-В, що супроводжувалось активацією синтезу NO в мітосомах і цитозолі, зниженням активності ендотексто- $\beta$ -глюканаз і зменшенням біомаси [3].

Толерантність рослин до **важких металів** являється адаптивною реакцією, в якій також може бути задіяний NO. Наприклад, показано посилене продукування ендогенного NO в коренях *P. sativum* і *Brassica juncea* в присутності кадмію, міді та цинку [84]. Протилежні результати були отримані на коренях і листках *P. sativum*, вирощеного в присутності  $Cd^{2+}$ . В цьому випадку мало місце істотне зниження вмісту ендогенного NO, а також інгібування росту, пов'язане з окислювальним стресом [20]. Попередня обробка листа *Helianthus annuus* нітропрусидом натрію запобігала токсичній дії  $Cd^{2+}$  внаслідок блокування розвитку окислювального стресу [84]. Подібні ефекти спостерігалися в коренів люпину, пророслого на середовищі, що містило в своєму складі  $Cd^{2+}$  і  $Pb^+$  [124]. Показано, що під впливом NO у *Chlamydomonas reinhardtii* відбувається посилений синтез проліну, і синергічна протидія токсичному впливу міді, що виявляється в запобіганні розвитку окислювального стресу [259].

Як і інші стреси, **тепловий стрес** є одним з основних обмежень що впливають на врожайність сільськогосподарських культур. Висока температура у рослин викликає окислювальний стрес, перекисне окислення ліпідів, пошкоджує мембрани, викликає деградацію білків, інактивацію ферментів і порушення ДНК [224]. Крім того, низькі температури (холодовий стрес) викликають багато змін в біохімічних і фізіологічних процесах у рослин. У багатьох дослідженнях, вчені намагалися з'ясувати роль NO в боротьбі з температурним стресом. Дія високої температури на клітини люцерни призводить до підвищення синтезу NO, в той час як застосування екзогенного NO посилює холодостійкість томата, пшениці і кукурудзи [165, 213]. NO може опосередковувати термотолерантність калюсів *P. communis*, індуковану абсцизовою кислотою [213]. Zhao з співавт. (2009) повідомляють, що холодова акліматизація викликана підвищенням синтезу ендogenous NO в дикого типу *Arabidopsis thaliana* і у листя мутанта *Atnoa1/rif1*, в той час як рівень ендogenous NO в *nialnia2* (NR-дефектний подвійний мутант) був нижче, ніж у дикого типу. Холодова акліматизація стимулює діяльність дефектного подвійного мутанта та індукує регуляцію генів *NIA1*. Фармакологічні дослідження з використанням інгібітора дефектного подвійного мутанта, NO перехоплювача і NO-донорів показало, що рівень NO позитивно корелює до впливу низьким температур.

Скавенджери NO ізопрен і розгалужений гемоглобін (trHb) покращують проростання насіння *A. thaliana* при високих температурах, усуваючи надлишкову кількість NO, що продукується при високотемпературному стресі [93]. Виявлено, що застосування екзогенного NO при тепловому шоці у *Phaseolus radiatus* сприяє збереженню параметрів флуоресценції хлорофілу *a*, цілісності мембран, вмісту H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> і активності антиоксидантних ферментів в порівнянні з такими без впливу стресового чинника [213].

Оскільки дослідження регуляторної ролі NO у рослин розпочато відносно недавно, для розуміння функціонального значення цієї молекули

необхідно встановити шляхи синтезу та детоксикації NO, клітинних і молекулярних механізмів сигналіngu NO, а також взаємодії з іншими сигнальними молекулами.

В цілому можна зробити висновок, що NO виконує важливі регуляторні функції не тільки при різних видах абіотичних та біотичних стресів, але і на різних стадій розвитку рослинного організму, а також при взаємодії рослин із симбіонтами. Відповідно, в онтогенезі рослин NO залучається у реакції відповіді на стресори різної природи, але найбільш важливо, що NO – безпрецедентний учасник реалізації фізіологічних програм і за відсутності стресів.

## РОЗДІЛ 4

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 4.1. Рослинний матеріал

Як рослинний матеріал в роботі використовували 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) з *A. thaliana*, злитий з геном *gfp* як з С-, так і з N-кінця ABD2) (Рис. 4.1). Насіння даної лінії було люб'язно надано проф. Ж.-П. Вербеленом (Університет Антверпену, Бельгія, м. Антверпен). Лінія є стабільно трансформованою [245] та є загальновизнаним об'єктом для дослідження змін просторової організації різних типів побудов актинових філаментів *in vivo* за допомогою лазерної скануючої конфокальної мікроскопії.



Рис. 4.1. Схематичне зображення конструкції GFP-ABD2-GFP [245]: подвійний 35S промотор вірусу мозаїки цвітної капусти; GFP – репортерний ген зеленого флюоресцентного білку; ATG і TAA – кодони; TL – ділянка, збагачена таліном; ABD2 – F-актин-зв'язуючий домен гена фімбрину (AtFim1); pA – термінатор.

#### 4.2. Характеристика використаних у роботі реактивів

В роботі використовували реактиви виробництва фірм:

1. «Хіммед» (Україна): калій азотнокислий ( $\text{KNO}_3$ ), калій фосфорнокислий однозаміщений ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), натрій молібденовокислий

( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ), борна кислота ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), марганець сірчаноокислий п'ятиводний ( $\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ), кобальт хлористий шестиводний ( $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ), кальцій хлорид двохводний ( $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ), кальцій хлорид ( $\text{CaCl}_2$ ), гідроксид натрію ( $\text{NaOH}$ ).

2. «Макрохім» (Україна): амоній азотноокислий ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), мідь сірчаноокисла п'ятиводна ( $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ).

3. «РОСН» (Польща): магній сірчаноокислий семиводний ( $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ), цинк сірчаноокислий семиводний ( $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ).

4. «Sigma» (США): нітропрусид натрію (натрію нітрософериціанід дегідрат, SNP), карбокси-2-феніл-4,4,5,5-тетраметилімідазолін-1-оксил-3-оксид (сРТІО).

5. «Симбіас» (Україна): калій йодистий (KI).

6. ООО «Реактив» (Україна): залізо сірчаноокисле семиводне ( $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ).

7. «Merck» (Німеччина): мікробіологічний агар, сахароза.

8. «ДнепрАзот» (Україна): гіпохлорит натрію ( $\text{NaOCl}$ ) (комерційний препарат «Білизна»).

9. ЗАТ «Фармацевтична фірма «Дарниця»» (Україна): спирт етиловий 96%.

### **4.3. Підготовка та обробка рослинного матеріалу**

#### **4.3.1. Умови вирощування проростків *A. thaliana* та режими їх обробки низькими температурами**

Для поверхневої стерилізації насіння *A. thaliana* витримували у 6%-ному (об/об) розчині гіпохлориту натрію ( $\text{NaOCl}$ ) протягом 6-10 хв з подальшим п'ятиразовим відмиванням стерильною дистильованою водою. Для проростання стерильне насіння переносили на тверде поживне середовище Мурасіге-Скуга (МС) [162] 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 із насінням залишали для проростання в вертикальному положенні протягом 4-х діб при постійній температурі +22°C і 16/8-годинному фотоперіоді. Для дослідження впливу низьких позитивних температур чашки Петрі із чотирьохденними проростками поміщали в холодильник на 24, 48 та 72 год при температурі +0,5°C та +4°C.

#### **4.3.2. Умови впливу модуляторів вмісту оксиду азоту на проростки *A. thaliana* та його комбінований вплив з холодним стресом**

Як модулятор вмісту оксиду азоту використовували екзогенний донор NO нітропрусид натрію (SNP) (Aldrich, США) та скавенджера NO карбокси-2-феніл-4,4,5,5-тетраметилімідазолін-1-оксил-3-оксид (сРТІО) (Sigma, США)), які розчиняли у дистильованій воді безпосередньо перед початком експерименту в концентрації 100 мкМ. Дана концентрація була підібрана в результаті аналізу попередніх досліджень присвячених вивченню впливу SNP та сРТІО на мікротрубочки в різних типах клітин кореня *A. thaliana* [128]. Для вивчення комбінованої дії модуляторів вмісту NO та низьких температур +0,5°C та +4°C проводили попередню обробку коренів 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*.

### **4.4. Методи досліджень**

#### **4.4.1. Вивчення впливу холоду на ріст коренів *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/>. Отримані дані (фактична довжина коренів, виражена у міліметрах) були представлені як середнє значення довжини коренів (мм)  $\pm$  стандартна похибка. Для встановлення впливу низьких температур (+0,5°C; +4°C) на ріст коренів *A. thaliana* (GFP-ABD2-GFP) на протязі 24, 48 та 72 год визначали показники відносного приросту коренів (%), що було представлено як співвідношення фактичного приросту (мм) оброблених коренів до фактичного приросту коренів контролю (мм), розраховане в програмі Microsoft Office Excel 2007 за формулою:

$$\Delta = \frac{L_{cp} - L_0}{L_0} * 100\%$$

де  $L_{cp}$  – середнє значення довжини коренів, оброблених низькими температурами протягом встановленого часу (мм),

$L_0$  – середнє значення довжин коренів до початку експерименту (мм),

$\Delta$  – приріст довжин коренів (%).

Достовірність різниці вираховували за критерієм Стюдента. Значення довжин коренів (мм) наводили як середнє арифметичне ( $M$ )  $\pm$  середнє відхилення ( $m$ ).

Для отримання даних щодо деформації коренів та побудови кореневого профілю вимірювали діаметр клітин з різних зон коренів за допомогою програми *ImageJ* (версія 1.38 d). Об'єм вибірки складав 30 коренів, а також досліди повторювали принаймні тричі для усіх досліджуваних зразків у певних часових проміжках. Розрахунок коефіцієнту кореневого свелінгу проводили за формулою [269]:

$$K_{\text{свел}} = \frac{D1 - D_0}{D_0} * 100\%$$

де  $D1$  – середній діаметр клітин коренів після обробки низькими температурами протягом встановленого часу (мм),

$D_0$  – середній діаметр клітин коренів в контрольному варіанті до початку експерименту (мм),

Ксвел – коефіцієнт свелінгу (%).

#### **4.4.2. Вивчення впливу низьких температур та модуляторів вмісту NO на морфологію первинних коренів *A.thaliana* і організацію актинових філаментів у його клітинах**

Зміни морфології первинних, бічних та додаткових коренів проростків *A. thaliana* в умовах холодowego стресу вивчали за допомогою світлового мікроскопа Axioskop 40 (Carl Zeiss, Німеччина), об'єктиви Plan-Neofluar 10x/0.30, 20x/0.5 и 40x/1.30 Oil DIC.

Зміни організації актинових філаментів під впливом низьких температур та модуляторів вмісту NO візуалізували *in vivo* за допомогою флуорисцентної химерної білкової конструкції GFP-ABD2-GFP використовуючи лазерний скануючий конфокальний мікроскоп LSM 5 PASCAL (Carl Zeiss, Німеччина). Для отримання тривимірного зображення використовували аргонівий лазер з довжиною хвилі 488 нм, роздільний фільтр HFT 405/488, емісійний фільтр BP 505-530, об'єктиви Plan Aplanochromat 40x/1.4 DIC та 60x/1.4 Oil DIC. Індивідуальну конфігурацію визначали для кожного об'єкта зміною параметрів швидкості сканування, точкової діафрагми та детектора променя. Тривимірні структури різних типів організації мікрофіламентів 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).

Організацію актинових філаментів досліджували у різних шарах клітин усіх ростових зон кореня: клітинах кореневого чохла, меристематичній зоні, епідермальних клітинах та клітинах кори перехідної зони, зон розтягу та диференціації, а також у корневих волосках. Досліди повторювали принаймні тричі для усіх досліджуваних зразків у певних часових проміжках.



#### **4.4.3. Визначення змін орієнтації актинових філаментів під впливом холодowego стресу за допомогою програмного забезпечення MicroFilament Analyzer**

Для визначення основної орієнтації мікрофіламентів після комбінованого впливу донора/скавенджера NO та низьких температур використовували програмне забезпечення MicroFilament Analyzer (MFA), що було розроблене співробітниками з університету Анверпена (м. Анверпен, Бельгія) [101]. Це програмне забезпечення знаходиться у вільному доступі для наукових та освітніх цілей на сайті <http://www.ua.ac.be/bimef/MFA>.

Для аналізу використовували зображення мікрофіламентів (зрізи та z-стеки), що були отриманні за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопу LSM 5 PASCAL (Carl Zeiss, Німеччина). Візуальне представлення виявлених актинових філаментів в зображенні Z-стека зберігається, і числові дані експортуються в автоматично створену таблицю (\*.xls), що містить в собі виявлені параметри клітини, число мікрофіламентів на кут в клітині, а також їх домінуючу орієнтацію.

## РОЗДІЛ 5

### ВПЛИВ НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР ТА КОМБІНОВАНА ДІЯ ЕКЗОГЕННОГО NO І ХОЛОДУ НА РІСТ ТА МОРФОЛОГІЮ ПЕРВИННИХ КОРЕНІВ *A. THALIANA*

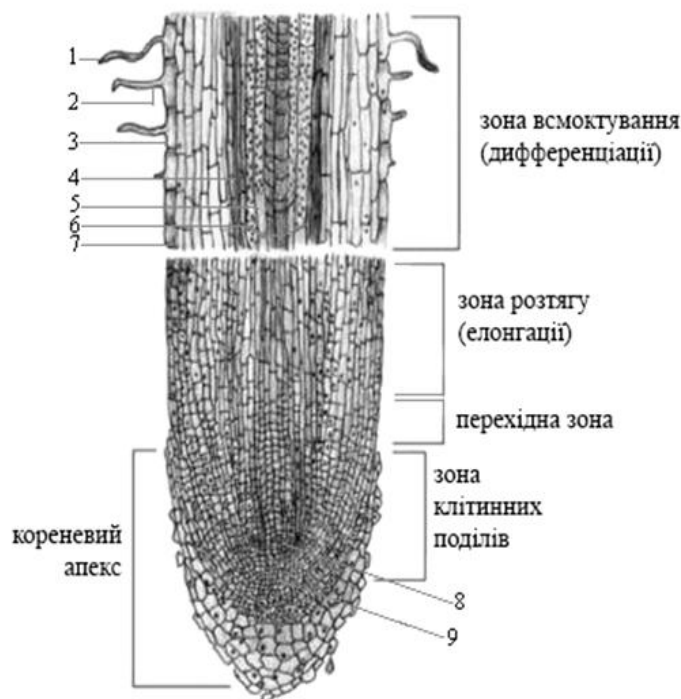
#### 5.1. Особливості будови кореня *A. thaliana*

*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (різушка Таля) – однорічна дводольна рослина із родини Хрестоцвітих, яка завдяки розшифровці її геному стала в останні роки пріоритетним модельним об'єктом сучасної біології рослин. У *A. thaliana* формується коренева система змішаного типу, яка об'єднує в собі систему головного кореня і систему придаткових коренів [273]. Виділяють наступні ростові або функціональні зони кореня: поділу (зона меристеми), перехідну, розтягу (зона елонгації), всмоктування (зона диференціації) [58, 236] (Рис. 5.1). Епідермальний шар клітин має видовжену циліндричну форму і межує з запасальним шаром клітин кори з численними міжклітинниками та плазмодесмами, під яким розташовані ендодермальні клітини із суберинізованими поясками Каспарі на їх радіальних та поперечних поверхнях [58].

Кореневий апекс, до якого входить зона меристеми, вкритий кореневим чохликом. Зона активних клітинних поділів (меристема) простягається приблизно на 200 мм від кінчика кореня (Табл. 5.1). Розмір клітин перехідної зони збільшується у геометричній прогресії по мірі віддалення від ізодіаметричних клітин меристеми і наближення до видовжених клітин зони розтягу. Ядра, так само, як і в клітинах меристеми розташовані в центрі клітин і містять невеликі вакуолі. У стійкому стані зростаючих коренів перехідна зона покриває відстань приблизно від 200 до 520 мм від кінчика кореня [236]. Зона розтягу – це зона дуже швидкого подовження клітин в довжину, що значно перевищує їх ширину. Ядра виштовхуються в сторону клітинних стінок через дуже швидке формування великих центральних

вакуолей. Зона розтягу покриває відстань приблизно від 520 до 850 мм від кінчика кореня. У зоні всмоктування епідермальні клітини з щільною цитоплазмою, що дають початок кореневим волоскам, мають назву трихобласти, інші – атрихобласти. Зона характеризується дуже активним ростом корневих волосків і простягається приблизно від 850 до 1500 мм від кінчика кореня [58, 236].

Бічні корені у *A. thaliana* закладаються на деякій відстані від апексу зазвичай в зоні всмоктування перициклу центрального циліндра. Перицикл в основному складається з одного шару клітин, які характеризуються високою меристематичною активністю. Завдяки діяльності клітин перициклу утворюються бічні корені. Закладення бічного кореня починається з ряду поділів клітин перициклу і формування кореневого зачатку. Під час росту зачаток майбутнього бічного кореня проштовхується через тканини кори в зовнішній шар і з'являється зовні [143].



1 – кореневий волосок; 2 – трихобласт епідермального шару; 3 – атрихобласт епідермального шару; 4 – кортикальний шар; 5 – ендодерма; 6 – перицикл; 7 – ксилемні та флоемні елементи; 8 – апікальна меристема з окремими шарами ініціалів; 9 – центр спокою.

Рис. 5.1. Ростові зони кореня типової дводольної рослини [222].

Таблиця 5.1

Характеристика основних ростових зон кореня *A. thaliana*

Зони креня	Особливості будови	Функції
Кореневий чохлик	Паренхімні клітин з потовщеними клітинними стінками; клітини мають підвищений тургор	Захист зони ділення від механічних пошкоджень; полегшення просування кореня в ґрунті
Зона поділу, або зона ембріонального росту	Дрібні клітин з тонкими клітинними стінками і великими ядрами	Інтенсивний поділ клітин
Зона розтягу	Клітини внаслідок розтягування набувають циліндричної форми, їх ядро зміщене вбік, а дрібні вакуолі, об'єднуючись, утворюють кілька великих вакуоль	Ріст кореня та його поступове заглиблення в ґрунт
Зона всмоктування, або зона корневих волосків	Кореневі волоски – одноклітинні вирости зовнішніх клітин кореня (довжиною від 1-2 до 100 мкм)	Всмоктування води і розчинених у ній мінеральних солей з ґрунту
Зона проведення, або зона бічних коренів	Судини (входять до складу ксилеми) – мертві клітини із зруйнованими поперечними перетинками. Ситоподібні трубки (входять до складу флоєми) – живі, клітини, у яких поперечні перетинки перфоровані	Переміщення води і розчинених в ній мінеральних солей до частин пагона – стебла і листків (висхідний потік); переміщення органічних речовин, необхідних для живлення клітин кореня (низхідний потік). Ендогенна закладка бічних коренів.

У *A. thaliana*, як і в усіх рослин, кінчик кореня зовні покритий одношаровою тканиною (епіблемою). Через неї всмоктується вода, мінеральні речовини із ґрунту і здійснюється їх передача в стебло і листя. Покривні клітини можуть утворювати кореневі волоски, які виникають в зоні диференціації і розвиваються в області всмоктування. По довжині кореня вони зазвичай займають площу 1,5-2 см<sup>2</sup>. Кореневі волоски не довговічні, і їх період життя становить приблизно 10-20 днів. Під час росту кореня на деякій відстані від його кінчика, там, де закінчується зона росту, з'являються нові вирости покривних клітин. Молоді кореневі волоски є короткими, а далі по мірі свого росту вони витягуються і приймають трубчасту форму. У *A. thaliana* довжина зрілого кореневого волоска становить приблизно 600-1000 мкм, а діаметр – 10 мкм [273].

## **5.2. Вплив низьких температур на ріст головного кореня проростків *A. thaliana***

В результаті проведених досліджень встановлено, що експозиція проростків *A. thaliana* при температурах +4°C і +0,5°C призводить до значних змін параметрів росту і розвитку первинного кореня. Через 24 год експозиції при +4°C інтенсивність росту головного кореня зменшувалась приблизно в 2,8 рази, через 48 год – в 3,1, а через 72 год – в 3,6 рази в порівнянні з необробленими проростками. Зі зниженням температури до +0,5°C збільшується інгібуючий ефект холоду на параметри росту коренів *A. thaliana*. Так, через 24 год інтенсивність росту зменшилася в 3 рази, через 48 год – в 3,2, а через 72 год – в 4 рази (Рис. 5.2).

Загальновідомо, що гальмування росту первинного кореня є наслідком негативного впливу низької температури на поділ і подовження клітин кореня. З літературних даних відомо, що при експозиції при температурі +4°C відбувається інгібування росту коренів *T. aestivum* [1]. Також обробка температурою +4°C здійснює інгібуючий вплив на ріст та розвиток пилкової

трубки у *Pyrus pyrifolia* [252]. При дослідженні впливу холоду ( $+4^{\circ}\text{C}$ ) на кінчики кореня *A. thaliana* виявлено, що вони переставали подовжуватися, а в період відновлення спостерігалася чітка диференціація клітин [207]. Раніше було показано на проростках *Cucumis sativus*, що тривала дія низької температури ( $+4^{\circ}\text{C}$ ) гальмує ріст і розвиток рослин, знижує накопичення біомаси і змінює її розподіл по органах рослин в порівнянні з контролем. При цьому спрямованість дії постійної низької температури була однаковою при всіх фотоперіодах, включаючи цілодобове освітлення [209].

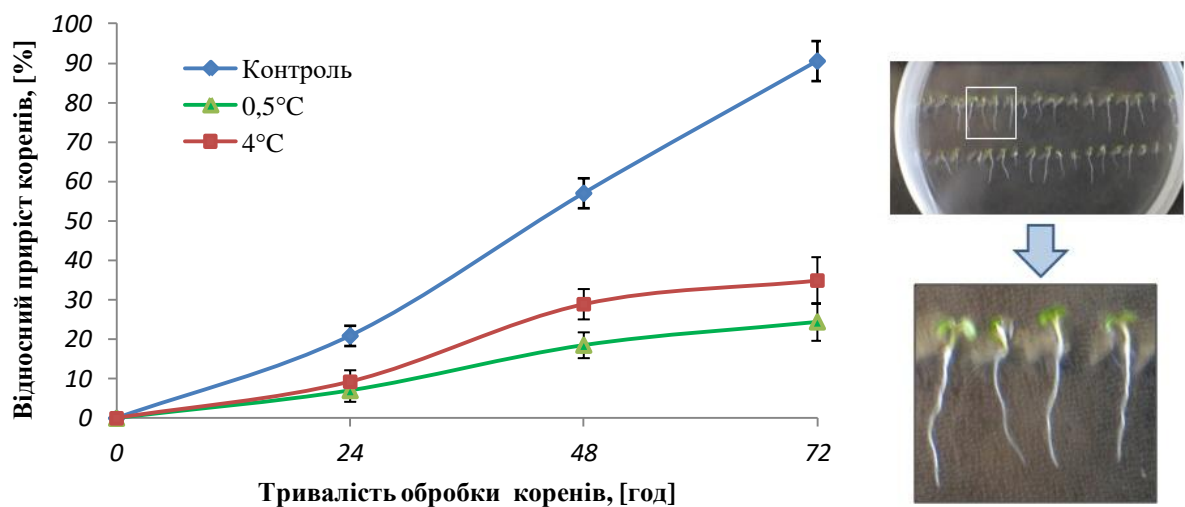


Рис. 5.2. Зміни приросту головного кореня проростків *A.thaliana* при різних строках експозиції в умовах понижених температур

Інгібуючий вплив досліджуваних температур у відсотковому співвідношенні представлено в табл. 5.2. Зокрема, через 24 години приріст головних коренів зменшується на 55,7% при обробці температурою  $+4^{\circ}\text{C}$ , на 66,4% – при температурі  $+0,5^{\circ}\text{C}$ . У свою чергу, 48- і 72-годинна обробка низькими температурами призводила до уповільнення росту коренів проростків *A. thaliana* на 56,3% і 61,5% ( $+4^{\circ}\text{C}$ ), на 67,6% і 73,1% ( $+0,5^{\circ}\text{C}$ ) відповідно.

Таблиця 5.2

**Пригнічення приросту коренів проростків *A. thaliana* після обробки  
низькими температурами, %**

Час обробки \ Температура	24 год	48 год	72 год
+ 4°C	55,7±4,49	56,3±5,51	61,5±6,02
+ 0,5°C	66,4±3,31	67,6±4,72	73,1±5,34

Низькі температури в цілому негативно впливають на проростання і розвиток пилкової трубки у різних видів рослин. Наприклад, проростання пилкової трубки у *Annona cherimola* на 1,5% менше при +10°C, ніж при +25°C [191], а у *Carica papaya* проростання пилкової трубки було повністю пригнічене при +5°C [43].

Вважається, що однією із причин інгібування росту коренів є зниження плинності клітинної мембрани, що призводить до відкриття Ca<sup>2+</sup>-каналів та зменшення сили натягу в мембрані. Внаслідок цього посилюється надходження Ca<sup>2+</sup> в цитоплазму, що активує протеїнкінази, фосфорилування певних білків, експресію специфічних для холодової акліматизації генів і розвиток адаптаційних процесів холодостійкості [122, 32].

### **5.3. Вплив низьких температур на морфологічні показники головних коренів проростків *A. thaliana***

Виявлено, що експозиція коренів *A. thaliana* при низькій позитивній температурі приводила до значних порушень морфології первинних коренів. Зокрема, обробка температурою +4°C ініціює деформацію кореневого апексу, укорочення зони росту, а також розбухання і формування деформованих кореневих волосків в безпосередній близькості від меристематичної зони кореня (Рис. 5.3, б-д). У цих же умовах спостерігалась поява великої

кількості корневих волосків з порушеною морфологією в зоні диференціації (Рис. 5.3, ж-к). Крім того, нами виявлено, що обробка коренів *A. thaliana* температурою  $+0,5^{\circ}\text{C}$  спричиняє дещо інший ефект, який проявляється в анізотропному збільшенні діаметру епідерманих клітин на рівні перехідної зони та зони розтягу (свелінг) порівняно з необробленими зразками (Рис. 5.5).

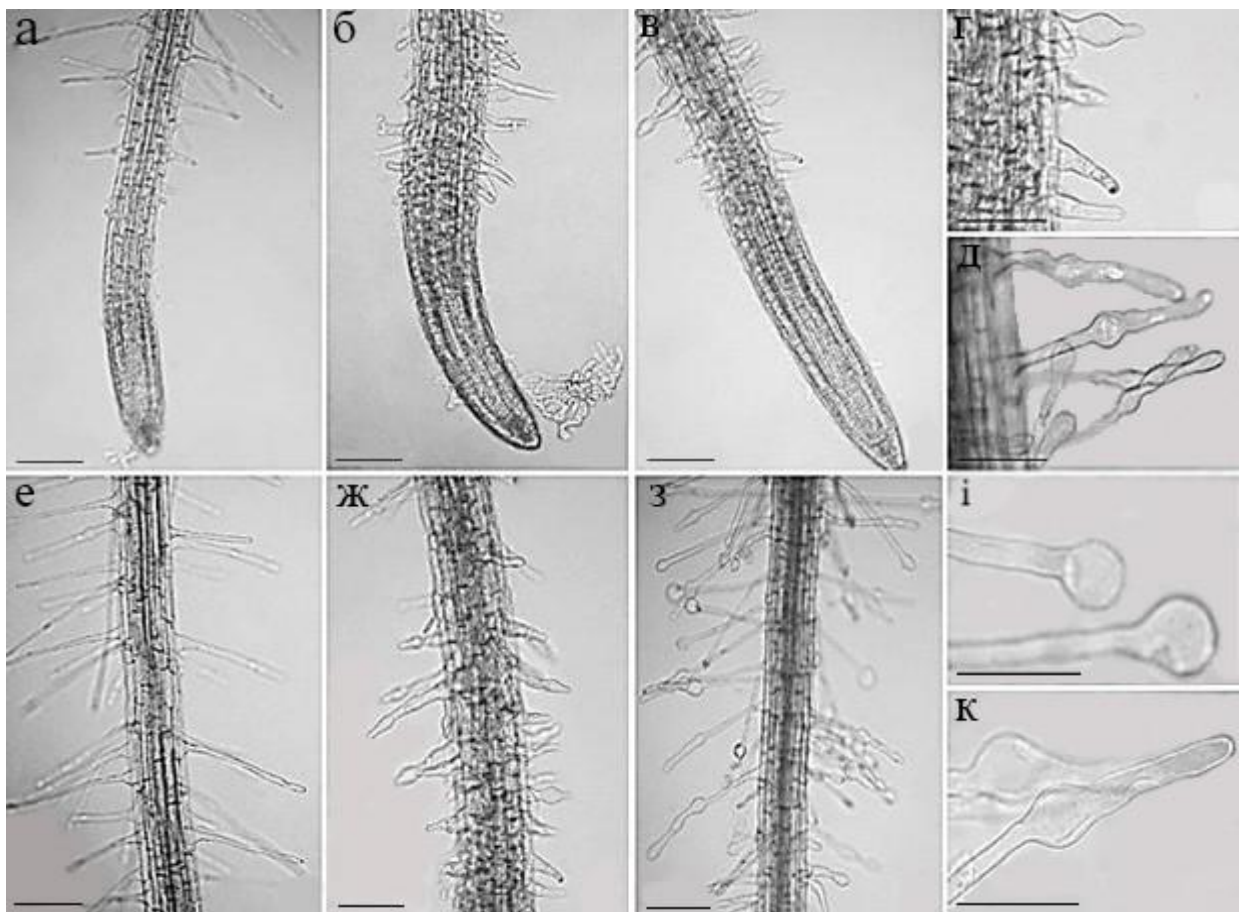


Рис. 5.3. Деформація кореневого апексу проростків *A. thaliana* після впливу температури  $+4^{\circ}\text{C}$ : а, е – контроль; б, г, ж, і – вкорочення зони розтягу і розбухання корневих волосків зони диференціації через 24 год; в, д, з, к – через 48 год. Масштаб: 10 мкм (а, б, в, е, ж, з), 40 мкм (г, д), 100 мкм (і, к)

Утворення свелінгових деформацій кореня при дії низьких температур пов'язане із порушенням процесів полімеризації компонентів цитоскелету



(мікротрубочок та актинових філаментів) та/або руйнування центрів їх організації. Нами було проведено дослідження для визначення здатності холоду індукувати появу свелінгових деформацій у різних типах клітин кореня *A. thaliana*. Отримані результати свідчать про те, що розмір свелінгових деформацій після впливу температури  $+4^{\circ}\text{C}$  сягав найвищих показників в зоні диференціації кореня, а саме в кореневих волосках і мав прямо пропорційну залежність від тривалості дії низької температури (Табл. 5.3).

Таблиця 5.3

**Формування свелінгу в клітинах різних зон кореня *A. thaliana*  
після впливу низьких температур, %**

Температура	$+4^{\circ}\text{C}$			$+0,5^{\circ}\text{C}$		
Час обробки Зони кореня	24 год	48 год	72 год	24 год	48 год	72 год
Епідермальні клітини кореневого апексу	9,2±0,8	15,2±0,9	16,7±2,4	3,6±0,9	4,9±1,3	4,2±2,2
Зона меристеми	14,1±0,9	18,2±1,4	26,8±2,1	6,6±1,0	7,8±1,6	10,3±2,2
Зона розтягу	16,1±0,7	22,2±1,1	24,8±1,8	<b>36,3±1,1</b>	<b>53,6±1,8</b>	<b>92,9±2,3</b>
Зона диференціації	<b>55,4±0,9</b>	<b>73,7±1,3</b>	<b>86,5±2,6</b>	8,5±0,8	11,7±1,3	10,2±2,6

Так, через 24 год в клітинах кореневих волосків (зона диференціації) після обробки температурою  $+4^{\circ}\text{C}$  коефіцієнт свелінгу складав  $55,4\pm 0,9\%$ . Збільшення часу обробки (48, 72 год) супроводжувалось збільшенням розмірів деформацій коренів, про що свідчить зростання коефіцієнту свелінгу, яке складало  $73,7\pm 1,3\%$  та  $86,5\pm 2,6\%$  відповідно (Рис. 5.4).

Раніше було показано, що у рослин, які піддаються холодовому стресу, проявляються різні фенотипічні симптоми, що включають: зниження росту, вкорочення листкової пластинки [214, 194], в'янення, зниження куціння [12], пожовтіння листя – хлороз [256], а також може привести до згибелі тканин – некрозу [105, 193]. Холодовий стрес також сильно впливає на репродуктивний розвиток рослин, що характеризується поганою схожістю насіння, зниженням розвитку стручків у чутливих видів і може привести до стерильності пилку, що є одним з ключових факторів, відповідальних за скорочення врожайності сільськогосподарських культур [223, 129].

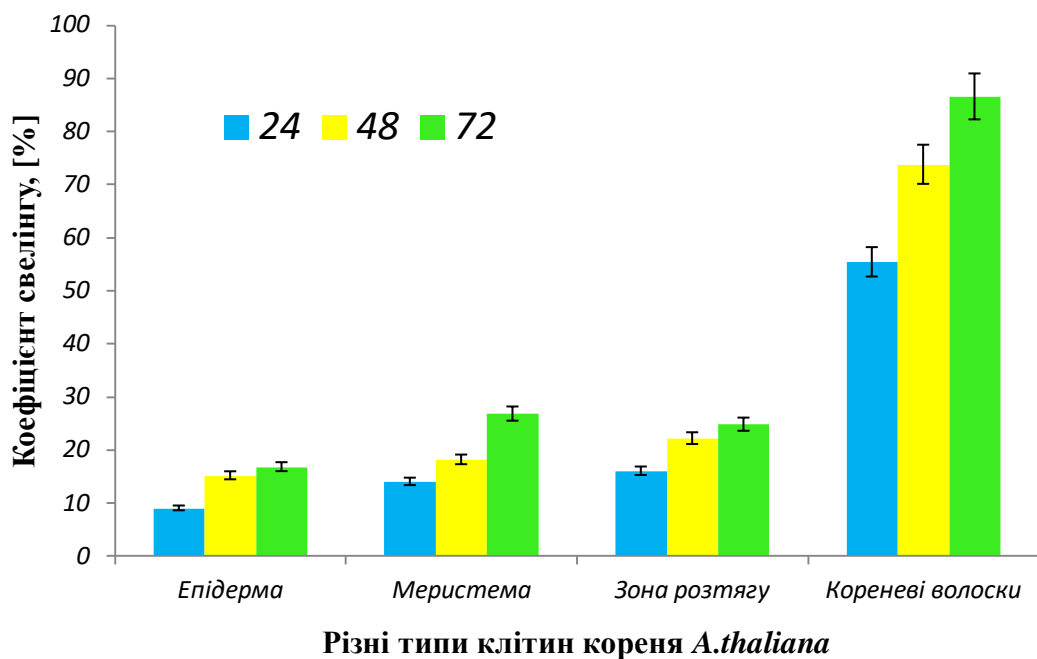


Рис. 5.4. Формування свелінгових деформацій в клітинах різних зон кореня проростків *A. thaliana* після впливу температури +4°C

Подальше зниження температури до +0,5°C супроводжується вираженим збільшенням діаметру епідермальних клітин в перехідній зоні та зоні розтягу (свелінг) і, як наслідок, збільшенням розмірів свелінгових деформацій на коренях проростків (Рис. 5.5). Так, через 24 год впливу температури +0,5°C коефіцієнт свелінгу епідермальних клітин зони розтягу

складав  $36,3 \pm 1,1\%$ , через 48 год –  $53,6 \pm 1,8\%$  і через 72 год –  $92,9 \pm 2,3\%$  відповідно (Табл. 5.3, Рис. 5.6).

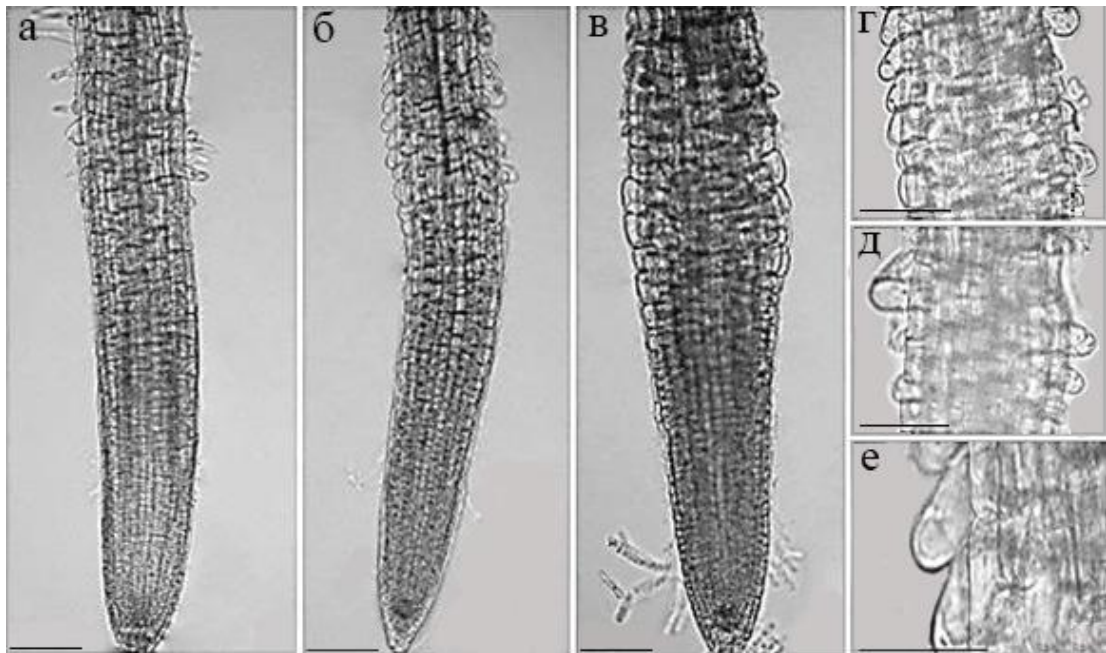


Рис. 5.5. Морфологічні зміни кореневого апексу проростків *A. thaliana* після впливу температури  $+0,5^{\circ}\text{C}$ : а – контроль; б, г, д – через 24 год; в, е – через 48 год. Масштаб: 10 мкм (а, б, в), 40 мкм (г, д), 100 мкм (е)

Можливо, данні зміни морфології пов'язані саме із пошкодженням цитоскелетних структур під впливом досліджуваних температур, що в і призводить до формування новоутворень в коренях проростків *A. thaliana*, тобто формування свелінгових деформацій в епідермальних клітинах зони розтягу та корневих волосках (Рис. 5.3, 5.5).

Очевидно, що гальмування росту первинних коренів і порушення їх морфології є результатом негативного впливу низьких температур на подовження кореня і поділ клітин, які можуть бути пов'язані з порушенням організації їх цитоскелету, зокрема актинових філаментів.

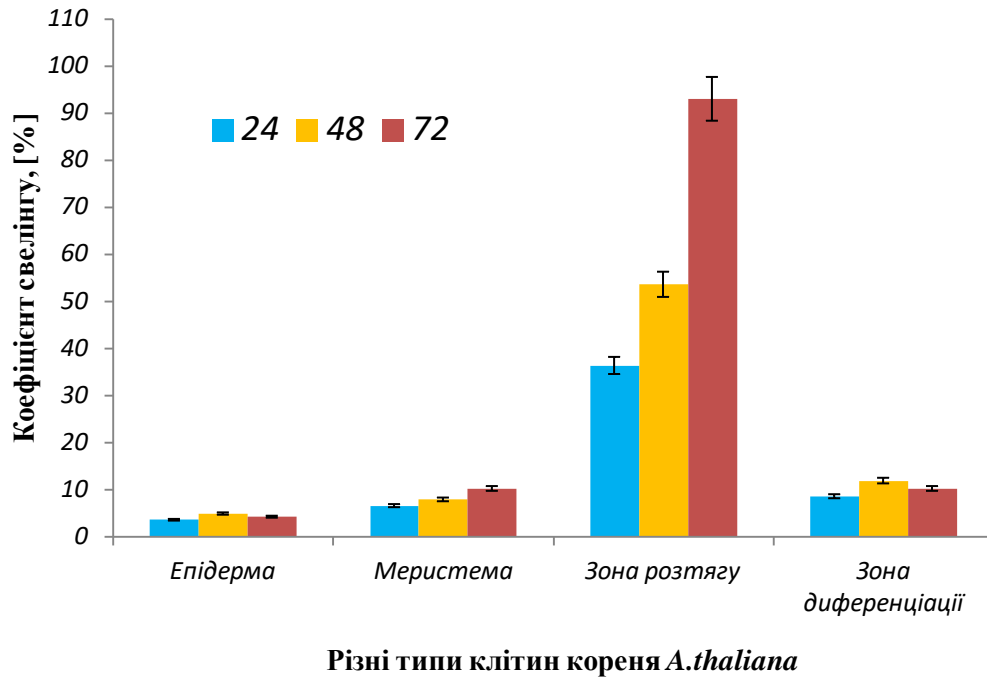


Рис. 5.6. Формування свелінгових деформацій в різних типах клітин головного кореня проростків *A. thaliana* після впливу температури +0,5°C.

Раніше повідомлялося, що порушення процесів росту і поділу в суспензійній культурі клітин тютюну ВУ-2 внаслідок обробки холодом безпосередньо були пов'язані зі змінами організації мікрофіламентів [184]. Тому наступним етапом наших досліджень було вивчення впливу низьких температур на організацію і орієнтацію актинових філаментів в ході росту і диференціації різних типів клітин головного кореня проростків *A. thaliana*.

#### **5.4. З'ясування особливостей комбінованого впливу екзогенного NO та низьких температур на ріст і морфологію первинних коренів *A. thaliana***

В останє двадцятиліття велику увагу приділяють дослідженню оксиду азоту – універсального вторинного посередника в клітинах еукаріотичних організмів [217]. Відомо, що у рослин NO залучений до відповіді рослин на дію біотичних та абіотичних стресових факторів [81]. Раніше було показано,

що дія високої температури на клітини люцерни призводить до посилення синтезу NO [219, 165]. Zhao із співавт. (2003) повідомляють, що холодова акліматизація викликана підвищенням рівня синтезу ендogenous NO у дикого типу *A. thaliana* і в листках мутанта *Atnoa1/rif1*, в той час як рівень ендogenous NO *nia1nia2* (NR-дефектний подвійний мутант) був нижчим, ніж у дикого типу. Холодова акліматизація стимулює діяльність дефектного подвійного мутанта і індукує регуляцію генів *NIA1*. Фармакологічні дослідження з використанням інгібітора дефектного подвійного мутанта NO поглинача і NO-донорів показало, що рівень NO позитивно корелює із впливом низьких температур.

Нами було показано, що при комбінованій дії холоду та екзогенного донора NO (SNP) відбувається часткове стимулювання росту головних коренів порівняно з коренями, що піддавались дії лише холодовому стресу. Так, відносний приріст контрольних коренів, оброблених SNP в концентрації 100 мкМ через 24 год складає 24,2%, через 48 год – 66,5% і через 72 год – 86,2% у порівнянні з приростом коренів необроблених проростків, що становить через 24 год – 22%, через 48 год – 57% і через 72 год – 83%).

При обробці проростків холодом і екзогенним донором NO (100 мкМ SNP) через 24 год стимулюється ріст приблизно в 0,81 раза, через 48 год – в 0,84 раза, а через 72 год – в 0,75 раза порівняно із обробленими лише холодом проростками. Зворотна картина спостерігається при комбінованій дії холоду та скавенджера NO (сРТЮ). Так, на всіх часових проміжках спостерігається сповільнення росту коренів при обробці сРТЮ в концентрації 100 мкМ. Приріст коренів через 24 год пригнічується приблизно в 1,9 рази, через 48 год – в 1,4 раза і через 72 год – в 1,3 раза порівняно із приростом коренів, що піддавались лише холодовому стресу (Рис. 5.7).

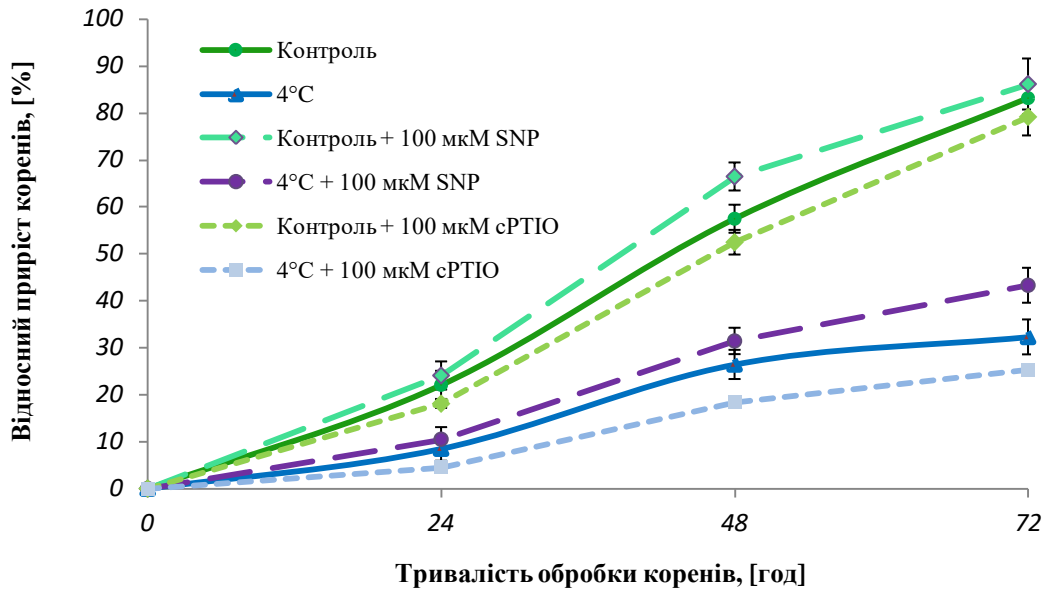


Рис. 5.7. Зміни приросту головного кореня проростків *A. thaliana* при різних строках експозиції в умовах пониженої температури (+4°C) і комбінованого впливу холоду та донора/скавенджера NO (SNP/cPTIO)

Окрім позитивного впливу на ріст головних коренів проростків *A. thaliana*, обробка нітропрусидом натрію в концентрації 100 мкМ не спричиняє виражених змін в морфології коренів, лише проявляється в ініціації формування нових кореневих волосків в порівнянні з контрольними коренями (Рис. 5.8, а). Після комбінованого впливу температури +4°C і донора NO нітропрусиду натрію не спостерігається таких сильних пошкоджень морфології, як при дії лише холодового стресу. Зменшується кількість деформованих кореневих волосків в зоні диференціації кореня, не спостерігається розбухання кореневих волосків як при експозиції проростків при низьких температурах (Рис. 5.8, б-д). Можна припустити, що наведені процеси регулюються шляхом передачі сигналу взаємодій оксиду азоту на молекулу-мішені, зокрема, внаслідок посттрансляційних модифікацій ключових білків цитоскелету, які забезпечують морфогенез рослинного організму.

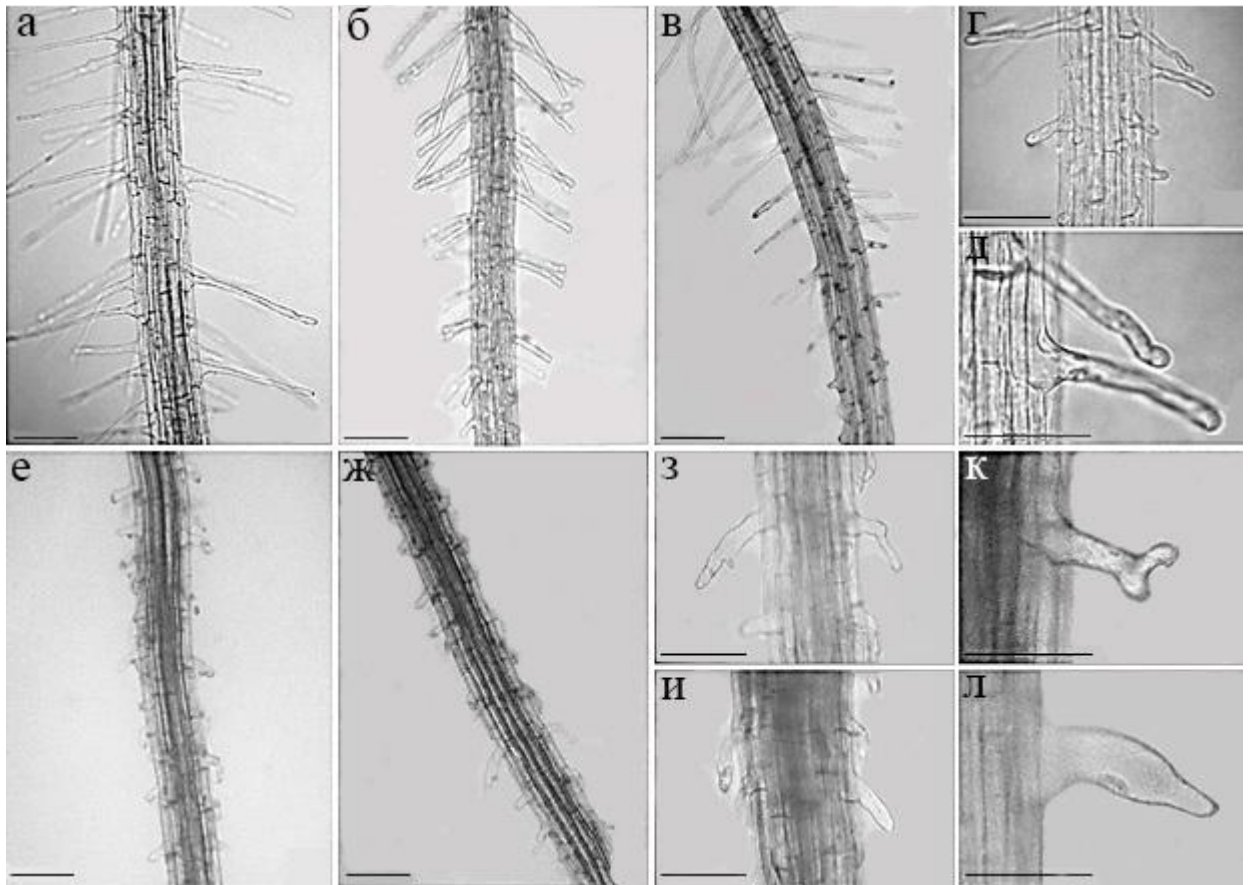


Рис. 5.8. Деформація кореневого апексу проростків *A. thaliana* після комбінованого впливу холоду ( $+4^{\circ}\text{C}$ ) та донора/скавенджера NO: а – контроль; б-д – 100 мкМ SNP (б – 24 год, в – 48 год, г-д – 72 год); е-к – 100 мкМ сРТЮ (е – 24 год, ж-и – 48 год, к-л – 72 год). Масштаб: 10 мкм (а, б, в, е, ж), 40 мкм (г, з, и), 100 мкм (д, к, л)

Зворотні зміни спостерігаються після комбінованої дії холоду і скавенджера NO. Вже через 24 год, після комбінованої дії температури  $+4^{\circ}\text{C}$  та сРТЮ в концентрації 100 мкМ, активно формуються численні кореневі зачатки з порушеною морфологією (Рис. 5.8, е), для частини з яких характерним є свелінг, інші кореневі волоски є розгалуженими або викривленими, їх подальший ріст припиняється (Рис. 5.8, ж-л). До того ж відбувається збільшення діаметру епідермальних клітин перехідної зони та власне зони розтягу.

Раніше вже було показано, що у присутності високої нефізіологічної концентрації сРТІО (1 мМ) відбувається утворення зачатків корневих волосків у *A. thaliana* без їх подальшого росту [140]. Скавенджери NO ізопрен і розгалужений гемоглобін (trHb) підвищують проростання насіння *A.thaliana* при високих температурах, усуваючи надлишкову кількість NO, що продукувалась при високотемпературному стресі [94]. Виявлено, що використання екзогенного NO при тепловому шоці у *Phaseolus radiatus* сприяє збереженню параметрів флуоресценції хлорофіла *a*, цілісності мембран, складу H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> і активності антиоксидативних ферментів без участі стресових факторів [213]. На прикладі томатів показано, що обробка донором NO (SNP) стимулює утворення і ріст бокових коренів, інгібуючи при цьому ріст головного кореня. При додаванні скавенджера NO (сРТІО) виявлений ефект знижувався [49]. За допомогою флуоресцентної мікроскопії виявлено локальне збільшення концентрації NO в примордіях бокових коренів томатів. Таким чином, ці результати свідчать про те, що NO є внутрішньоклітинним регулятором, що впливає на архітектуру кореневої системи, яка стає внаслідок його дії більш короткою та розгалуженою [49].

Результати проведених досліджень опубліковані у роботах [270, 182, 183].



**РОЗДІЛ 6**  
**ВПЛИВ НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР ТА КОМБІНОВАНА ДІЯ**  
**ДОНОРА (SNP) І СКАВЕНДЖЕРА (сРТЮ) ОКСИДУ АЗОТУ ТА**  
**ХОЛОДУ НА ОРГАНІЗАЦІЮ АКТИНОВИХ ФІЛАМЕНТІВ**  
**У КЛІТИНАХ КОРЕНЯ *A. THALIANA***

**6.1. Особливості організації актинових філаментів в різних типах клітин первинних коренів *A. thaliana***

Як уже зазначалось раніше, актинові філаменти є одними з ключових компонентів цитоскелету, що відіграють вирішальну роль в розвитку рослини, регулюючи низку таких базових клітинних процесів, як диференціація та ріст клітини, міжклітинні взаємодії, клітинна моторика, зокрема рухливість органел та транспорт везикул та ін. [97, 185, 134]. Як і в інших еукаріотичних системах, організація актинових філаментів рослин регулюється цілою низкою регуляторних білків, які визначають наявність фібрилярного (F-) або глобулярного (G-) актину. Деякі з цих білків зв'язують F-актин безпосередньо, щоб полегшити його взаємодію з іншими цитоскелетними і/або клітинними компонентами [24]. Повне секвенування генома *A. thaliana* призвело до ідентифікації численних генів, які кодують актин-зв'язуючі білки [97].

Паралельно з досягненнями в області генетичних і біохімічних підходів для вивчення мікрофіламентів також розвиваються мікроскопічні методи візуалізації його організації в живих рослинах. Раніше візуалізація F-актину в клітинах рослин базувалась значною мірою на фіксованому матеріалі флуоресцентно міченого фалоїдином або за допомогою методів імуногістохімії. Ці підходи і зараз залишаються незамінними для вивчення організації актинових філаментів у рослин, але недавній розвиток мікроскопічних досліджень дає можливість здійснювати візуалізацію мікрофіламентів в живих клітинах [44, 251].

Відкриття зеленого флуоресцентного білка (GFP) стало поштовхом для створення нового класу зондів для візуалізації цитоскелету в живих клітинах. Першим з цих зондів був GFP, злитий з зв'язуючим доменом асоційованого з мікротрубочками білка 4 (GFP-MBD) [145]. З моменту свого створення дана конструкція широко застосовувалась для опису організації мікротрубочок в живих рослинних клітинах [2]. Невдовзі після розвитку GFP-MBD зонду було розроблено репортер для прижиттєвої візуалізації F-актину, де GFP був злитий з актин-зв'язуючим регіоном таліна савців (GFP-Talin) [126]. Дослідження фімбрину 1 із *A. thaliana* сприяло розробці різноманітних альтернатив GFP-Talin для створення химерних F-актин-зв'язуючих білків [127], де GFP злитий з конкретними доменами *A. thaliana* фімбрину 1 (GFP-Fimbrin), зокрема, з GFP актин-зв'язуючим доменом 2 (GFP-ABD2), що являється кращим серед різноманітних варіантів химерного білка GFP-Fimbrin [238, 240].

Для розширення можливостей GFP-Fimbrin, як прижиттєвого маркера F-актину був створений варіант конструкції ABD2-GFP шляхом злиття ABD2 з додатковим GFP [192, 77]. В нашій роботі використовують трансгенні рослини *A. thaliana*, що експресують саме репортерний ген 35::*GFP-ABD2-GFP* (F-актин зв'язуючий домен (ABD) гена фімбрину із *A. thaliana*, злитий з геном *gfp* як з C-, так і з N-кінця ABD2), який дозволяє візуалізувати актинові філаменти в клітинах цієї лінії *in vivo* за допомогою конфокальної мікроскопії.

Виявлено, що в контрольних зразках епідермальних клітин на рівні меристеми і в клітинах власне меристеми мікрофіламенти представлені у вигляді тонкої високодинамічної сітчастої структури та розміщуються по всій цитоплазмі клітини (Рис. 6.1, 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. 6.1, в). В зоні розтягу пучки F-актину також розміщуються навколо ядра, а біля поверхні клітини спостерігаються більш товсті і помітні нитки актину (Рис. 6.1, г).

Актинові філаменти представлені також в клітинах з апікальним типом росту, зокрема в корневих волосках. 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. 6.1, д, е).

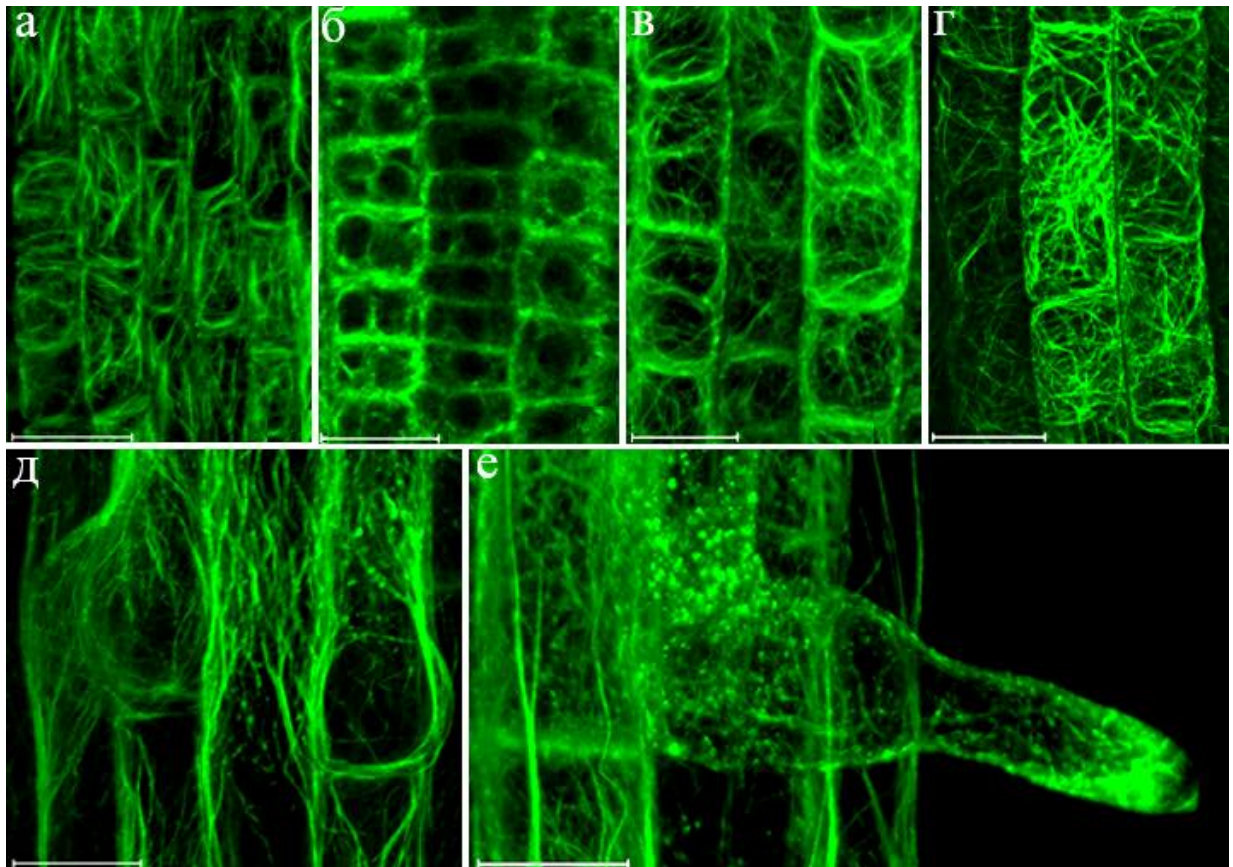


Рис. 6.1. Організація актинових філаментів в різних типах клітин кореня проростків *A. thaliana* лінія, що експресує GFP-ABD-GFP: а – епідермальні клітини на рівні меристеми; б – клітини меристеми; в – клітини перехідної зони; г – клітини зони розтягу; д, е – клітини зони диференціації і кореневий волосок. Масштаб: 20 мкм

Отримані результати добре узгоджуються з раніше описаними закономірностями організації актинових філаментів в різних типах клітин

кореня проростків *A. thaliana*, де GFP злитий з F-актин зв'язуючим доменом 2 (ABD) з гена фімбрину 1 [238, 240].

## **6.2. Вплив температури +4°C на організацію актинових філаментів в різних типах клітин кореня проростків *A. thaliana***

Залежні від часу зміни приросту головних коренів, а також роздуття кореневих волосків та збільшення їх кількості в зоні диференціації при експозиції +4°C, можуть бути пов'язані з безпосереднім впливом низьких температур на організацію та орієнтацію актинових філаментів. Тому наступним етапом нашої роботи було дослідження впливу низьких температур на мікрофіламенти в різних типах клітин головних коренів проростків *A. thaliana* лінії, що експресує GFP-ABD2-GFP.

Було показано, 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°C в епідермальних клітинах на рівні меристеми можна було спостерігати більш тонку неупорядковану та розріджену мережу мікрофіламентів (Рис. 6.2, а). Клітини апікальної меристеми виявились досить чутливими до дії цієї температури, оскільки в них також фіксували зміну нативної орієнтації актинових філаментів, в тому числі і їх часткову деполімеризацію (Рис. 6.2, б). Нами також виявлено зміни організації мікрофіламентів після експозиції при температурі +4°C в епідермальних клітинах на рівні перехідної зони і зони розтягу кореня *A. thaliana*, де вони реорієнтувалися і ставали більш тоншими і короткими в порівнянні з контролем (Рис. 6.2, в). Встановлено, що підвищена чутливість до дії холоду характерна для актинових філаментів в клітинах зони диференціації, зокрема в кореневих волосках. Після інкубації коренів при +4°C вже через 1 год в клітинах кореневих волосків спостерігали

розрідження актинової сітки і часткову деполімеризацію мікрофіламентів (Рис. 6.2, г, д).

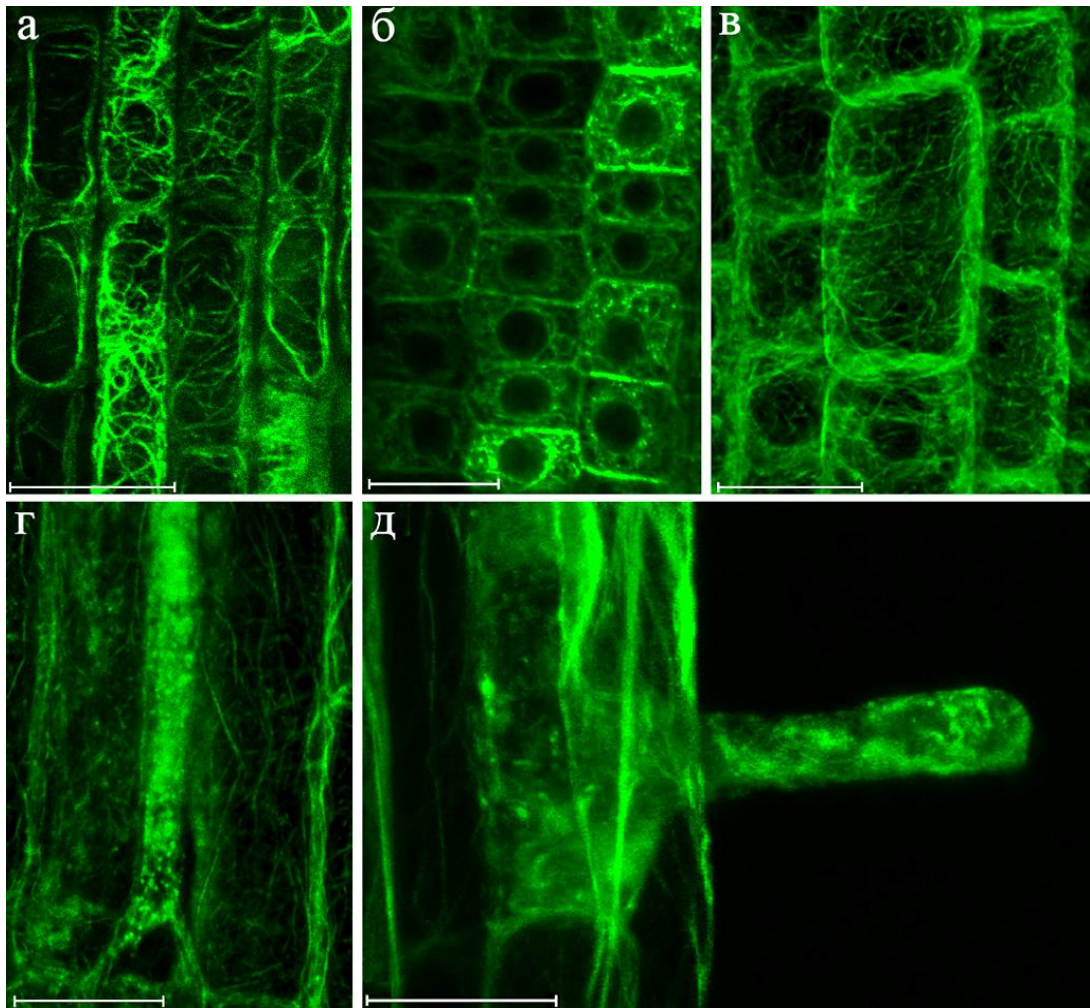


Рис. 6.2. Організація актинових філаментів у клітинах головних коренів проростків *A.thaliana* після 1 год експозиції при температурі +4°C: а – епідермальні клітини на рівні меристеми; б – клітини меристеми; в – епідермальних клітин на рівні перехідної зони; г, д – зона диференціації та кореневий волосок. Масштаб: 20 мкм

Більш виражений вплив на організацію та орієнтацію актинових філаментів відмічався через 2 год експозиції при температурі +4°C. Так, в епідермальних клітинах на рівні меристеми невпорядкована мережа мікрофіламентів ставала ще більш розрідженою і в окремих клітинах можна

було спостерігати деполімеризацію даних структур (Рис. 6.3, а). Більш пошкоджуючий вплив даної температури торкнувся і клітин апікальної меристеми, в яких спостерігали добре виражену невпорядкованість мікрофіламентів, а в окремих клітинах вони взагалі не візуалізувались, що свідчить про їх руйнування і повну деполімеризацію в даній області (Рис. 6.3, б).

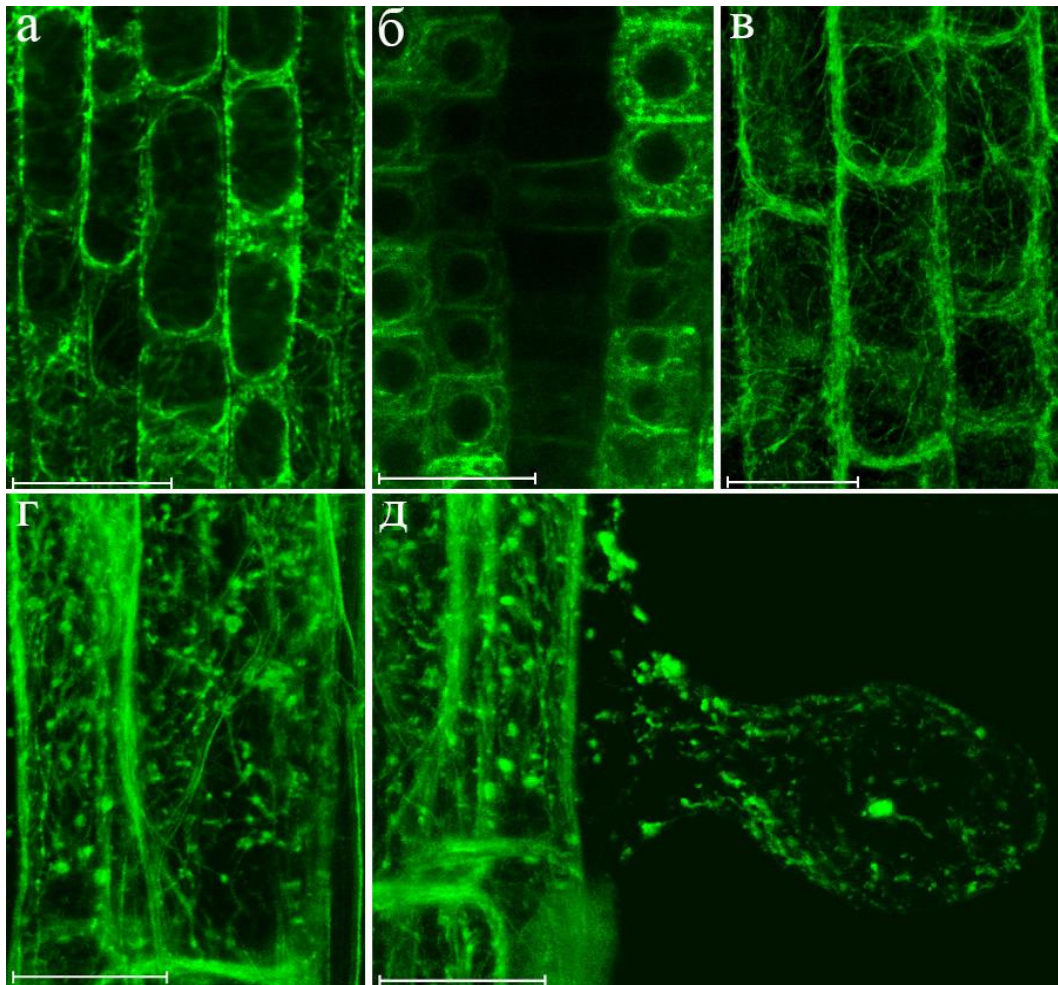


Рис. 6.3. Організація актинових філаментів у клітинах головних коренів проростків *A. thaliana* після 2 год впливу температури +4°C: а – епідермальні клітини на рівні меристеми; б – клітини меристеми; в – епідермальні клітини на рівні зони розтягу; г, д – зона диференціації та кореневий волосок. Масштаб: 20 мкм

В епідермальних клітинах на рівні перехідної зони та зони розтягу через 2 год обробки при температурі  $+4^{\circ}\text{C}$  спостерігали продовження розрідження актинової сітки, актинові філаменти були видимі як короткі тонкі пучки F-актину (Рис. 6.3, в). Особливо чутливими до впливу досліджуваної температури виявились клітини зони диференціації та кореневі волоски. Вже через 2 год при експозиції  $+4^{\circ}\text{C}$  в клітинах можна було спостерігати лише яскраво забарвлені точкові структури або короткі пучки F-актину (Рис. 6.2, г), що, можливо, і являється причиною змін морфології в даній області і може привести до порушення ініціювання росту і розвитку корневих волосків.

Таким чином, нами вперше продемонстровано негативний вплив низької позитивної температури на прижиттєву організацію мікрофіламентів (Рис. 6.2, 6.3) в різних типах клітин головного кореня проростків *A.thaliana* (лінія GFP-ABD2-GFP), що, на нашу думку, може бути однією з головних причин інгібування росту головних коренів (Табл. 5.2), а також змін їх морфології (Рис. 5.3, 5.4). Найбільш чутливими до впливу температури  $+4^{\circ}\text{C}$  виявились клітини апікальної меристеми та зони диференціації (кореневі волоски), менш чутливими – клітини перехідної зони та зони розтягу. Отриманні нами дані узгоджуються з іншими дослідженнями, в яких також спостерігали деполімеризацію цитоскелетних структур через короткі інтервали часу після впливу холоду на рослини, наприклад, у клітинах ріпаку (*B. napus*) та люцерни (*M. sativa*) [173, 199]. Раніше було показано, що в цитоплазмі пилкових трубок тютюну (*N. tabacum*) мікрофіламенти залишались непошкодженими після впливу температури  $+4^{\circ}\text{C}$ , в той час як мікротрубочки при таких умовах майже повністю руйнувались [9]. Зміни організації актинових філаментів під дією холоду спостерігались в пилковому зерні у груші (*Pyrus pyrifolia*) з подальшим звільненням цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  [252].

Функціонування актинових філаментів залежить від балансу між G- і F-актином, а також зв'язаних з ними білків. Профілін і актин-деполімеризуючий фактор (ADF) є двома з найбільш широко експресуючих

типів актин-зв'язуючих білків [69]. Індукція активації білка ADF під час акліматизації до холоду призводить до підвищеної толерантності до заморозків у пшениці [175]. Ці дані свідчать, про те, що білок ADF необхідний для переорієнтації цитоскелета, яка спостерігається під час низькотемпературної експозиції. Таке ремоделювання може бути важливим фактором для посилення толерантності до низьких температур. Однак, молекулярні механізми впливу низької температури на структурну реорієнтацію актинових філаментів є малодослідженими і потребують подальшого вивчення.

### **6.3. Вплив температури +0,5°C на організацію актинових філаментів в різних типах клітин кореня проростків *A. thaliana***

Наступним етапом дослідження було з'ясування особливостей впливу низької температури (+0,5°C) на організацію мікрофіламентів в різних типів клітин кореня і порівняти дані з вище наведеними. 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 неупорядкованими тяжами (Рис. 6.4, а). В той же час через 1 год обробки в температурному режимі +0,5°C в клітинах апікальної меристеми спостерігали більш тонку рідку сітку актинових філаментів і її часткову деполімеризацію (Рис. 6.4, б). У епідермальних клітинах на рівні перехідної зони і зони розтягу після обробки холодом мікрофіламенти формують сітку з більш вираженою поперечною орієнтацією в порівнянні з вихідною неупорядкованою організацією (Рис. 6.4, в). Було виявлено, що дуже чутливими до низької температури є клітини зони диференціації, а саме кореневі волоски. В трихобластах і атрихобластах зберігалась переважно вихідна організація мікрофіламентів, проте в деяких корневих волосках зустрічалась також змінена вихідна організація, з незначною деполімеризацією даних структур (Рис. 6.4, г).



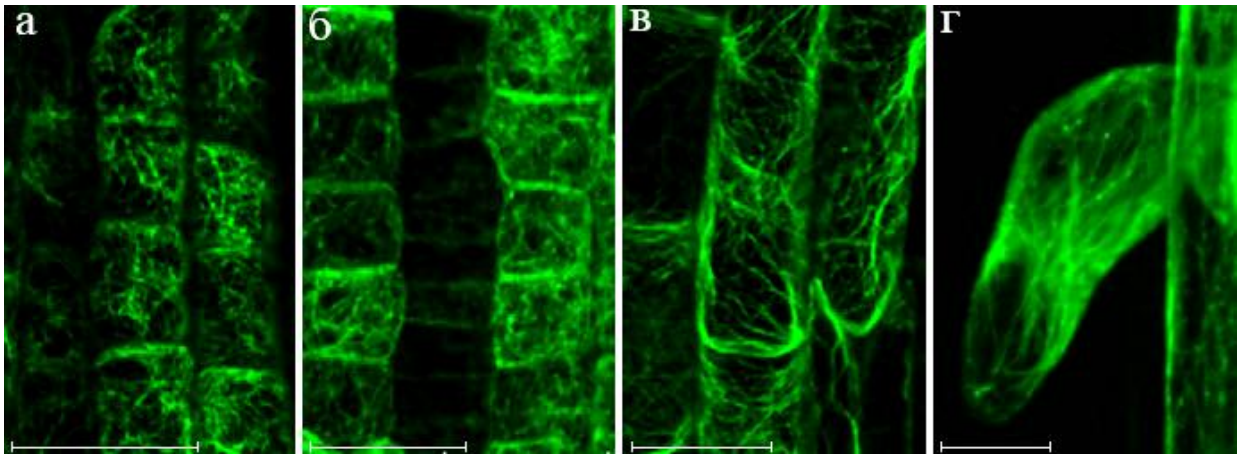


Рис. 6.4. Організація актинових філаментів у клітинах головних коренів проростків *A.thaliana* після 1 год впливу температури  $+0,5^{\circ}\text{C}$ : а – епідермальні клітини на рівні меристеми; б – клітини меристеми; в – епідермальні клітини на рівні зони розтягу; г – кореневий волосок. Масштаб: 20 мкм

Ще більш серйозніші зміни в організації актинових філаментів відмічались після 2 год обробки при температурі  $+0,5^{\circ}\text{C}$ . Зокрема, в клітинах епідермісу на рівні меристеми (Рис. 6.5, а) спостерігали майже повну деполімеризацію мікрофіламентів, при одночасній ретракції цитоплазми клітин, що вказує на сильний стрес викликаний дією холоду. Драматичні 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. 6.5, б). Сильна деполімеризація актинових філаментів була зафіксована в клітинах епідермісу на рівні зони розтягу, одночасно спостерігалось посилення неупорядкованості мікрофіламентів з частковою і повною їх деполімеризацією в деяких клітинах (Рис. 6.5, в), що, можливо, є причиною порушення морфології кореня в даній області. В трихобластах і атрихобластах 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 (Рис. 6.5, г), що може привести до порушення ініціювання росту і розвитку корневих волосків.

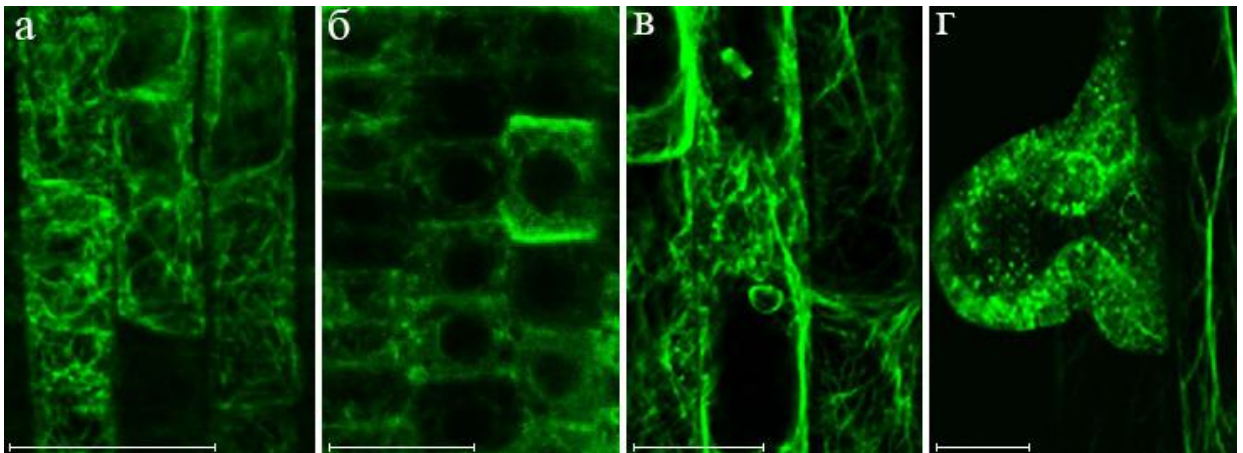


Рис. 6.5. Організація актинових філаментів у клітинах головних коренів проростків *A.thaliana* після 2 год обробки при температурі  $+0,5^{\circ}\text{C}$ : а – епідермальні клітини на рівні меристеми; б – клітини меристеми; в – епідермальні клітини на рівні зони розтягу; г – кореневий волосок. Масштаб: 20 мкм

Таким чином, нами вперше проведена візуалізація прижиттєвої організації актинових філаментів під впливом температури  $+0,5^{\circ}\text{C}$  (Рис. 6.4-6.5). Найбільш чутливими до дії даної температури виявились мікрофіламенти зони розтягу та кореневі волоски, найменш чутливими – актинові філаменти в клітинах епідермісу зони меристеми.

Вплив низьких температур на організацію актинових філаментів в клітинах рослин залишається малодослідженим. Раніше при вивченні дії холодового фактора на мікрофіламенти рослинної клітини було встановлено, що експозиція культури клітин ВУ-2 (*N. tabacum*) при  $0^{\circ}\text{C}$  протягом 5 хв приводила до зникнення радіальних тяжів мікрофіламентів, а через 20 хв – до формування неупорядкованої мережі товстих і розгалужених структур. Ця мережа ставала більш розрідженою через 6 год холодової обробки, а через 12 год в оброблених холодом клітках спостерігали точкові тяжі або окремі

скупчення актину по периферії клітини і навколо її ядра [184]. У клітинах культури озимого ріпаку під дією низьких температур порушувалася актинова сітка і мікрофіламенти деполімеризувались [65].

Отримані нами дані дозволяють припустити, що виявлені порушення орієнтації актинових філаментів є однією з причин зміни морфології і росту коренів в умовах холодного стресу. Результати наших досліджень демонструють, що актинові філаменти є потенційною мішенню для впливу холоду в рослинних клітинах. Тому подальше з'ясування закономірностей впливу низьких температур на актиновий цитоскелет рослинної клітини матиме вкрай важливе значення для розуміння механізмів дії цього абіотичного фактору на рослинний організм в цілому і сприяти створенню практичних підходів для пошуку шляхів зменшення негативного впливу холоду на рослину.

#### **6.4. Комбінований вплив донора/скавенджера NO (SNP/cPTIO) та низьких температур на організацію актинових філаментів в різних типах клітин головного кореня проростків *A. thaliana***

В результаті досліджень, проведених за допомогою конфокальної мікроскопії, було виявлено зміни нативної організації актинових філаментів в різних зонах головного кореня проростків *A. thaliana* після впливу низьких температур. Після комбінованого впливу температури +4°C та екзогенного донора NO 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. 6.6, а). Тоді, як в клітинах меристеми після впливу температури +4°C відбувається часткова деполімеризація мікрофіламентів, комбінований вплив низької температури і донора призводить до відновлення сітки актинових філаментів в цих клітинах. Спостерігається зменшення клітин з частковою і повною

деполімеризацією, мікрофіламенти знову починають закручуватись і скупчуватись, утворюючи сітку навколо ядра клітини (Рис. 6.6, б).

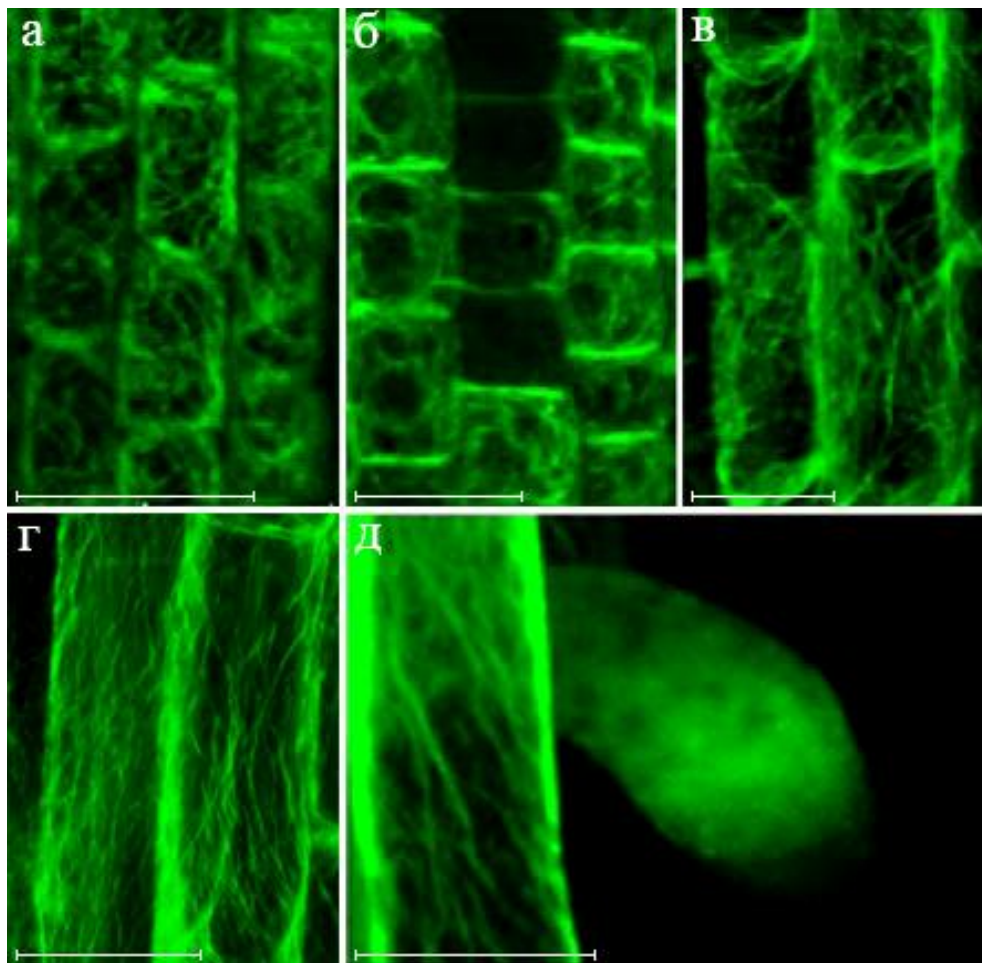


Рис. 6.6. Вплив низької температури ( $+4^{\circ}\text{C}$ ) та екзогенного донора NO SNP (100 мкМ) на організацію актинових філаментів головного кореня проростків *A. thaliana*: а – епідермальні клітини на рівні меристеми; б – клітини меристеми; в – епідермальні клітини на рівні зони розтягу; г, д – зона диференціації та кореневий волосок. Масштаб: 20 мкм

Після комбінованого впливу донора і температури  $+4^{\circ}\text{C}$  в епідермальних клітинах на рівні зони розтягу скупчення ниток в товсті пучки не спостерігається, а відбувається їх дезорієнтація і реорієнтація у порівнянні з контрольними зразками (Рис. 6.6, в). Після обробки коренів лише холодом в клітинах зони диференціації спостерігається розрідження актинової сітки,

візуалізуються лише яскраво забарвлені точкові структури або короткі пучки F-актину. Комбінована дія температури  $+4^{\circ}\text{C}$  та нітропрусиду натрію в концентрації 100 мкМ призводить до появи дещо іншої картини: в клітинах зони диференціації та корневих волосках актинові філаменти скупчуються і заповнюють весь об'єм клітини, візуалізуються у вигляді сітчастої структури (Рис. 6.6, г, д).

Комбінований вплив температури  $+0,5^{\circ}\text{C}$  та екзогенного донора NO SNP (100 мкМ) також призводить до часткового відновлення сітки мікрофіламентів, але в меншій мірі, що пов'язано із зниженням температури. В епідермальних клітинах на рівні меристеми та в клітинах власне меристеми можна спостерігати скупчення ниток в пучки, їх дезорієнтацію і реорієнтацію у порівнянні з контрольними зразками (Рис. 6.7, а, б). В клітинах епідермісу на рівні зони розтягу після впливу холоду відбувається деполімеризація мікрофіламентів. Після комбінованої дії температури  $+0,5^{\circ}\text{C}$  та нітропрусиду натрію в концентрації 100 мкМ спостерігається дещо інша картина: актинові філаменти у вигляді тонкої сітчастої структури заповнюють весь об'єм клітин (Рис. 6.7, в).

Найбільш негативний ефект низької температури був виявлений в клітинах диференціації. Після комбінованої дії температури  $+0,5^{\circ}\text{C}$  з екзогенним донором NO SNP (100 мкМ) відбувається відновлення і стабілізація мікрофіламентів. У цьому випадку вони представлені у вигляді тонких тяжів, яким в основному притаманна поздовжня орієнтація. В клітинах корневих волосків повна деполімеризація актинових філаментів не спостерігається, при цьому можна спостерігати залишки F-актину по периферії клітин, що також свідчить про початковий етап відновлення актинового цитоскелету (Рис. 6.7, г, д).

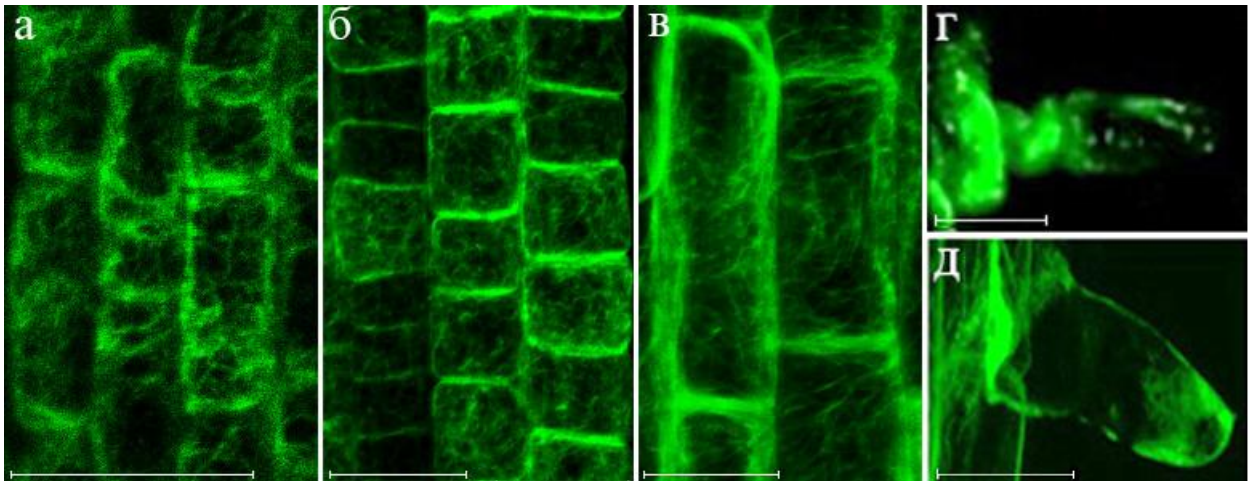


Рис. 6.7. Вплив низької температури ( $+0,5^{\circ}\text{C}$ ) та екзогенного донора NO SNP (100 мкМ) на організацію актинових філаментів головного кореня проростків *A. thaliana*: а – епідермальні клітини на рівні меристеми; б – клітини меристеми; в – епідермальні клітини на рівні зони розтягу; г, д – кореневі волоски. Масштаб: 20 мкм

Зміни вихідної організації актинових філаментів в різних зонах головного кореня проростків *A. thaliana* також відбувались і після обробки коренів скавенджером NO, однак вони носили інший характер. Так, після попередньої обробки сРТЮ в концентрації 100 мкМ в клітинах епідермісу на рівні меристеми актинові філаменти набували неупорядкованої організації одночасно з їх частковою деполімеризацією та фрагментацією. Після комбінованого впливу холоду ( $+4^{\circ}\text{C}$ ,  $+0,5^{\circ}\text{C}$ ) та скавенджера NO сРТЮ (100 мкМ) мікрофіламенти в епідермальних клітинах і власне клітинах меристеми не візуалізувались взагалі, що свідчить про їх руйнування і повну деполімеризацію в даній області (Рис. 6.8, а, б). Як і в епідермальних клітинах на рівні меристеми, так і в клітинах епідермісу на рівні зони розтягу головного кореня *A. thaliana* актинові філаменти являють собою систему довгих пучків мікрофіламентних структур, рівномірно розташованих в середині клітини. Після обробки сРТЮ в концентрації 100 мкМ актинова сітка розріджувалася і частково деполімеризувалась. Після комбінованого

впливу низьких температур та сРТЮ (100 мкМ) відбувалась деполімеризація актинової сітки, лише в окремих клітинах можна було спостерігати довгі поодинокі тяжі мікрофіламентів (Рис. 6.8, в).

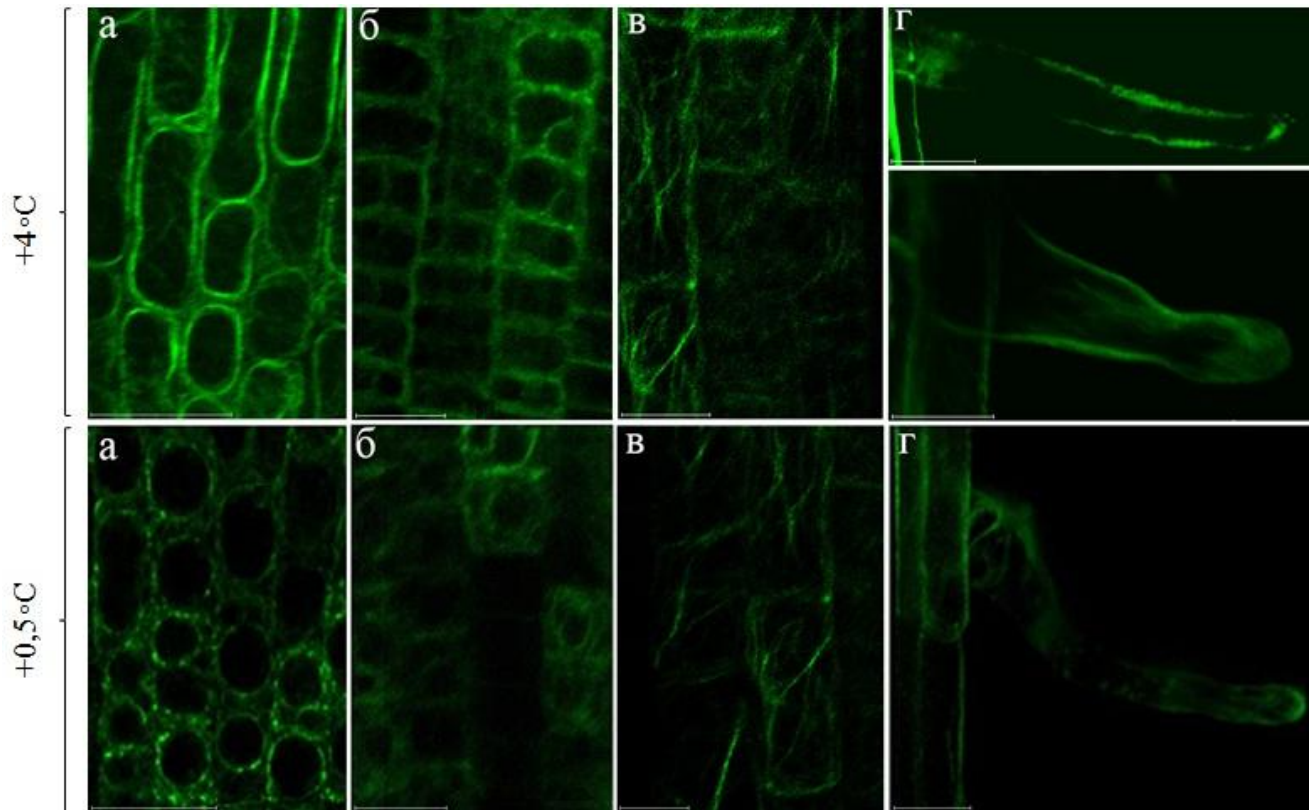


Рис. 6.8. Вплив низьких температур (+4°C, +0,5°C) та скавенджера NO сРТЮ (100 мкМ) на організацію актинових філаментів головного кореня проростків *A. thaliana*: а – епідермальні клітини на рівні меристеми; б – клітини меристеми; в – епідермальні клітини на рівні зони розтягу; г – кореневі волоски. Масштаб: 20 мкм

В клітинах корневих волосків комбінована дія холоду (+4°C, +0,5°C) і скавенджера NO сРТЮ в концентрації 100 мкМ призводила до більш сильних змін, що супроводжувалось руйнуванням актинових філаментів. Лише на периферії клітини можна було спостерігати короткі точкові структури F-актину (Рис. 6.8, г).

Раніше було показано, що NO опосередковує реорганізацію мікротрубочок як 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 головного кореня проростків *A. thaliana* [128]. В онтогенезі рослин NO залучається у реакціях відповіді на стресові фактори різної природи, але найбільш важливо, що NO є незамінним учасником реалізації фізіологічних програм також і при відсутності впливу стресових факторів.

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 (сРТІО) оксиду азоту. Холодовий сигнал може передаватись на актинові філаменти за допомогою NO, викликаючи зміни їх організації та орієнтації залежно від рівня температури. Таким чином, взаємозв'язок між низькими температурами, NO та актиновими філаментами полягає в залученні їх до загального внутрішньоклітинного сигнального каскаду, що регулює відповідь клітин на вплив факторів зовнішнього середовища.

Результати проведених досліджень опубліковані у роботах [182, 183, 271, 272].



**РОЗДІЛ 7**  
**УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ВПЛИВУ НИЗЬКИХ**  
**ТЕМПЕРАТУР ТА ЕКЗОГЕННОГО NO НА ОРІЄНТАЦІЮ**  
**МІКРОФІЛАМЕНТІВ В КЛІТИНАХ КОРЕНЯ *A. THALIANA* ЗА**  
**ДОПОМОГОЮ ПРОГРАМНОГО ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ**

**7.1. Визначення основних закономірностей орієнтації актинових філаментів в різних типах клітин кореня проростків *A. thaliana***

Візуалізація ниткоподібних структур клітини, таких як цитоскелетні структури або мікрОВОлокна целюлози, здійснюється, головним чином, за допомогою аналізу мікроскопічних зображень. Однак, щоб зв'язати певні закономірності організації таких структур з конкретними клітинними функціями, необхідно описати зображення з високою точністю, без всяких похибок. Зростаючий інтерес до комп'ютерного моделювання є лише частиною системного підходу, який в даний час широко використовується для вирішення різних біологічних проблем [258, 64]. Застосування методів візуальної інтерпретації і ручних вимірювань [221, 243, 195], які використовуються в даний час, значною мірою залежить від помилок, що може бути пов'язано з об'єктивністю дослідника, який виконує вимірювання. Крім того, такі аналізи дуже трудомісткі і займають багато часу. Для вирішення цих труднощів було розроблено пакет програмного забезпечення «MicroFilament Analyzer» (MFA). Це програмне забезпечення дозволяє зробити великомасштабний аналіз експериментального матеріалу, який виконується в більш стандартизований, повторюваний і швидкий спосіб. Програма MFA призначена для детекції ниткоподібних структур на цифрових зображеннях і визначає одну або декілька основних їх орієнтацій [89, 233].

Програмне забезпечення MFA з високою точністю дозволяє аналізувати і визначати орієнтацію таких фібрилярних структур, як актинові

філаменти, на цифрових знімках в більш стандартизований, об'єктивний і повторювальний спосіб [100, 101]). Зручна і діюча програма MFA знаходиться у вільному доступі на сайті <http://www.ua.ac.be/bimef/MFA>. Вона працює в простому для вживання інтерфейсі і включає в себе ряд властивостей:

- функції вирівнювання і сканування;
- інструмент вибору «чарівна паличка»;
- обробка Z-стека та контрастування;
- розрахунок площі та периметру;
- спеціальний блок детектування ниткоподібних структур;
- пост аналіз і відображення результатів;
- виявлення основної орієнтації структур, що аналізуються;
- функція збереження і експортування даних.

Вкладки, що відображаються у вікні інтерфейсу допомагають користувачеві направити процедуру обробки результатів роботи в правильне русло.

Для аналізу конфокального зображення за допомогою програми MFA необхідно мати два файли: зріз зображення (на якому добре видно контури клітини) і зображення Z-стека, що накладаються один на одного (Рис. 7.1, а). Далі потрібно визначити контур клітини, що можна здійснити автоматично в програмі або вручну для виявлення фібрил всередині окремої клітини. На наступному етапі відбувається детекція (виявлення) актинових філаментів окремо в кожній вибраній клітині (Рис. 7.1, б). Отриманні результати інтерпретуються у вигляді віртуальної сітки в градусах. Лінії віртуальної сітки знаходяться в горизонтальному положенні в початковому зображенні, і визначені ниткоподібні структури, що лежать поверх будуть мати таку ж орієнтацію, як лінії віртуальної сітки. Користувач програми аналізує і визначає кут (направлення) розташування мікрофіламентів, що коливається в межах від  $0^\circ$  до  $360^\circ$  на кожному кроці.

Для зручності віртуальну сітку поділяють на чотири категорії для виявлення основної орієнтації(й) всередині клітини. Перша категорія – це клітини, у яких актинові філаменти розміщуються на віртуальній сітці в діапазоні 80-100°, і їй присвоюється поперечна орієнтація по відношенню до повздовжньої осі клітини.

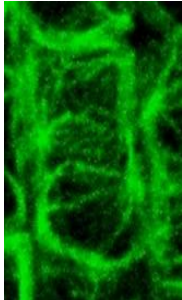
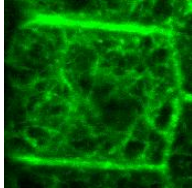
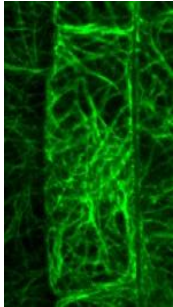
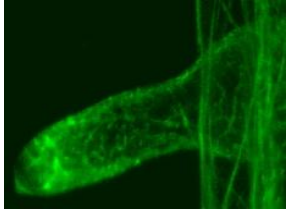
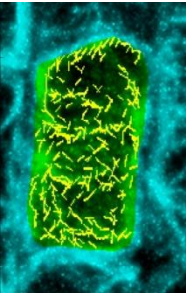
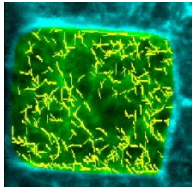
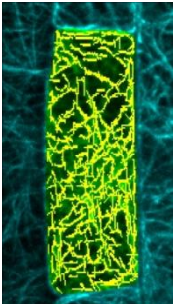
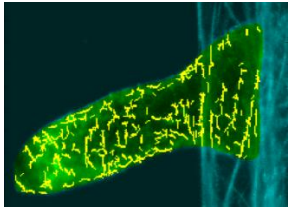
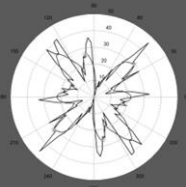
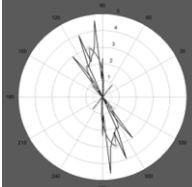
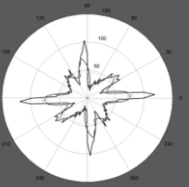
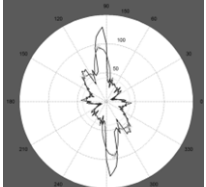
	Епідермальна клітина на рівні меристеми	Меристематична клітина	Епідермальна клітина на рівні зони розтягу	Кореневий волосок (зона диференціації)
<b>а)</b> Тривимірне зображення актинових філаментів у клітині в реальному часі				
<b>б)</b> Детекція актинових ниток всередині клітини за допомогою програми				
<b>в)</b> Лінеаризація орієнтації актинових філаментів за результатами MFA	 Невпорядкована	 Коса	 Невпорядкована	 Повздовжня

Рис. 7.1. Визначення основної орієнтації актинових філаментів в різних типах клітин кореня *A. thaliana* за допомогою програми MicroFilament Analyzer

Для наступної категорії клітин характерна поперечна орієнтація, в якій актинові філаменти розміщуються на віртуальній сітці в діапазоні  $170-10^\circ$ . Двом іншим категоріям клітин відповідають проміжні значення на віртуальній сітці, що лежать в діапазоні між  $10-80^\circ$  та  $100-170^\circ$  і їм присвоюється навскісна орієнтація мікрофіламентів в середині клітини. При наявності в клітині двох чи більше орієнтацій то їм присвоюється випадкова (хаотична) орієнтація. Після того, як число актинових філаментів і їх орієнтація в кожній клітині були виявлені, отримані дані можуть бути представлені у вигляді графічного зображення (Рис. 7.1, в). Візуальне представлення виявлених мікрофіламентів на зображенні Z-стека зберігається, і числові дані експортуються в автоматично створену таблицю у форматі \*.xls, що містить в собі виявлені параметри клітини, число актинових філаментів на кут в клітині, а також їх домінуючу орієнтацію.

## **7.2. Визначення орієнтації актинових філаментів в клітинах головного кореня проростків *A. thaliana* після комбінованого впливу низьких температур та донора/скавенджера NO (SNP/cPTIO)**

Раніше було показано використання програми MFA для аналізу організації актинових філаментів в епідермальних клітинах на рівні зони розтягу кореня *A. thaliana* на різних стадіях його розвитку [101]. Було встановлено, що F-актин організовується в основному випадковим чином. У міру витягування клітини в зоні розтягу актинові філаменти в першу чергу набувають поздовжньої орієнтації, яка також зберігається в найбільших клітинах в зоні диференціації. В процесі розвитку від молодих до старих клітин спостерігається приблизно рівномірний розподіл поперечних, косих або комбінованих орієнтацій, крім перехідних зон, де в основному спостерігається випадкова і повздовжня орієнтація мікрофіламентів.

За допомогою програми MFA нами було визначено основну орієнтацію актинових філаментів в різних типах клітин кореня проростків *A. thaliana*

після їх експозиції при низьких температурах ( $+4^{\circ}\text{C}$ ;  $+0,5^{\circ}\text{C}$ ). В результаті проведеного аналізу нами було встановлено, що під дією холоду в клітинах епідерми орієнтація мікрофіламентів з часом поступово змінювалася з випадкової на повздовжню, а в клітинах меристеми та перехідної зони – з випадкової на переважно поперечну. В клітинах зони розтягу після впливу понижених температур орієнтація актинових філаментів змінювалась з хаотичної на переважно повздовжню. В корневих волосках, в основному зберігалася повздовжня та коса орієнтація по відношенню до осі кореня (Рис. 7.2).

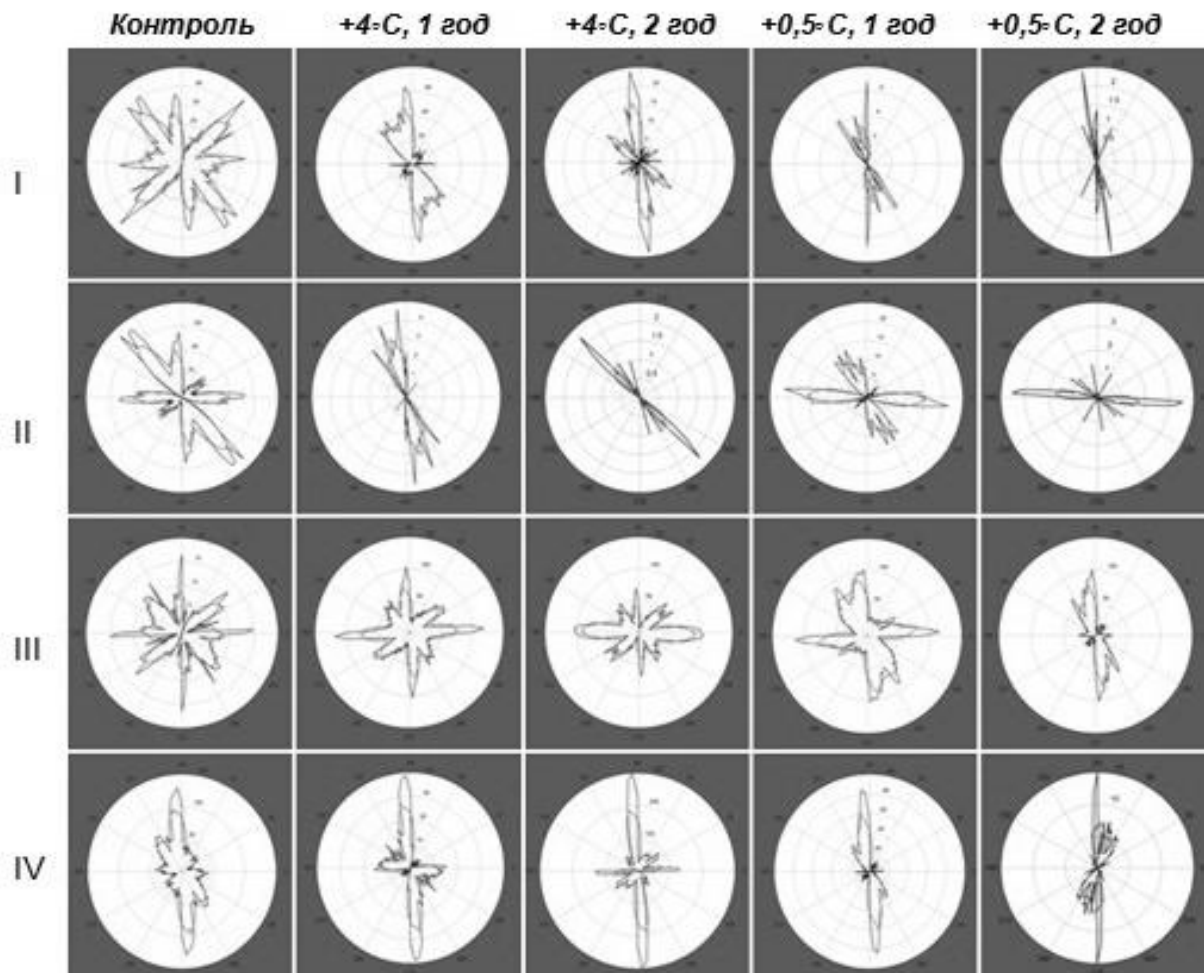


Рис. 7.2. Результати аналізу орієнтації актинових філаментів за допомогою програми MFA в різних типах клітин кореня проростків *A. thaliana* після впливу низьких температур: I – епідермальні клітини на рівні меристеми; II – клітини меристеми; III – зона розтягу; IV – кореневі волоски

За допомогою програми MFA нами було встановлено, що після комбінованої дії температури  $+0,5^{\circ}\text{C}$  та скавенджера NO cPTIO в концентрації 100 мкМ в клітинах епідерми на рівні меристеми орієнтація актинових філаментів з часом поступово змінювалась 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. 7.3, I).

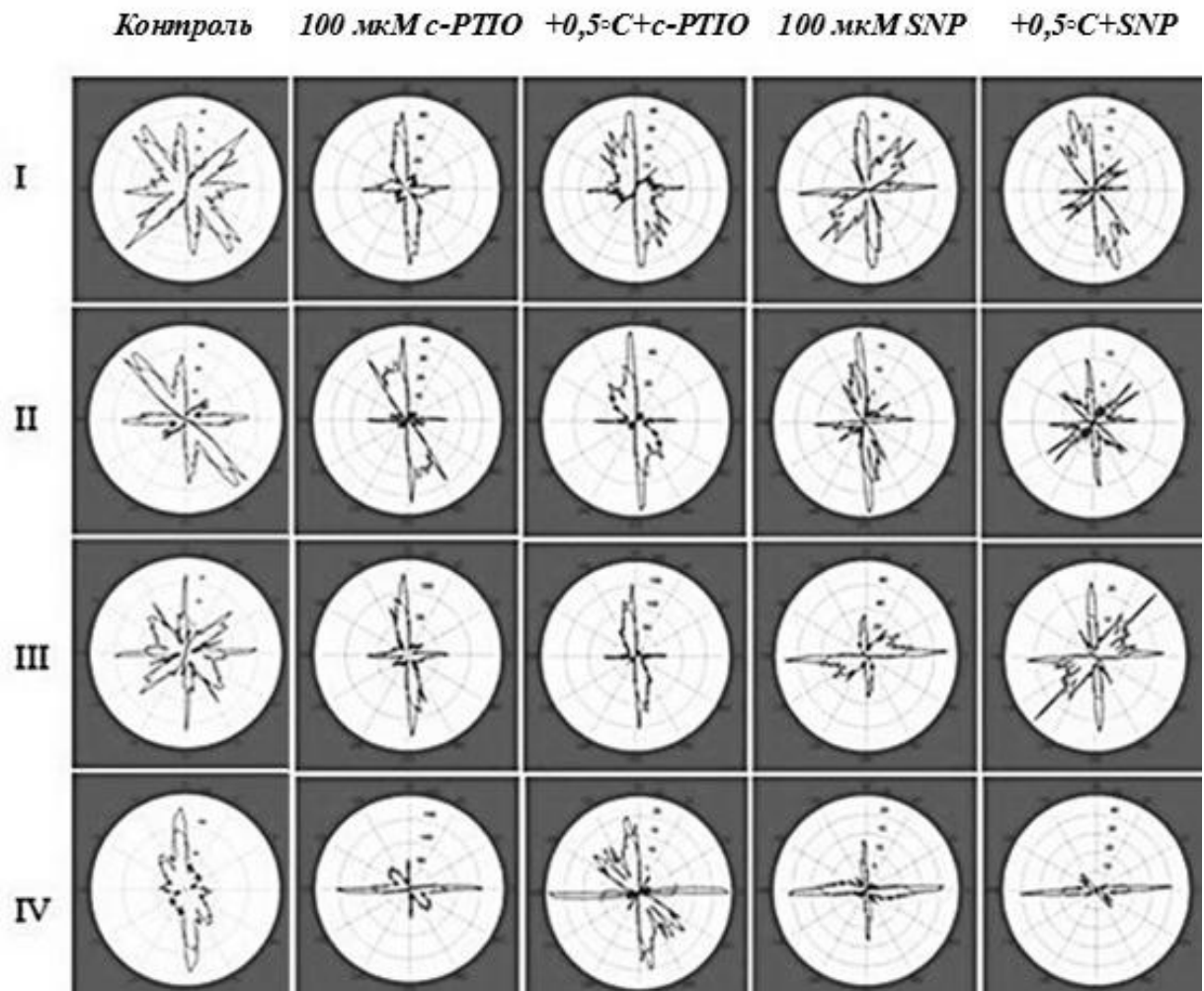


Рис. 7.3. Результати аналізу орієнтації актинових філаментів за допомогою програми MFA в різних типах клітин кореня *A. thaliana* після комбінованого впливу температури  $+0,5^{\circ}\text{C}$  (1 год) та донора/скавенджера NO (SNP/cPTIO): I – епідермальні клітини на рівні меристеми; II – клітини меристеми; III – зона розтягу; IV – кореневі волоски

В клітинах меристеми та перехідної зони після комбінованої дії температури  $+0,5^{\circ}\text{C}$  та сРТЮ (100 мкМ) відбувався перехід від випадкової до переважно повздовжньої орієнтації, а після комбіновано впливу холоду і SNP (100 мкМ) зберігалась випадкова організація актинових філаментів (Рис. 7.3, II). В клітинах зони розтягу після комбінованого впливу температури  $+0,5^{\circ}\text{C}$  та скавенджера NO сРТЮ в концентрації 100 мкМ напрямок орієнтації мікрофіламентів змінювався від хаотичного на переважно повздовжній, який зберігався також і після комбінованого впливу холоду та донора NO SNP в концентрації 100 мкМ (Рис. 7.3, III). В корневих волосках після комбінованої дії температури  $+5^{\circ}\text{C}$  та сРТЮ (100 мкМ) повздовжня орієнтація змінювалась на наскісну, а після комбіновано впливу холоду і SNP (100 мкМ) зберігалась поперечна орієнтація мікрофіламентів по відношенню до основної осі кореня (Рис. 7.3, IV).

Також нами було встановлено, що зміни нативної орієнтації мікрофіламентів відбуваються після комбінованого впливу температури  $+4^{\circ}\text{C}$  та донора/скавенджера NO (SNP/сРТЮ). Було виявлено, що після комбінованої дії температури  $+4^{\circ}\text{C}$  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  $+4^{\circ}\text{C}$  та скавенджера NO сРТЮ в концентрації 100 мкМ зберігаються поодинокі пучки F-актину з хаотичною орієнтацією (Рис. 7.4, I). В клітинах меристеми орієнтація актинових філаментів після комбінованого впливу холоду ( $+4^{\circ}\text{C}$ ) та донора NO (SNP) змінювалась з випадкової на переважно повздовжню, а комбінована дія холоду ( $+4^{\circ}\text{C}$ ) та скавенджера NO (сРТЮ) призводила до переорієнтації актинових філаментів, які набували в основному косої орієнтації (Рис. 7.4, II). В клітинах зони розтягу після комбінованого впливу температури  $+4^{\circ}\text{C}$  та донора NO SNP (100 мкМ) напрямок орієнтації актинових філаментів змінювався від хаотичного на переважно поперечний, а після комбінованого впливу температури  $+4^{\circ}\text{C}$  та скавенджера NO сРТЮ (100 мкМ) в клітинах

зберігалась хаотична орієнтація мікрофіламентів (Рис. 7.4, III). В клітинах зони диференціації кореня, зокрема в корневих волосках, повздовжня орієнтація актинових філаментів зберігалась після комбінованої дії холоду ( $+4^{\circ}\text{C}$ ) та донора NO SNP в концентрації 100 мкМ, а при комбінованій дії температури  $+4^{\circ}\text{C}$  та скавенджера NO cPTIO в концентрації 100 мкМ відбувалась реорієнтація мікрофіламентів, які при цьому набували в основному повздовжньої та косої орієнтації по відношенню до основної осі кореня (Рис. 7.4, IV).

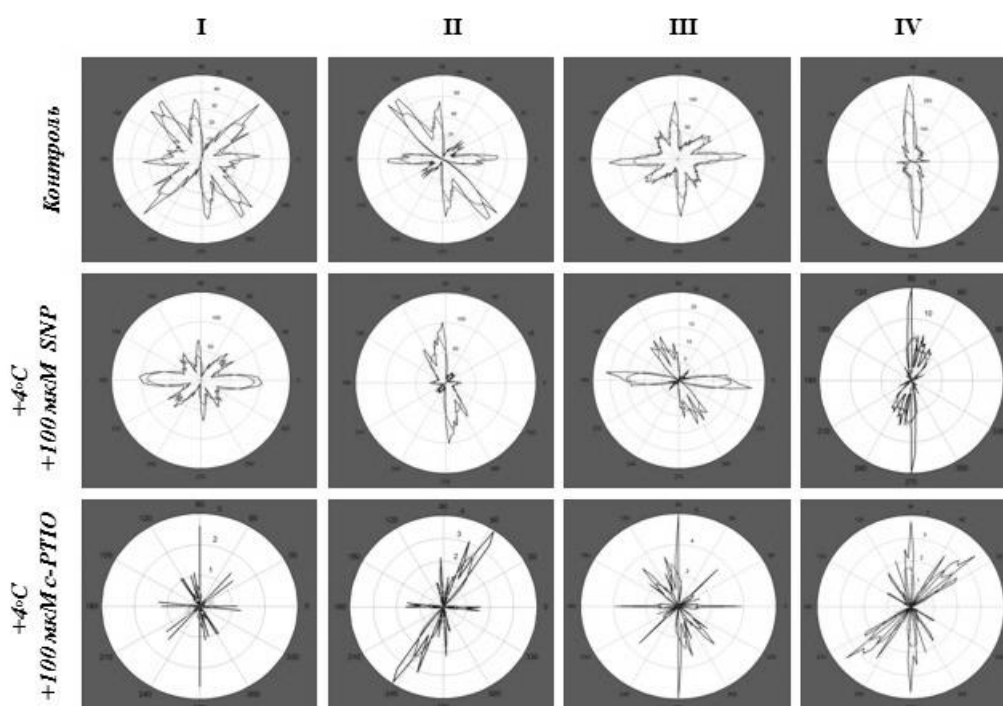


Рис. 7.4. Результати аналізу орієнтації актинових філаментів за допомогою програми MFA в різних типах клітин кореня *A. thaliana* після комбінованого впливу температури  $+4^{\circ}\text{C}$  (1 год) та донора/скавенджера NO (SNP/cPTIO): I – епідермальні клітини на рівні меристеми; II – клітини меристеми; III – зона розтягу; IV – кореневі волоски

Таким чином, за допомогою програмного забезпечення MFA, нами вперше було встановлено, що під впливом холоду та комбінованого впливу змін концентрації ендogenous NO, індукованих дією донора (SNP) і



скавенджера (сРТЮ) 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. Як вже згадувалося вище, раніше за допомогою програми MFA було також проведено аналіз організації мікротрубочок в епідермальних клітинах на рівні зони розтягу кореня проростків *A. thaliana* під час гравістимуляції. Результати цього аналізу свідчать про чіткий ефект дії гравістимулу на орієнтацію мікротрубочок, зокрема, її різницю в клітинах, розміщених по різні боки згину кореня [100]).

Нами вперше було використано програмне забезпечення MFA для дослідження орієнтації актинових філаментів в середині клітини після впливу холодowego фактору та комбінованого впливу донора/скавенджера NO і виявлено, що дана програма є зручним інструментом, який стандартизує обробку складних зображень і доповнює наші дані щодо змін організації мікрофіламентів під час впливу низьких температур в живих клітинах.

Результати проведених досліджень опубліковані у роботі [183, 271].

## УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

У дисертаційній роботі наведено нові результати щодо з'ясування клітинно-біологічних механізмів впливу низьких температур на ріст та морфогенез коренів рослин. Очевидно, що гальмування росту первинних коренів є результатом негативного впливу низької температури на видовження кореня і, відповідно, на поділ клітин, що може бути пов'язано з порушенням організації їх цитоскелету, зокрема актинових філаментів. Вперше проведено дослідження особливостей просторової організації актинових філаментів в різних типах клітин всіх функціональних зон первинного кореня проростків *A. thaliana* після впливу низьких температур ( $+4^{\circ}\text{C}$  та  $+0,5^{\circ}\text{C}$ ), що пов'язано у часі із змінами показників росту та морфології кореня. Особливий інтерес на нинішньому етапі досліджень становить з'ясування механізмів сигналінгу оксиду азоту – універсального вторинного посередника в клітинах еукаріотичних організмів за участю цитоскелету, оскільки NO залучений до відповіді рослин на дію різних абіотичних факторів, зокрема, холоду.

У результаті проведених досліджень встановлено, що процеси росту і диференціації головних коренів рослин є надзвичайно чутливими до впливу температур  $+4^{\circ}\text{C}$  та  $+0,5^{\circ}\text{C}$ . За умов експозиції при обробці  $+4^{\circ}\text{C}$  через 24 год інтенсивність росту головного кореня зменшувалась приблизно в 2,8 рази, через 48 год – в 3,1 рази, а через 72 год – в 3,6 рази в порівнянні з контрольними проростками. Зі зниженням температури до  $+0,5^{\circ}\text{C}$  збільшується інгібуючий ефект холодого фактору на параметри росту коренів *A. thaliana*. Так, через 24 год інтенсивність росту коренів зменшувалась в 3 рази, через 48 год – в 3,2 рази, а через 72 год – в 4 рази (Рис. 5.2). Експозиція коренів *A. thaliana* при таких низьких температурах приводила до значних порушень морфології первинного кореня. Зокрема, обробка температурою  $+4^{\circ}\text{C}$  ініціює деформацію кореневого апексу, укорочення зони росту, а також розбухання і формування деформованих

корневих волосків в безпосередній близькості від меристематичної зони кореня. При цих же умовах спостерігається поява великої кількості корневих волосків з порушеною морфологією в зоні диференціації (Рис. 5.3). Крім того, нами виявлено, що обробка коренів *A. thaliana* температурою  $+0,5^{\circ}\text{C}$  призводить до дещо іншого ефекту, що проявляється в анізотропному збільшенні діаметру епідермальних клітин на рівні перехідної зони та зони розтягу (свелінг) (Рис. 5.5). Розмір свелінгових деформацій за умов експозиції при температурі  $+4^{\circ}\text{C}$  сягав найвищих показників в зоні диференціації кореня, а саме в корневих волосках і мав прямопропорційну залежність від тривалості дії низької температури. При дії температури  $+0,5^{\circ}\text{C}$  розмір свелінгових деформацій досягав найвищих показників в епідермальних клітинах зони розтягу кореня (Рис. 5.4, Рис. 5.6).

У рослин, які піддавались дії холодового стресу, проявляються різні фенотипічні симптоми, що включають: зниження швидкості росту, вкорочення листкової пластинки [214, 194], в'янення, пригнічення кушіння [12], пожовтіння листя (хлороз) [256], а також може призводити до смерті тканин (некроз) [105, 193]. Холодовий стрес також сильно впливає на репродуктивний розвиток рослин, що характеризується поганою схожістю насіння, зниженням розвитку стручків у чутливих видів і може призводити до стерильності пилку, що є одним з ключових факторів, відповідальних за скорочення врожаю сільськогосподарських культур [223, 129].

Відомо, що при дії різних абіотичних стресових факторів, зокрема, пораненні рослини, озонуванні, гіпоксії, впливі високих та низьких температур, УФ-В, важких металів зростає внутрішньоклітинна концентрація ендогенного оксиду азоту [165, 23, 128]. Оскільки відомо, що внутрішньоклітинний вміст NO зростає при дії на рослини низьких температур, важливим було вивчення комбінованого впливу змін внутрішньоклітинного вмісту NO під впливом модуляторів його вмісту та холоду на ріст, морфологію коренів та прижиттєву організацію актинових філаментів в різних типах клітин кореня *A. thaliana*.

Виявилось, що при комбінованій дії холоду та екзогенного донора NO SNP в концентрації 100 мкМ відбувається часткове стимулювання росту головних коренів порівняно з коренями, що піддавались холодовому стресу. Окрім позитивного впливу на ріст головних коренів проростків *A. thaliana*, обробка SNP в концентрації 100 мкМ не спричиняє виражених змін в морфології коренів, лише проявляється в ініціації формування нових кореневих волосків в порівнянні з контрольними коренями. Після комбінованого впливу холоду і донора NO не спостерігається таких сильних пошкоджень, які мають місце при дії лише холодowego фактору. Одночасно зменшується кількість деформованих кореневих волосків з розбухлими клітинами в апікальній частині кореневого волоска (Рис. 5.8).

Зворотна картина спостерігається при комбінованій дії холоду та такого скавенджера NO, як сРТЮ. Так, на всіх часових проміжках після обробки сРТЮ в концентрації 100 мкМ спостерігається сповільнення росту коренів. Вже через 24 год після комбінованої дії холоду і сРТЮ активно формуються численні зачатки кореневих волосків з порушеною морфологією, для частини з яких характерна наявність розбухання, інші є розгалуженими або викривленими, їх подальший ріст припиняється (Рис. 5.8). До того ж відбувається збільшення діаметру епідермальних клітин на рівні перехідної зони та власне зони розтягу (свелінг). Іншими авторами також показано, що у присутності високої нефізіологічної концентрації сРТЮ (1 мМ) відбувається утворення зачатків кореневих волосків у *A. thaliana* без їх подальшого росту [140]. На прикладі томатів показано, що обробка донором NO (SNP) стимулює утворення і ріст бокових коренів, інгібуючи при цьому ріст головного кореня. При додаванні скавенджера NO (сРТЮ) виявлено локальне зменшення концентрації NO в примордіях бокових коренів томатів. Таким чином, можна зробити висновок, що NO як внутрішньоклітинний регулятор впливає на архітектуру кореневої системи, яка стає більш короткою та розгалуженою [49]. Зміни росту та морфології коренів *A. thaliana* внаслідок впливу низьких температур та комбінованої дії

холоду і використаних у роботі донора та скавенджера NO (SNP, cPTIO) підсумовані в таблиці 1.

Таблиця 8.1

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	↑	-	+	+	↑	-	-
cPTIO	↓	+	-	+	↓	+	+/-
+4°C + SNP	↑	+/-	+/-	+	↑	-	+/-
+4°C + cPTIO	↓	+	+	+	↓	+	+
+0,5°C + SNP	↑	+/-	+/-	+	↑	-	-
+0,5°C+cPTIO	↓	-	-	+	↓	+	+

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

Залежні від часу зміни приросту головних коренів, а також встановлені нами зміни їх морфології можуть бути пов'язані з безпосереднім впливом низьких температур на організацію та орієнтацію актинових філаментів. Нами вперше продемонстровано негативний вплив температури +4°C на прижиттєву організацію мікрофіламентів (Рис. 6.2-6.5) в різних типах клітин головного кореня проростків *A. thaliana*, що може бути причиною інгібування росту головних коренів, а також змін їх морфології. Найбільш чутливими до впливу температури +4°C виявились клітини

апикальної меристеми та зони диференціації (кореневі волоски), менш чутливими – клітини на рівні перехідної зони та зони розтягу. Найбільш чутливими до дії температури  $+0,5^{\circ}\text{C}$  виявились клітини зони розтягу та кореневі волоски, найменш чутливими – епідермальні клітини на рівні меристеми. Отримані нами дані узгоджуються з результатами інших досліджень, в яких також спостерігали деполімеризацію цитоскелетних структур (мікротрубочок) через короткі інтервали часу після обробки рослин холодом, наприклад, у клітинах ріпаку та люцерни [173, 199]. Раніше було показано, що в цитоплазмі пилкових трубок тютюну *N. tabacum* актинові філаменти залишались непошкодженими після впливу температури  $+4^{\circ}\text{C}$ , в той час як мікротрубочки при таких умовах майже повністю руйнувались [9]. Зміни актинових філаментів під дією холоду спостерігалися в пилковому зерні у груші (*Pyrus pyrifolia*) з подальшим звільненням цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  [252].

За результатами проведених експериментів спостерігаються зміни організації актинових філаментів в різних зонах головних коренів *A. thaliana* після експозиції коренів при низьких температурах. Після комбінованого впливу температури  $+4^{\circ}\text{C}$  та екзогенного донора NO SNP в концентрації 100 мкМ відбувається часткове відновлення сітки мікрофіламентів. При цьому спостерігалось зменшення кількості клітин з частковою і повною деполімеризацією актинових філаментів. Вони знову починали закручуватись і скупчуватись, утворюючи сітку навколо ядра клітини (Рис. 6.6). Комбінований вплив температури  $+0,5^{\circ}\text{C}$  та екзогенного донора NO SNP в концентрації 100 мкМ також призводить до часткового відновлення сітки актинових філаментів, але в меншій мірі, що пов'язано із зниженням температури. В епідермальних клітинах на рівні меристеми та в клітинах власне меристеми можна було спостерігати скупчення ниток в пучки, їх дезорієнтацію і реорієнтацію у порівнянні з контрольними зразками (Рис. 6.7).

Зміни вихідної організації актинових філаментів в різних зонах головних коренів *A. thaliana* також відбувались і після обробки коренів скавенджером

NO. Так, після попередньої обробки сРТЮ в концентрації 100 мкМ мікрофіламенти набували неупорядкованої орієнтації на рівні з їх частковою деполімеризацією та фрагментацією. Після комбінованого впливу холоду (+4°C; +0,5°C) та сРТЮ в концентрації 100 мкМ в епідермальних клітинах на рівні меристеми і власне клітинах меристеми актинові філаменти не візуалізувалися взагалі, що свідчить про їх деполімеризацію і повне руйнування в даній області (Рис. 6.8).

Нітропрурид натрію стимулює відновлення актинових філаментів цитоскелету, що характеризується великою сіткою відновлюваних актинових філаментів, а при дії сРТЮ відбувається збільшення дезорієнтації та деполімеризації актинових філаментів в різних типах клітин кореня проростків *A. thaliana*. Раніше було показано, що NO опосередковує реорганізацію мікротрубочок як основних компонентів цитоскелету, що є рушійною силою морфогенезу. Було виявлено стимулюючий вплив донора NO SNP (10-500 мкМ) на ріст коренів, що узгоджується зі зміною орієнтації та організації мікротрубочок у клітинах певних ростових зон кореня проростків *A. thaliana* [128].

Зміни вихідної організації актинових філаментів в різних типах клітин головних коренів *A.thaliana* внаслідок впливу низьких температур та донора/скавенджера NO (SNP/сРТЮ) підсумовані в таблиці 2. Як вже описувалося раніше, аналіз орієнтації мікрофіламентів в клітинах різних зон кореня проростків *A. thaliana* здійснювався нами за допомогою програмного забезпечення MFA, що уточнює та суттєво доповнює отримані дані щодо впливу низьких температур на просторову організацію актинових філаментів в різних типах клітин кореня. За допомогою програми MFA нами було встановлено, що після комбінованого впливу низьких температур (+4°C; +0,5°C) та донора/скавенджера NO (SNP, сРТЮ) в усіх досліджуваних зонах кореня відбувається зміна орієнтації актинових філаментів по відношенню до основної осі кореня (Рис. 7.2-7.4). Відповідно, нами вперше було встановлено, що під впливом холоду та змін внутрішньоклітинного вмісту

NO відбувається розрідження динамічної актинової сітки, а також диференційно змінюється орієнтація мікрофіламентів відносно основної осі кореня.

Таблиця 8.2

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

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

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



Наші дані вперше свідчать про комбінований вплив низької температури та донора (SNP) і скавенджера (сРТЮ) оксид азоту на організацію актинових філаментів в різних типах клітин головного кореня проростків *A. thaliana*. Сигнал від холоду може передаватись на мікрофіламенти за допомогою NO, викликаючи зміни в їх організації та орієнтації залежно від значення температури за допомогою актинових філаментів, викликаючи зміни в їх організації. Таким чином, співвідношення між холодом, NO і мікрофіламентами забезпечує їх участь в загальному сигнальному каскаді. Накопичені дані підкреслюють важливість NO в фізіологічних процесах рослинної клітини, що складаються з високо розгалужених NO-регульованих сигнальних каскадів.

## 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 корневих волосків. При експозиції при температурі  $+0,5^{\circ}\text{C}$  найбільш чутливими виявились мікрофіламенти зони розтягу, де спостерігали сильну неупорядкованість 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 cPTIO 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 ( $+4^{\circ}\text{C}$ ,  $+0,5^{\circ}\text{C}$ ) 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

корневих 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 ендогенного 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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. Abdrakhamanova A. Is microtubule disassembly a trigger for cold acclimation? / A. Abdrakhamanova, Q. Wang, L. Khokhlova, P. Nick // *Plant Cell Physiol.* – 2003. – Vol. 44 (7). – P. 676-686.
2. Ambrose J.C. The kinesin ATK5 functions in early spindle assembly in *Arabidopsis* / J.C. Ambrose, R. Cyr // *Plant Cell.* – 2007.- Vol. 19. – P. 226-236.
3. An L. Effects of nitric oxide on growth of maize seedling leaves in the presence or absence of ultraviolet radiation / L. An, Z. Liu, M. Yhang, T. Chen, X. Wang // *J. Plant Physiol.* – 2005. – Vol. 162. – P. 317-326.
4. An Y.-Q. Conserved expression of the *Arabidopsis* ACT1 and ACT3 actin subclass in organ primordia and mature pollen / Y.-Q. An, S. Huang, J.M. McDowell, E.C. Mc-Kinney, R.B. Meagher // *Plant Cell.* – 1996. – Vol. 8. – P. 15-30.
5. Andrianantoandro E. Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin / E. Andrianantoandro, T.D. Pollard // *Mol. Cell.* – 2006. – Vol. 24. – P. 3-23.
6. Arasimowicz M. Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses / M. Arasimowicz, J. Floryszak Wieczorek // *Plant Sci.* – 2007. – Vol. 172. – P. 876-887.
7. Asada K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions // *Plant Physiol.* – 2006. – Vol. 141 (2). – P. 391-396.
8. Aslan M. Nitric oxide-dependent generation of reactive species in sickle cell disease. Actin tyrosine induces defective cytoskeletal polymerization / M. Aslan, T.M. Ryan, T.M. Townes, L. Coward et al. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278. – P. 4194-4204.
9. Aström H. Cold-stability in the pollen tube cytoskeleton / H. Aström, I. Virtanen, M. Raudaskoski // *Protoplasma.* – 1991. – Vol. 160. – P. 99-107.
10. Aulak K.S. Dynamics of protein nitration in cells and mitochondria / K.S. Aulak, T. Koeck, J.W. Crabb, D.J. Stuehr // *Am. J. Physiol.* – 2004. – Vol. 286. – P. 30-38.

11. Baek K.H. Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines / K.H. Baek, D.Z. Skinner // *Plant Sci.* – 2003. – Vol. 165. – P. 1221-1227.
12. Bagnall D. Chill-induced wilting and hydraulic recovery in mung bean plants / D. Bagnall, J.O.E. Wolfe, R.W. King // *Plant Cell Environ.* – 1983. – Vol. 6. – P. 457-464.
13. Baluška F. Cytoskeleton-plasma membrane-cell wall continuum in plants. Emerging links revisited / F. Baluška, J. Samaj, P. Wojtaszek, D. Volkmann, D. Menzel // *Plant Physiol.* – 2003. – Vol. 133 (2). – P. 482-491.
14. Baluška F. Root apex transition zone: a signaling-response nexus in the root / F. Baluška, S. Mancuso, D. Volkmann, P.W. Barlow // *Trends Plant Sci.* – 2010. – Vol. 15 (7). – P. 402-408.
15. Baluška F. The microtubular cytoskeleton in cells of coldtreated roots of maize (*Zea mays* L.) shows tissue-specific responses / F. Baluška, J.S. Parker, P.W. Barlow // *Protoplasma.* – 1993. – V. 172. – P. 84-96.
16. Bamburg J.R. ADF/cofilin and actin dynamics in disease / J.R. Bamburg, O.P. Wiggan // *Cell Biol.* – 2002. – Vol. 12. – P. 598-605.
17. Bamburg, J. R. Roles of ADF/cofilin in actin polymerization and beyond / J. Bamburg, B. Bernstein // *Biol. Rept.* – 2010. – Vol. 2. – P. 62.
18. Banan A. Nitric oxide and its metabolites mediate ethanol-induced microtubule disruption and intestinal barrier dysfunction / A. Banan, J.Z. Fields, H. Decker, Y. Zhang, A. Keshavarzian // *J. Pharmacol. Exp. Theur.* – 2000. – Vol. 294. – P. 997-1003.
19. Barlow W.P. Cytoskeletal perspectives on root growth and morphogenesis / W.P. Barlow, F. Baluška // *Plant Mol. Biol.* – 2000. – Vol. 51. – P. 289-322.
20. Barroso J.B. Localization of S-nitrosoglutathione and expression of S-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress / J.B. Barroso, F.J. Corpas, A. Carreras, M. Rodríguez-Serrano et al. // *J. Exp. Bot.* – 2006. – Vol. 57. – P. 1785-1793.

21. Beligni M.V. Nitric oxide stimulates seed germination and deetiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants / M.V. Beligni, L. Lamattina // *Planta*. – 2000. – Vol. 210. – P. 215-221.
22. Berghöfer T. Nanosecond electric pulses trigger actin responses in plant cells / T. Berghöfer, C. Eing, B. Flickinger, P. Hohenberger, L.H. Wegner, W. Frey, P. Nick // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2009. – Vol. 387 (3). – P. 590-595.
23. Besson-Bard A. Current view of nitric oxide-responsive genes in plants / A. Besson-Bard, J. Astier, S. Rasul, I. Wawera et al. // *Plant Sci.* – 2009. – Vol. 177. – P. 302-309.
24. Blancaflor E.B. The cytoskeleton and gravitropism in higher plants / E.B. Blancaflor // *J. Plant Growth Regul.* – 2002. – Vol. 21. – P. 120-136.
25. Blanchoin L. Actin Dynamics architecture and mechanics in cell motility / L. Blanchoin, R. Boujemaa-Paterski, C. Sykes et al. // *Physiol. Rev.* – 2014. – Vol. 94. – P. 235-263.
26. Blume Y. Exposure of beta-tubulin regions defined by antibodies on an *Arabidopsis thaliana* microtubule protofilament model and in the cells / Y. Blume, A. Yemets, Y. Sheremet, A. Nyporko et al. // *BMC Plant Biol.* – 2010. – Vol. 29. – P. 1-10.
27. Blume Ya.B. Effects of phytohormones on the cytoskeleton of the plant cell / Ya.B. Blume, Yu.A. Krasylenko, A.I. Yemets // *Russ. J. Plant. Physiol.* – 2012 – Vol. 59 (4). – P. 515-529.
28. Bright J. Pollen generates nitric oxide and nitrite: a possible link to pollen-induced allergic responses / J. Bright, S.J. Hiscock, P.E. James et al. // *Plant Physiol. Biochem.* – 2009. – Vol. 47. – P. 49-55.
29. Bursch W. Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments / W. Bursch, K. Hochegger, L. Torok, B. Marian, A. Ellinger, R.S. Hermann // *J. Cell Sci.* – 2000. – Vol. 113 (7). – P. 1189-1198.

30. Cai C. Assembly and disassembly of plant microtubules: tubulin modifications and binding to MAPs / C. Cai // *J. Exp. Bot.* – 2010. – Vol. 61. – P. 623-626.
31. Carlier M.-F. Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility / M.-F. Carlier, V. Laurent, J. Santolini, R. Melki, D. Didry, G.-X. Xia, Y. Hong, N.-H. Chua, D. Pantaloni // *Cell Biol.* – 1997. – Vol. 136. – P. 1307-1322.
32. Carpaneto A. Cold transiently activates calcium-permeable channels in *Arabidopsis* mesophyll cells / A. Carpaneto, N. Ivashikina, V. Levchenko, E. Krol, E. Jeworutzki, J. Zhu, R. Hedrich // *Plant Physiol.* – 2007. – Vol. 143. – P. 487-494.
33. Casella J.F. Purification and initial characterization of a protein from skeletal muscle that caps the barbed ends of actin filaments / J.F. Casella, D.J. Maack, S. Lin // *Biol. Chem.* – 1986. – Vol. 261. – P. 10915-10921.
34. Chaikam V. Comparison of structure, function and regulation of plant cold shock domain proteins to bacterial and animal cold shock domain proteins / V. Chaikam, D.T. Karlson // *BMB Rept.* – 2010. – Vol. 43. – P. 1-8.
35. Chaki M. Involvement of reactive nitrogen and oxygen species (RNS and ROS) in sunflower–mildew interaction / M. Chaki, A.M. Fernandez\_Ocaca, R. Valderrama // *Plant Cell Physiol.* – 2009. – Vol. 50. – P. 265-279.
36. Chang W. Alteration of the C-terminal amino acid of tubulin specifically inhibits myogenic differentiation / W. Chang, D.R. Webster, A.A. Salam, D. Gruber et al. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P. 30690-30698.
37. Cheng J.-S. Release of proteins: insights into oxidative response of *Taxus cuspidata* cells induced by shear stress / J.-S. Cheng, Y.-J. Yuan // *J. Mol. Catal. B Enzym.* – 2009. – V. 58. – P. 84-92.
38. Chilley P. M. The POLARIS peptide of *Arabidopsis* regulates auxin transport and root growth via effects on ethylene signaling / P.M. Chilley, S.A. Casson, P. Tarkowski et al. // *Plant Cell.* – 2006. – Vol. 18 (11). – P. 3058-3072.



39. Chinnusamy V. Gene regulation during cold stress acclimation in plants / V. Chinnusamy, J.K. Zhu, R. Sunkar // *Methods Mol. Biol.* – 2010. – Vol. 639. – P. 39-55.
40. Cho S.O. Distribution and function of actin in the developing stomatal complex of winter rye *Secale cereale* / S.O. Cho, S.M. Wick // *Protoplasma.* – 1990. – Vol. 157. – P. 154-164.
41. Cleary A.L. Microtubule and F-actin dynamics at the division site in living *Tradescantia* stamen hair cells / A.L. Cleary, B.E.S. Gunning, G.O. Wasteneys, P.K. Hepler // *J. Cell Sci.* – 1992. – Vol. 103. – P. 977-988.
42. Clements M.K. Inhibition of actin polymerization by peroxyntirite modulates neutrophil functional responses / M.K. Clements, D.W. Siemsen, S.D. Swain, A.J. Hanson et al. // *J. Leukocyte Biol.* – 2003. – Vol. 73. – P. 344-355.
43. Cohen E. Papaya pollen viability and storage / E. Cohen, U. Lavi, P. Spiegel-Roy // *Sci. Hortic.* – 1989. – Vol. 40. – P. 317-324.
44. Collings D.A. Actin microfilament and microtubule distribution patterns in the expanding root of *Arabidopsis thaliana* / D.A. Collings, G.O. Wasteneys // *Can. J. Bot.* – 2005. – Vol. 83. – P. 579-590
45. Coope J. A. Capping protein / J.A. Cooper, M.C. Hart, T.S. Karpova, D.A. Schafer // *Oxf. Univ. Press.* – 1999. – P. 62-64.
46. Coope J. A. New insights into mechanism and regulation of actin capping protein / J. A. Cooper, D. Sept // *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* – 2008. – Vol. 267. – P. 183-206.
47. Corpas F.J. Nitrosative stress in plants: a new approach to understand the role of NO in abiotic stress / F.J. Corpas, J.B. Barroso, A. Carreras et al. // *Nitric Oxide Plant Growth, Devel. Stress Physiol.* – 2007. – Vol. 6. – P.187-205.
48. Correa-Aragunde N. Nitric oxide mediates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato / N. Correa-Aragunde, M. Graziano, C. Chevalier, L. Lamattina // *J. Exp. Bot.* – 2006. – Vol. 57. – P. 581-588.

49. Correa-Aragunde N. Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato / N. Correa-Aragunde, M. Graziano, L. Lamattina // *Planta*. – 2004. – Vol. 218. – P. 900-905.
50. Cyr R.J. Calcium/calmodulin affects microtubule stability in lysed protoplasts / R.J. Cyr // *J. Cell Sci.* – 1991. – Vol. 100. – P. 311-317.
51. Dantán-González E. Production of two novel laccase isoforms by a thermotolerant strain of *Pycnoporus sanguineus* isolated from an oil-polluted tropical habitat/ E. Dantán-González, O. Vite-Vallejo, C. Martinier-Anaya et al. // *Int. Microbial.* – 2008. – Vol. 11. – P. 163-169.
52. Dantán-González E. Actin monoubiquitylation is induced in plants in response to pathogens and symbionts / E. Dantán-González, Y. Rosenstein, C. Quinto, F. Sánchez // *Mol. Plant Microbe. Interact.* – 2001. – Vol. 11. – P. 1267-1273.
53. de Pinto M.C. Changes in the antioxidant systems as part of the signaling pathway responsible for the programmed cell death activated by nitric oxide and reactive oxygen species in tobacco bright yellow 2 cells / De Pinto M.C., Tommasi F., de Gara L. // *Plant Physiol.* – 2002. – Vol. 130. – P. 698-708.
54. Del Duca S. Effects of post-translational modifications catalysed by pollen transglutaminase on the functional properties of microtubules and actin filaments / S. del Duca, D. Serafini-Fracassini, P. Bonner, M. Cresti, G. Cai // *Biochem. J.* – 2009. – Vol. 418 (3). – P. 651-664.
55. Delledonne M. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance / M. Delledonne, Y. Xia, R.A. Dixon // *Nature*. – 1998. – Vol. 394. – P. 585-588.
56. Delledonne M. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response / M. Delledonne, J. Zeier, A. Marocco, C. Lamb // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2001. – Vol. 98. – P. 13454-13459.
57. Deng L. Localized mechanical stress induces time-dependent actin cytoskeletal remodeling and stiffening in cultured airway smooth muscle cells / L.

Deng, N.J. Fairbank, B. Fabry, P.G. Smith, G.N. Maksym // *Am. J. Physiol.* – 2004. – Vol. 287 (2). – P. 440-448.

58. Dolan L. Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root / L. Dolan, K. Janmaat, V. Willemsen, P. Linstead et al. // *Development.* – 1993. – Vol. 119 (1). – P. 71-84.

59. Dos Remedios C.G. Actin binding proteins: Regulation of cytoskeletal microfilaments / C.G. Remedios, D. Chhabra, M. Kekic, I.V. Dedova, M. Tsubakihara, D.A. Berry, N.J. Nosworthy // *Physiol. Rev.* – 2003. – Vol. 83 (2). – P. 443-473.

60. Drøbak B. The role of the actin cytoskeleton in plant cell signaling / B. K. Drøbak V. E. Franklin-Tong, C. J. Staiger / B. Drøbak // *New Phytologist.* – 2004. – Vol. 163. – P.13-30

61. Du L. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin is critical for brassinosteroid biosynthesis and plant growth / L. Du, B.W. Poovaiah // *Nature.* – 2005. – Vol. 437. – P. 741-745.

62. Duckett C.M. Gibberellic acid-induced microtubule reorientation in dwarf peas is accompanied by rapid modification of an  $\alpha$ -tubulin isotype / C.M. Duckett, C.W. Lloyd // *Plant J.* – 1994. – Vol. 5 (3). – P. 363-372.

63. Durner J. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP ribose / J. Durner, D. Wendehenne, D.F. Klessig // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1998. – Vol. 95. – P. 10328-10333.

64. Dzhurakhalov A. Towards mechanistic models of plant organ growth / A. Dzhurakhalov, D. Draelants, D. De Vos, I. Bogaerts et al. // *J. Exp. Bot.* – 2012. – Vol. 63. – P. 3325-3337.

65. Egierszdorff S. Low temperature effects on growth and actin cytoskeleton organization in suspension cells of winter oilseed rape / S. Egierszdorff, A. Kacperska // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* – 2001. – Vol. 65. – P. 149-158.

66. Eleftheriou E.P. The effect of cytochalasin D on preprophase band organization in root tip cells of *Allium* / E.P. Eleftheriou, B.A. Palevitz // *J. Cell Sci.* – 1992. – Vol. 103. – P. 989-998.

67. Fan H. Effects of exogenous nitric oxide on growth, active oxygen species metabolism, and photosynthetic characteristics in cucumber seedlings under NaCl stress / H. Fan, S. Guo, Y. Jiao, R. Zhang, J. Li // *Front. Agri. China.* – 2007. – Vol. 1. – P. 308-314.
68. Fan J.L. Disarrangement of actin filaments and  $\text{Ca}^{2+}$  gradient by  $\text{CdCl}_2$  alters cell wall construction in *Arabidopsis thaliana* root hairs by inhibiting vesicular trafficking / J.L. Fan, X.Z. Wei, L.C. Wan, L.Y. Zhang, X.Q. Zhao, W.Z. Liu, H.Q. Hao, H.Y. Zhang // *J. Plant Physiol.* – 2011. – Vol. 168. – P. 1157-1167.
69. Fan T.T. Effect of low temperature on profilins and ADFs transcription and actin cytoskeleton reorganization in *Arabidopsis* / T.T. Fan, J.J. Ni, W.C. Dong, L.Z. An, Y. Xiang, S.Q. Cao // *Biol. Plant.* – 2015. – Vol. 20 (10). – P.793-796.
70. Farajalla M.R. The  $\alpha$ -tubulin gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.) and differential gene expression during cold acclimation / M.R. Farajalla, P.J. Gulick // *Genome.* – 2007. – Vol. 50. – P. 502-510.
71. Fitter A.H., Hay R.K.M. Environmental physiology of plants // Academic Press, London. – 1987.
72. Foissner I. Reversible protein phosphorylation regulates the dynamic organization of the pollen tube cytoskeleton: effects of calyculin A and okadaic acid / I. Foissner, F. Grolig, G. Obermeyer // *Protoplasma.* – 2002. – Vol. 220. – P. 1-15.
73. Frankow-Lindberg B.E. Adaptation to winter stress in nine white clover populations: changes in non-structural carbohydrates during exposure to simulated winter conditions and spring regrowth potential / B.E. Frankow-Lindberg // *Ann. Bot.* – 2001. – Vol. 88. – P. 745-751.
74. Friml J. Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis* / J. Friml, J. Wisniewska, E. Benková, K. Mendgen, K. Palme // *Nature.* – 2002. – Vol. 415 (6873). – P. 806-809.
75. Fu Y. The cytoskeleton in the pollen tube / Y. Fu // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2015. – Vol. 28. – P. 111-119.

76. García-Mata C. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress / C. García-Mata, L. Lamattina // *Plant Physiol.* – 2001. – Vol. 126. – P. 1196-1204.
77. Genove G. Brighter reporter genes from multimerized fluorescent proteins / G. Genove, B.S. Glick, A.L. Barth // *Biotechniques.* – 2005. – Vol. 39. – P. 814-818.
78. George S.P. Dimerization and actin-bundling properties of villin and its role in the assembly of epithelial cell brush borders / S.P. George, Y. Wang, S. Mathew, K. Srinivasan, S. Khurana // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282 (36). – P. 26528-26541.
79. Gill S.S. Polyamines and abiotic stress tolerance in plants / S.S. Gill, N. Tuteja // *Plant Signal. Behavior.* – 2010. – Vol. 5 (1). – P. 26-33.
80. Gossot O. Pollen tube growth: coping with mechanical obstacles involves the cytoskeleton / O. Gossot, A. Geitmann // *Planta.* – 2007. – Vol. 226. – P. 405-416.
81. Gould K.S. Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response? / K. S. Gould, O. Lamotte, A. Klinguer, A. Pugin, D. Wendehenne // *Plant, Cell Environ.* – 2003. – Vol. 26. – P. 1851-1862.
82. Grolig F. Nuclear centering in spirogyra: force integration by microfilaments along microtubules / F. Grolig // *Planta.* – 1998. – Vol. 204. – P. 54-63.
83. Groppa M.D. Polyamines and abiotic stress: recent advances / M.D. Groppa, M.P. Benavides // *Amino acids.* – 2008. – Vol. 34 (1). – P. 35-45.
84. Groppa M.D. Nitric oxide, polyamines and Cd-induced phytotoxicity in wheat roots / M.D. Groppa, E.P. Rosales, M.F. Iannone, M.P. Benavides // *Phytochemistry.* – 2008. – Vol. 69. – P. 2609-2615.
85. Guy C.L. Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism / C.L. Guy // *Annu. Rev. Plant Phys.* – 1990. – Vol. 41. – P. 187-223.
86. Hammond J.W. Tubulin modifications and their cellular functions / J.W. Hammond, D. Cai, K.J. Verhey // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2008. – Vol. 20. – P. 71-76.

87. Hasegawa P.M. Plant cellular and molecular responses to high salinity / P.M. Hasegawa, R.A. Bressan, J.K. Zhu, H.J. Bohnert // *Plant Mol. Biol.* – 2000. – Vol. 51. – P. 463-499.
88. Hepler P.K. Cytoskeletal dynamics in living plant cells / P.K. Hepler, A.L. Cleary, B.E.S. Gunning, P. Wadsworth, G.O. Wasteneys, D.H. Zhang // *Cell Biol. Int.* – 1993. – Vol. 17. – P. 127-142.
89. Higaki T. Quantification and cluster analysis of actin cytoskeletal structures in plant cells: role of actin bundling in stomatal movement during diurnal cycles in *Arabidopsis* guard cells / T. Higaki, K. Natsumaro, S. Toshio, K. Noriaki et al. // *Plant J.* – 2010. – Vol. 61. – P. 156-165.
90. Higgs H. N. Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of protein / H. Higgs, T.D. Pollard // *Annu. Rev. Biochem.* – 2001. – Vol. 70. – P. 649-676.
91. Hong J.K. Nitric oxide function and signalling in plant disease / J.K. Hong, B.W. Yun, J.G. Kang, M.U. Raja et al. // *J. Exp. Bot.* – 2008. – Vol. 59. – P. 147-154.
92. Hopkins W.C. The physiology of plants under stress / W.C. Hopkins // *Introduction to Plant Physiology*, 2<sup>nd</sup> ed., Wiley, New York. – 1999. – P. 451-475.
93. Hossain K.K. Scavenging of nitric oxide improves plant tolerance against high temperature stress / K.K. Hossain, G. Tokuda, R.D. Itoh, H. Yamasaki // *Nitric Oxide.* – 2006. – Vol. 14. – P. 27-38.
94. Hossain M.A. Rosmarinic acid and methyl rosmarinate from *Orthosiphon stamineus* / M.A. Hossain, S.M. Salehuddin, Z. Ismail // *J. Bangladesh Acad. Sci.* – 2006. – Vol. 30 (2). – P. 167-171.
95. Huang S. Arabidopsis capping protein (AtCP) is a heterodimer that regulates assembly at the barbed ends of actin filaments / S. Huang, L. Blanchoin, D.R. Kovar, C.J. Stainer // *Biolog. Chem.* – 2003. – Vol. 278. – P. 44832-44842.
96. Hung K.T. Nitric oxide counteracts the senescence of rice leaves induced by hydrogen peroxide / K.T. Hung, C.H. Kao // *Bot. Bull. Acad. Sinica.* – 2005. – Vol. 46. – P. 21-28.

97. Hussey P. J. Control of the actin cytoskeleton in plant cell growth / P. J. Hussey, T. Katelaar, M.J. Deeks // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2006. – Vol. 57. – P. 109-25.
98. Hwang J.-U. Abscisic acid-induced actin reorganization in guard cells of dayflower is mediated by cytosolic calcium levels and by protein kinase and protein phosphatase activities / J.-U. Hwang, Y. Lee // *Plant Physiol.* – 2001. – Vol. 125 (4). – P. 2120-2128.
99. Ingouff M. Plant formin AtFH5 is an evolutionarily conserved actin nucleator involved in cytokinesis / M. Ingouff, J.N. Fitz Gerald, C. Guerin, H. Robert, M.B. Sorensen // *Nat. Cell Biol.* – 2005. – Vol. 7. – P. 374-380.
100. Jacques E. (a) MicroFilament Analyzer, an image analysis tool for quantifying fibrillar orientation, reveals changes in microtubule organization during gravitropism / E. Jacques, J. Buytaert, D.M. Wells, M. Lewandowski et al. // *Plant J.* – 2013. – Vol. 74. – P. 1045-1058.
101. Jacques E. (b) Microfilament analyzer identifies actin network organizations in epidermal cells of *Arabidopsis thaliana* roots / E. Jacques, M. Lewandowski, J. Buytaert, Y. Fierens et al. // *Plant Signal. Behav.* – 2013. – Vol. 8 (7). – e24821. – doi: 10.4161/psb.24821.
102. Janben M. Tissue specification and intracellular distribution of actin isoforms in *Vicia faba* L. / M. Janben, C. Hunte, M. Schulz, H. Schnabl // *Protoplasma.* – 1996. – Vol. 191. – P. 158-163.
103. Janmey P.A. Modulation of gelsolin function by phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate / P.A. Janmey, T.P. Stossel // *Nature.* – 1987. – Vol. 87. – P. 362-369.
104. Janmohammadi M. Proteomic analysis of cold acclimation in winter wheat under field conditions / M. Janmohammadi, H.P. Mock, A. Matros // *Iceland. Agr. Sci.* – 2014. – Vol. 27. – P. 3-15.
105. Jiang Q.W. Two novel mitogen-activated protein signaling components, OsMEK1 and OsMAP1, are involved in a moderate low-temperature signaling pathway in rice / Q.W. Jiang, O. Kiyoharu, I. Ryozyo // *Plant Physiol.* – 2002. – Vol. 129. – P. 1880-1891.

106. Jovanovich A.M. Plant cell division is specifically affected by nitrotyrosine / A.M. Jovanovich, S. Durst, P. Nick // *J. Exp. Bot.* – 2009. – Vol. 61. – P. 901-909.
107. Kabsch W. Structure and function of actin / W. Kabsch, J. Vandekerckhove // *Annu Rev. Biophys. Biomol. Struct.* – 1992. – Vol. 21. – P. 49-76.
108. Kakimoto T. Cytoskeletal ultrastructure of phragmoplast-nuclei complexes isolated from cultured tobacco cells / T. Kakimoto, H. Shibaoka // *Protoplasma.* – 1988. – Vol. 2. – P. 95-103.
109. Kameyama K. Tyrosine phosphorylation in plant bending / K. Kameyama, Y. Kishi, M. Yoshimura, N. Kanzawa, M. Sameshima, T. Tsuchiya // *Nature.* – 2000. – Vol. 407. – P. 37.
110. Kang F. Profilin promotes barbed-end actin filaments assembly without lowering the critical concentration / F. Kang, D.L. Purich, F.S. Southwick // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274. – P. 36963-36972.
111. Kaplan F. Exploring the temperature-stress metabolome of *Arabidopsis* / F. Kaplan, J. Kopka, D.W. Haskell, W. Zhao, K.C. Schiller, N. Gatzke, D.Y. Sung, C.L. Guy // *Plant Physiol.* – 2004. – Vol. 136. – P. 4159-4168.
112. Kaur G. Cold stress injury during the pod-filling phase in chickpea (*Cicer arietinum* L.): effects on quantitative and qualitative components of seeds / G. Kaur, S. Kumar, H. Nayyar, H.D. Upadhyaya // *J. Agron. Crop Sci.* – 2008. – Vol. 194. – P. 457-464.
113. Kengen H.M.P. F-actin in mitotic spindles of synchronized suspension culture cells of tobacco visualized by confocal laser scanning microscopy / H.M.P. Kengen, J. Eygensteyn, T.N.M. Amstel // *Cell Biol. Int.* – 1995. – Vol. 19. – P. 585-592.
114. Kennard J.L. Pre-mitotic nuclear migration in subsidiary mother cells of *Tradescantia* occurs in G1 of the cell cycle and requires F-actin / J.L. Kennard, A.L. Cleary // *Cell Motil. Cytoskeleton.* – 1997. – Vol. 36. – P. 55-67.
115. Khokhlova L. P. Rearrangement of the cytoskeleton in *Triticum aestivum* cells during cold hardening and after treatment with abscisic acid / L. P. Khokhlova, O.V. Olinevich // *Russ. J. Plant Physiol.* – 2003. – Vol. 50 (4). – P. 470-481.



116. Kim M.H. Cold shock domain protein 3 regulates freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* / M.H. Kim, K. Sasaki, R. Imai // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284. – P. 23454-23460.
117. Klein M.G. Structure of the actin crosslinking core of fimbrin / M.G. Klein, W. Shi, U. Ramagopal, Y. Tseng, D. Wirtz, D.R. Kovar, C.J. Staiger, S.C. Almo // *Structure.* – 2004. – Vol. 12 (6). – P. 999-1013.
118. Klessig D.F. Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense / D.F. Klessig, J. Durner, R. Noad, D.A. Navarre // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – Vol. 97. – P. 8849-8855.
119. Klyachko N.L. The cytoskeleton and intracellular motility in plants / N.L. Klyachko // *Russ. J. Plant Physiol.* – 2005. – Vol. 52 (5). – P. 700-708.
120. Knight H. A history of stress alters drought calcium signalling pathways in *Arabidopsis* / H. Knight, S. Brandt, M.R. Knight // *Plant J.* – 1998. – Vol. 16. – P. 681-687.
121. Knight H. Abscisic acid induces CBF gene transcription and subsequent induction of cold-regulated genes via the CRT promoter element / H. Knight, D.G. Zarka, H. Okamoto, M.F. Thomashow, M.R. Knight // *Plant Physiol.* – 2004. – Vol. 135 (3). – P. 1710-1717.
122. Knight M. Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium / M. Knight, A. Campbell, S. Smith, A. Trewavas // *Nature.* – 1991. – Vol. 352. – P. 524-526.
123. Komis G. Actomyosin is involved in the plasmolytic cycle: gliding movement of the deplasmolyzing protoplast / G. Komis, P. Apostolakos, B. Galatis // *Protoplasma.* – 2003. - Vol. 221. – P. 245-256.
124. Kopyra M. Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the Inhibitory effect of heavy metals and salinity of root growth of *Lupinus luteus* / M. Kopyra, E. Gwozdz // *Plant Physiol. Biochem.* – 2003. – Vol. 41. – P. 1011-1017.
125. Kosová K. Complex phytohormone responses during the cold acclimation of two wheat cultivars differing in cold tolerance, winter Samanta and spring Sandra /

K. Kosová, I.T. Prášil, P. Vítámvás et al. // *Plant Physiol.* – 2012. – Vol. 169 (6). – P. 567-576.

126. Kost B. A GFP-mouse talin fusion protein labels plant actin filaments *in vivo* and visualizes the actin cytoskeleton in growing pollen tubes / B. Kost, P. Spielhofer, N.H. Chua // *Plant J.* – 1998. – Vol. 16. – P. 393-401.

127. Kovar D.R. Fluorescently-labeled fimbrin decorates a dynamic actin filament network in live plant cells / D.R. Kovar, B.C. Gibbon, D.W. McCurdy, C.J. Staiger // *Planta.* – 2001. – Vol. 213. – P. 390-395.

128. Krasylenko Y. Nitric oxide as a critical factor for perception of UV-B irradiation by microtubules in *Arabidopsis* / Y. Krasylenko, A. Yemets, Y. Sheremet, Y. Blume // *Physiol. Plant.* – 2011. – Vol. 145 (4). – P. 505-515.

129. Kumar S. Growth and metabolic responses of contrasting chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes to chilling stress at reproductive phase / S. Kumar, J. Malik, P. Thakur, S. Kaistha, K. Sharma // *Acta Physiol. Plant.* – 2011. – Vol. 33. – P. 779-787.

130. Kwiatkowski D.J. Functions of gelsolin: motility, signaling, apoptosis, cancer / D.J. Kwiatkowski // *Curr. Op. Cell Biol.* – 1999. – Vol. 11. – P. 103-108.

131. Lamattina L. Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule / L. Lamattina, C. Garcia-Mata, M. Graziano, G. Pagnussat // *Plant Biol.* – 2003. – Vol. 54. – P. 109-136.

132. Lamotte O. Mechanisms of nitric oxide-induced increase of free cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration in *Nicotiana plumbaginifolia* cells / O. Lamotte, C. Courtois, G. Dobrowolska, A. Besson // *Free Radic. Biol. Med.* – 2006. – Vol. 40. – P. 1369-1376.

133. Larkindale J. Protection against heat stress-induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid / J. Larkindale, M.R. Knight // *Plant Physiol.* – 2002. – Vol. 128. – P. 682-695

134. Lee S.H. Regulation of actin cytoskeleton dynamics in cells / S.H. Lee, R. Dominguez // *Mol. Cells.* – 2010. – Vol. 29 (4). – P. 311-25.

135. Leshem Y.Y. Evidence for the function of the free radical gas-nitric oxide (NO) as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants /

Y.Y. Leshem, R.B. Wills, V.V. Ku // *Plant Physiol. Biochem.* – 1998. – Vol. 36. – P. 825-833.

136. Li J. Capping protein integrates multiple MAMP signaling pathways to modulate actin dynamics during plant innate immunity / J. Li, J.L. Henty-Ridilla, B.H. Staiger, B. Day, C.J. Staiger // *Nature Comm.* – 2015. – Vol. 28. – P. 7206.

137. Lindermayr C. Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis* / C. Lindermayr, G. Saalbach, J. Durner // *Plant Physiol.* – 2005. – Vol. 137. – P. 921-930.

138. Lloyd C. Actin in plants / C. Lloyd // *J. Cell Sci.* – 1988. – Vol. 90. – P. 185-188.

139. Lloyd C.W. Cytoskeletal elements of the phragmosome establish the division plane in vacuolated higher plant cells // *The Cytoskel. Basis of Plant Growth and Form* (C. W. Lloyd, ed.), London: Academic Press. – 1991 – P. 245-257.

140. Lombardo M.C. Nitric oxide functions as a positive regulator of root hair development / M.C. Lombardo, M. Graziano, J.C. Polacco, L. Lamattina // *Plant Signal. Behav.* – 2006. – Vol. 1 (1). – P. 28-33.

141. Lynch D.V. Chilling injury in plants: the relevance of membrane lipids / D.V. Lynch, F. Katterman (Ed.) // *Environmental Injury to Plants*, Academic Press, New York. – 1990. – P. 17-34.

142. Maciver S.K. The ADF/cofilin family: actin-remodeling proteins / S.K. Maciver, P.J. Hussey // *Genome Biol.* – 2002. – Vol. 3. – P. 3007.1-3007.12.

143. Malamy J. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana* / J. Malamy, P. Benfey // *Genes Dev.* – 1997. – Vol. 124 (4). – P. 33-44.

144. Mano N. An oxygen cathode operating in a physiological solution / N. Mano, H. Kim, Y. Zhang, A. Heller // *J. Chem. Soc.* – 2002. – Vol. 124 (22). – P. 6480-6486.

145. Marc J. A GFP-MAP4 reporter gene for visualizing cortical microtubule rearrangements in living epidermal cells / J. Marc, C.L. Granger, J. Brincat, D.D. Fisher et al. // *Plant Cell.* – 1998. – Vol. 10. – P. 1927-1940.

146. McAtee P. A dynamic interplay between phytohormones is required for fruit development, maturation, and ripening / P. McAtee, S. Karim, R. Schaffer, K. David // *Front. Plant Sci.* – 2013. – Vol. 4 (79) – P. 1-7. doi:10.3389/fpls.2013.00079
147. McCurdy D.W. Actin and actin-binding proteins in higher plants / D.W. McCurdy, D.R. Kovar, C.J. Staiger // *Protoplasma.* – 2001. – Vol. 215. – P. 89-104.
148. McCurdy D.W. Reorganization of cortical actin microfilaments and microtubules at preprophase and mitosis in wheat root-tip cells: a double label immunofluorescence study / D.W. McCurdy, B.E.S. Gunning // *Cell Motil. Cytoskeleton.* – 1990. – Vol. 15. – P. 76-87.
149. McDowell J.M. Structure and evolution of the actin gene family in *Arabidopsis thaliana* / J.M. McDowell, S. Huang, A.C. McKinney, Y.-Q. An, R.B. Meagher // *Genetics.* – 1996. – Vol. 142. – P. 587-602.
150. McElroy D. Structural characterization of a rice actin gene / D. McElroy, M. Rothenberg, R. Wu // *Plant Mol. Biol.* – 1990. – Vol. 14 – P. 163-177.
151. McGough A.M. The gelsolin family of actin regulatory proteins: modular structures, versatile functions / A.M. McGough, C.J. Staiger, J.-K. Min, K.D. Simonetti // *FEBS Lett.* – 2003. – Vol. 27620. – P. 1-7.
152. McKinney E.C. The *Arabidopsis* genome contains ancient classes of extremely complex and differentially expressed actin-related protein (ARP) genes / E.C. McKinney, M.K. Kandasamy, P.B. Meagher // *Mol. Biol. Cell.* – 2001. – Vol. 12. – P. 32a-33a.
153. McLean B.G. Tissue-specific expression of divergent actins in soybean root / B.G. McLean, S. Eubanks, R.B. Meagher // *Plant Cell.* – 1990. – Vol. 2. – P. 335-44.
154. Michelot A. The formin homology 1 domain modulates the actin nucleation and bundling activity of *Arabidopsis* FORMIN1 / A. Michelot, C. Guerin, S. Huang, M. Ingouff, S. Richard // *Plant Cell.* – 2005. – Vol. 17. – P. 2296-2313.
155. Miller D. D. Actin microfilaments do not form a dense meshwork in *Lilium longiflorum* pollen tube tips / D. D. Miller, S.A. Lancelle, P. K. Hepler // *Protoplasma.* – 1996. – Vol. 195. – P.123-132.

156. Mur L.A. The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death / L.A. Mur, P. Kenton, R. Atzorn, O. Miersch, C. Wasternack // *Plant Physiol.* – 2006. – V. 140. – P. 249–262.

157. Mineyuki Y. Relationship between preprophase band organization, F-actin and the division site in *Allium* / Y. Mineyuki, B.A. Palevitz // *J. Cell Sci.* – 1990. – Vol. 97. – P. 283-295.

158. Miura K. Cold signaling and cold response in plants / K. Miura, T. Furumoto // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – Vol. 14 (3). – P. 5312-5337.

159. Mizuno K. Induction of cold stability of microtubules in cultured tobacco cells / K. Mizuno // *Plant Physiol.* – 1992. – Vol. 100 (2). – P. 740-748.

160. Molchan T.M. Actomyosin promotes cell plate alignment and late lateral expansion in *Tradescantia* stamen hair cells / T.M. Molchan, A.H. Valster, P.K. Hepler // *Planta.* – 2002. – Vol. 214. – P. 683-693.

161. Monroy A. Cold-induced changes in freezing tolerance, protein phosphorylation, and gene expression (evidence for a role of calcium) / A. Monroy, F. Sarhan, R. Dhindsa // *Plant Physiol.* – 1993. – Vol. 102. – P. 1227-1235.

162. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultered / T. Murashige, F. Scoog // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15. – P. 473-497.

163. Nakaseko Y. Cytoskeleton in the cell cycle / Y. Nakaseko, M. Yanagida // *Nature.* – 2001. – Vol. 412. – P. 291-292.

164. Neill S. Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress / S. Neill, R. Barroso, J. Bright, R. Desikan, J. Hancock, J. Harrison, P. Morris, D. Ribeiro, J. Wilson // *Exp. Bot.* – 2008. – Vol. 59. – P. 165-176.

165. Neill S.J. Nitric oxide signalling in plants / S.J. Neill, R. Desikan, J.T. Hancock // *New Phytol.* – 2003. – Vol. 159. – P. 11-35.

166. Neumann P. Peroxynitrite mediates TNF-alpha-induced endothelial barrier dysfunction and nitration of actin / P. Neumann, N. Gertzberg, E. Vaughan, J.

Weisbrot et al. // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. – 2006. – Vol. 290. – P. 674-684.

167. Nick P. Signaling to the microtubular cytoskeleton in plants / P. Nick // Int. Rev. Cytol. – 1998. – Vol. 184. – P. 33-79.

168. Ohnishi S. Low temperature stress at different flower developmental stages affects pollen development, pollination, and pod set in soybean / S. Ohnishi, T. Miyoshi, S. Shirai // Environ. Exp. Bot. – 2010. – Vol. 69. – P. 56-62.

169. Olien C.R. Ice adhesions in relation to freeze stress / C.R. Olien, M.N. Smith // Plant Physiol. – 1997. – Vol. 60. – P. 499-503.

170. Olinevich O. V. Effect of abscisic acid and cold acclimation on the cytoskeletal and phosphorylated proteins in different cultivars of *Triticum aestivum* L. / O. V. Olinevich, L. P. Khokhlova, M. Raudaskoski // Cell. Biol. Int. – 2000. – Vol. 24 (6). – P. 365-373.

171. Olinevich O.V. The microtubule stability increases in abscisic acid-treated and cold-acclimated differentiating vascular root tissues of wheat / O.V. Olinevich, L.P. Khokhlova, M. Raudaskoski // J. Plant Physiol. – 2002. – Vol. 159 (5). – P. 465-472.

172. Ono S. Regulating of actin filament dynamics by actin depolymerizing factor/cofilin and actin-interacting protein 1: New blades for twisted filaments / S. Ono // Biochemistry. – 2003. – Vol. 121 (4). – P. 1127-1142.

173. Orvar B.L. Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity / B.L. Orvar, V. Sangwan, F.M. Omann, R.S. Dhindsa // Plant J. – 2000. – Vol. 23 (6). – P. 785-794.

174. Ötvös K. Nitric oxide is involved in the activation of cell division and somatic embryo formation in alfalfa / K. Ötvös, T. Pasternak, P. Miskolczi et al. // Plant J. – 2005. – Vol. 43. – P. 849-860.

175. Ouellet F. Regulation of a wheat actin-depolymerizing factor during cold acclimation / F. Ouellet, E. Carpentier, M.J.T.V. Cope, A.F. Monroy, F. Sarhan // Plant Physiol. – 2001. – Vol. 125. – P. 360-368.

176. Pagnussat G.C. Nitric oxide mediates the indole acetic acid induction activation of a mitogen-activated protein kinase cascade involved in adventitious root development / G.C. Pagnussat, M.L. Lanteri, M.C. Lombardo, L. Lamattina // *Plant Physiol.* – 2004. – Vol. 135. – P. 279-286.

177. Palmieri M. Disruption of the F-actin cytoskeleton limits statolith movement in *Arabidopsis* hypocotyls / M. Palmieri, J.Z. Kiss // *J. Exp. Bot.* – 2005. – Vol. 56 (419). – P. 2539-2550.

178. Pedroso M.C. Effect of different gravity environments on DNA fragmentation and cell death in *Kalanchoe* leaves / M.C. Pedroso, D.J. Durzan // *Annals Bot.* – 2000. – Vol. 86. – P. 983-994.

179. Penfield S. Temperature perception and signal transduction in plants / S. Penfield // *New Phytol.* – 2008. – Vol. 179 (3). – P. 615-628.

180. Perez H.E. Actin isoforms in non-infected roots and symbiotic root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. / H.E. Perez, N. Sanchez, L. Vidali, J.M. Hernandez, M. Lara, F. Sanchez // *Planta.* – 1994. – Vol. 193. – P. 51-56.

181. Pivovarova A.V. Effects of small heat shock proteins on the thermal denaturation and aggregation of F-actin / A.V. Pivovarova, V.V. Mikhailova, I.S. Chernikb, N.A. Chebotareva, D.I. Levitsky, N.B. Gusev // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2005. – Vol. 331. – P. 1548-1553.

182. 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 (5). – P. 318-323.

183. 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

184. Pokorna J. Sites of actin filament initiation and reorganization in cold-treated tobacco cells / J. Pokorna, K. Schwarzerova, S. Zelenkova, J. Petrasek, I. Janotova, V. Capkova, Z. Opatrny // *Plant Cell Environ.* – 2004. – Vol. 27. – P. 641-653.

185. Pollard T. D. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments / T. D. Pollard, G. G. Borisy // *Cell*. – 2003. – Vol. 112. – P. 453-465.
186. Porter K. From filaments to function: the role of the plant actin cytoskeleton in pathogen perception, signaling and immunity / K. Porter, B. Day. // *J. Int. Plant Biol.* – 2016. – Vol. 58 (4). – P. 299-311.
187. Pozhvanov G. A. Actin cytoskeleton rearrangements during the gravitropic response of *Arabidopsis* roots / G. A. Pozhvanov, D. V. Suslov, S. S. Medvedev // *Cell Tissue Biol.* – 2013. – 7 (2). – P. 185-191.
188. Pribyl P. Cytoskeletal alterations in interphase cells of the green alga *Spirogyra decimina* in response to heavy metals exposure. The effect of cadmium / P. Pribyl, V. Cepak, V. Zachleder // *Protoplasma*. – 2005. – Vol. 226. – P. 231-240.
189. Provart N.J. Gene expression phenotypes of *Arabidopsis* associated with sensitivity to low temperature / N.J. Provart, P. Gil, W. Chen, B. Han, H.S. Chang, X. Wang, T. Zhu // *Plant Physiol.* – 2003. – Vol. 132. – P. 893-906.
190. Qiao W. Expression of a rice gene OsNOA1 re-establishes nitric oxide synthesis and stress-related gene expression for salt tolerance in *Arabidopsis* nitric oxide-associated 1 mutant *Atnoa1* / W. Qiao, S. Xiao, L. Yu, L.-M. Fan // *Environ. Exp. Bot.* – 2009. – Vol. 65. – P. 90-98.
191. Rosell P. Pollen germination of cherimoya (*Annona cherimola*). *In vivo* characterization and optimization of *in vitro* germination / P. Rosell, M. Herrero, V. Galan Saco // *Sci. Hortic.* – 1999. – Vol. 81. – P. 251-265.
192. Rossanese O.W. A role for actin, Cdc1p, and Myo2p in the inheritance of late Golgi elements in *Saccharomyces cerevisiae* / O.W. Rossanese, C.A. Reinke, B.J. Bevis, A.T. Hammond // *Cell Biol.* – 2001. – Vol. 153. – P. 47-62.
193. Ruelland E. How plants sense temperature / E. Ruelland, A. Zachowski // *Environ. Exp. Bot.* – 2010. – Vol. 69. – P. 225-232.
194. Rymen B. Cold nights impair leaf growth and cell cycle progression in maize through transcriptional changes of cell cycle genes / B. Rymen, F. Fiorani, F. Kartal, K. Vandepoele, D. Inze // *Plant Physiol.* – 2007. – Vol. 143. – P. 1429-1438.



195. Sainsbury F. Developmental reorientation of transverse cortical microtubules to longitudinal directions: a role for actomyosin-based streaming and partial microtubule-membrane detachment / F. Sainsbury, D.A. Collings, K. Mackun, J. Gardiner et al. // *Plant J.* – 2008. – Vol. 56. – P. 116-131.
196. Salmi M.L. Nitric Oxide and cGMP signaling in calcium-dependent development of cell polarity in *Ceratopteris richardii* / M.L. Salmi, K.E. Morris, S.J. Roux, D.M. Porterfield // *Plant Physiol.* – 2007. – Vol. 144. – P. 94-104.
197. Samaj J. Effects of myosin ATPase inhibitor 2,3-butanedione 2-monoxime on distributions of myosins, F-actin, microtubules, and cortical endoplasmic reticulum in maize root apices / J. Samaj, M. Peters, D. Volkmann, F. Baluska // *Plant Cell Physiol.* – 2004. – Vol. 41 (5). – P. 571-582.
198. Sanders D. Calcium at the crossroads of signaling / D. Sanders, J. Pelloux, C. Brownlee, J.F. Harper // *Plant Cell.* – 2002. – Vol. 14. – P. 401-417.
199. Sangwan V. Cold-activation of *Brassica napus* *BN115* promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires Ca<sup>2+</sup> influx / V. Sangwan, I. Foulds, J. Singh, R.S. Dhindsa // *Plant J.* – 2001. – Vol. 27 (1). – P. 1-12
200. Sangwan V. Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways / V. Sangwan, B. L. Örvär, J. Beyerly, H. Hirt, R.S. Dhindsa // *Plant J.* – 2002. – Vol. 31 (5). – P. 629-638.
201. Sauvanet C. Structure, regulation, and functional diversity of microvilli on the apical domain of epithelial cells / C. Sauvanet, J. Wayt, T. Pelaseyed, A. Bretscher. // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 2015. – Vol. 31. – P. 593-621.
202. Schmidt H.W. NO at work / H.W. Schmidt, U. Walter // *Cell.* – 1994. – Vol. 78. – P. 919-925.
203. Schmidt S.M. Cytoskeleton functions in plant-microbe interactions / S.M. Schmidt, R. Panstruga // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* – 2007. – Vol. 71 (4). – P. 135-148.
204. Sheremet Ya.A. Inhibitors of tyrosin kinases and phosphatases as a tool for the investigation of microtubule role in plant cold response / Ya.A. Sheremet, A.I. Yemets, Ya. Blume // *Cytol. Genetics.* – 2012. – Vol. 46 (1). – P. 1-8.

205. Shevchenko G. Organization of cytoskeleton during differentiation of gravisensitive root sites under clinorotation / G. Shevchenko, E. Kordyum // *Adv. Space Res.* – 2005. – Vol. 35. – P. 289-295.
206. Shibaoka H. Plant hormone-induced changes in the orientation of cortical microtubules: alterations in the cross-linking between microtubules and the plasma membrane / H. Shibaoka // *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1994. – Vol. 45. – P. 527-544.
207. Shibasaki K. Auxin response in Arabidopsis under cold stress: underlying molecular mechanisms / K. Shibasaki // *Plant Cell.* – 2009. – Vol. 21. – P. 3823-3838.
208. Shinozaki K. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses / K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki, M. Seki // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2003. – Vol. 6. – P. 410-417.
209. Sisoeva M.I. Effect of short-term daily temperature drops in the processes of formation of organs in *Cucumis sativus* L. under different photoperiods / M.I. Sisoeva, I.I. Slobodyanik, E.G. Sherudilo, N.V. Vasilevskaya // *Biol. Bulletin.* – 2007. – Vol. 34 (6). – P. 644-647.
210. Smertenko A. Post-translational modifications and multiple isoforms of tubulin in *Nicotiana tabacum* L. cells / A. Smertenko, Y.B. Blume, V. Viklický, P. Dráber // *Planta.* – 1997. – Vol. 201. – P. 349-358.
211. Smertenko A.P. Strategies of actin reorganisation in plant cells / A.P. Smertenko, M.J. Deeks, P.J. Hussey // *J. Cell Sci.* – 2010. – Vol. 123. P. 3019-3028.
212. Smith L.G. Divide and conquer: cytokinesis in plant cells / L.G. Smith // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 1999. – Vol. 2. – P. 447-453.
213. Song L. Nitric oxide mediates abscisic acid induced thermotolerance in the calluses from two ecotypes of reed under heat stress / L. Song, W. Ding, J. Shen, Z. Zhang et al. // *Plant Sci.* – 2008. – Vol. 175. – P. 826-832.
214. Sowinski P. Recovery of maize seedling growth, development and photosynthetic efficiency after initial growth at low temperature / P. Sowinski, A.

Rudzinska-Langwald, J. Adamczyk, I. Kubica, J. Fronk // *J. Plant Physiol.* – 2005. – Vol. 162. – P. 67-80.

215. Staiger C. J. Actin filament dynamics are dominated by rapid growth and severing activity in the *Arabidopsis* cortical array / M.B. Sheahan, P. Khurana, X. Wang et al. // *J. Cell Biol.* – 2009. – P. 269-280.

216. Staiger C.J. Regulation of actin dynamics by actin-binding proteins in pollen / C.J. Staiger, N.S. Poulter, J.L. Henty, V.E. Franklin-Tong, L. Blanchoin // *J. Exp. Bot.* – 2010. – Vol. 61. – P. 1969-1986.

217. Stamler J.S. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide / J.S. Stamler // *Cell.* – 1994. – Vol. 78. – P. 931-936.

218. Steponkus P.L. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation / P.L. Steponkus // *Annu. Rev. Plant Physiol.* – 1984. – Vol. 35. – P. 543-584.

219. Stohr C. Generation and possible roles of NO in plant roots and apoplastic space / C. Stohr, W.R. Ullrich // *J. Exp. Bot.* – 2002. – Vol. 53. – P. 2293-2303.

220. Suetsugu N., Wada M. Chloroplast photorelocation movement: a sophisticated strategy for chloroplasts to perform efficient photosynthesis, in: M.M. Najafpour (Ed.) / N. Suetsugu, // *Advances in photosynthesis—fundamental aspects*. Rijeka, Shanghai: InTech. – 2012. – P. 215-234.

221. Sugimoto K. Mutation or drug-dependent microtubule disruption causes radial swelling without altering parallel cellulose microfibril deposition in *Arabidopsis* root cells / K. Sugimoto, R. Himmelspach, R.E. Williamson, G.O. Wasteneys et al. // *Plant Cell.* – 2003. – Vol. 15. – P. 1414-1429.

222. Sugimoto K. New technics enable cooperative analysis of microtubules orientation, wall texture and growth rate in intact roots of *Arabidopsis* / K. Sugimoto, R. E. Williamson, G. O. Westeneys // *Plant Physiol.* – 2000. – Vol.124. – P. 1493 – 1506.

223. Suzuki K. The chilling injury induced by high root temperature in the leaves of rice seedlings / K. Suzuki, M. Okada // *Plant Cell Physiol.* – 2008. – Vol. 49. – P. 433-442..

224. Suzuki N. Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction / N. Suzuki, R. Mittler // *Physiol. Plant.* – 2006. – Vol. 126 (1). – P. 45-51.
225. Tahtiharju S. The induction of kin genes in cold-acclimating *Arabidopsis thaliana*. Evidence of a role for calcium / S. Tahtiharju, V. Sangwan, A. Monroy, R. Dhindsa, M. Borg // *Planta.* – 1997. – Vol. 203. – P. 442-447.
226. Takemoto D. The cytoskeleton as a regulator and target of biotic interactions in plants / D. Takemoto, A.R. Hardham // *Plant Physiol.* – 2004. – Vol. 136 (4). – P. 3864-3876.
227. Theocharis A. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures / A. Theocharis, C. Clement, E.A. Barka // *Planta.* – 2012. – Vol. 235. – P. 1091-1105.
228. Tidball J. G. Inflammatory processes in muscle injury and repair / J.G. Tidball // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2005. – Vol. 288(2). – P. 345—53.
229. Timofeeva O. Cytoskeleton-induced alterations of the lectin activity in winter wheat under cold hardening and abscisic acid (ABA) / O. Timofeeva, L. Khokhlova, N. Belyaeva, Y. Chulkova, L. Garaeva // *Cell Biol. Int.* – 2000. – Vol. 24 (6). – P. 375-381.
230. Toivola D.M. Intermediate filaments take the heat as stress proteins / D.M. Toivola, P. Strnad, A. Habtezion, M.B. Omary // *Trends Cell Biol.* – 2010. – Vol. 20 (2). – P. 79-91.
231. Uchida A. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice / A. Uchida, A.T. Jagendorf, T. Hibino, T. Takabe, T. Takabe // *Plant Sci.* – 2002. – Vol. 163. – P. 515-523.
232. Uribe R. A review of actin binding proteins: new perspectives / R. Uribe, D. Jay // *Mol. Biol. Rep.* – 2009. – Vol. 36. – P. 121-125.
233. Uyttewaal M. Mechanical stress acts via katanin to amplify differences in growth rate between adjacent cells in *Arabidopsis* / M. Uyttewaal, A. Burian, K. Alim et al. // *Cell.* – 2012. – Vol. 149. – P. 439-451.

234. Valderrama R. Nitrosative stress in plants / Valderrama R., F.J. Corpas, A. Carreras et al. // FEBS Lett. – 2007. – Vol. 581. – P. 453-461.
235. Valster A.H. Probing the plant actin cytoskeleton during cytokinesis and interphase by profiling microinjection / A.H. Valster, E.S. Pierson, R. Volenta, P.K. Hepler, A.M.C. Emons // Plant Cell. – 1997. – Vol. 9. – P. 1815-1824.
236. Verbelen J.-P. The root apex of *Arabidopsis thaliana* consists of four distinct zones of growth activities: meristematic zone, transition zone, fast elongation zone, and growth-termination / J.-P. Verbelen, T. De Cnodder, J. Le, K. Vissenberg, F. Bluska // Plant Signal. Behav. – 2006. – Vol. 6 (6). – P. 269-304.
237. Vissenberg K. *In vivo* colocalization of xyloglucan endotransglycosylase activity and its donor substrate in the elongation zone of *Arabidopsis* roots / K. Vissenberg, I.M. Martinez-Vilchez, J.-P. Verbelen, J. G. Miller, S.C. Fry // Plant Cell. – 2000. – Vol. 12. – P. 1229-1237.
238. Voigt B. GFP-ABD2 fusion construct allows *in vivo* visualization of the dynamic actin cytoskeleton in all cells of *Arabidopsis* seedlings / B. Voigt, A.C.J. Timmers, J. Šamaj, J. Müller et al. // Cell Biol. – 2005. – Vol. 84. – P. 595-608.
239. Volkmann D. Actin cytoskeleton in plants: from transport networks to signaling networks / D. Volkmann, F. Buluska // Microsc. Res. Tech. – 1999. – Vol. 47. – P.135-154.
240. Wang Y.S. Green fluorescent protein fusions to *Arabidopsis* fimbrin 1 for spatio-temporal imaging of F-actin dynamics in roots / Y.S. Wang, C.M. Motes, D.R. Mohamalawari, E.B. Blancaflor // Cell Motil. Cytoskel. – 2004. – Vol. 59 (2). – P. 79-93.
241. Wang N. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton / N. Wang, J.P. Butler, D.E. Ingber // Science. – 1993. – 260 (5111). – P.1124-1127.
242. Wang W. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance / W. Wang, B. Vinocur, A. Altman // Planta. – 2003. – Vol. 218. – P. 1-14

243. Wang X. Arabidopsis MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN18 functions in directional cell growth by destabilizing cortical microtubules / X. Wang, L. Zhu, L. Baoquan, C. Wang et al. // *Plant Cell*. – 2007. – Vol. 19. – P. 877-889.
244. Wang X. Proteomic analysis of the cold stress response in the moss, *Physcomitrella patens* / X. Wang, P. Yang, X. Zhang, Y. Xu, T. Kuang, S. Shen, Y. He // *Proteomics*. – 2009. – Vol. 9, (19). – P. 4529-4538.
245. Wang Y.S. 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 / Y.S. Wang, C.M. Yoo, E.B. Blancaflor // *New Phytol.* – 2008. – Vol. 177. – P. 525-536.
246. Wang Y-S. Green fluorescent protein fusions to Arabidopsis fimbrin 1 for spatio-temporal imaging of F-actin dynamics in roots / Y-S. Wang, C.M. Motes, D.R. Mohamalawari, E.B. Blancaflor // *Cell Motil. Cytoskel.* – 2004. – Vol. 59. – P. 79-93.
247. Wasteneys G.O. New views on the plant cytoskeleton / G.O. Wasteneys, Z. Yang // *Plant Physiol.* – 2004. – Vol. 136. – P. 3884-3891.
248. Wasterneys G.O. The cytoskeleton becomes multidisciplinary / G.O. Wasterneys, Yang Z. // *Plant Physiol.* – 2004. – Vol. 136. – P. 3853-3854.
249. Welti R. Profiling membrane lipids in plant stress responses. Role of phospholipase Da in freezing induced lipid changes in *Arabidopsis* / R. Welti, W. Li, M. Li, Y. Sang, H. Biesiada, H.E. Zhou, C.B. Rajashekar, T.D. Williams, X. Wang // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P. 31994-32002.
250. Whitehead L.F. Cytoskeletal arrays in the cells of soybean root nodules: the role of actin microfilaments in the organization of symbiosomes / L.F. Whitehead, D.A. Day, A.R. Hardham // *Protoplasma*. – 1998. – Vol. 203. – P. 194-205.
251. Wilsen KL. Imaging the actin cytoskeleton in growing pollen tubes / K.L. Wilsen, A. Lovy-Wheeler, B. Voigt, D. Menzel // *Plant Reprod.* – 2006. – Vol. 19. – P. 51-62.
252. Wu J.Y. Low temperature inhibits pollen viability by alteration of actin cytoskeleton and regulation of pollen plasma membrane ion channels in *Pyrus*

*pyrifolia* / J.Y. Wu, C. Jin, H.Y. Qu, S.T. Tao, G.H. Xu, J. Wu, H.Q. Wu, S.L. Zhang // Environ. Exp. Bot. – 2012. – Vol. 78. – P. 70-75.

253. Yemets A.I. Microtubule reorganization as a response to realization of no (II) signals in plant cell / A.I. Yemets, Yu.A. Krasnylenko, Ya.A. Sheremet, Ya.B. Blume // Cytol. Genet. – 2009. – Vol. 43 (2). – P. 3-12.

254. Yi K. Cloning and functional characterization of a formin-like protein (AtFH8) from *Arabidopsis* / K. Yi, C. Guo, D. Chen, B. Zhao, B. Ren Yang, // Plant Physiol – 2005. – Vol. 138. – P. 1071-1082.

255. Yoneda A. Disruption of actin microfilaments causes cortical microtubule disorganization and extra-phragmoplast formation at M/G<sub>1</sub> interface in synchronized tobacco cells / A.Yoneda, M. Akatsuka, F. Kumagai, S. Hasezawa // Plant Cell Physiol. – 2004. – Vol. 45. – P. 761-769.

256. Yoshida R. Cool temperature-induced chlorosis in rice plants. Effects of cool temperature on the expression of plastid-encoded genes during shoot growth in darkness / R. Yoshida, A. Kanno, T. Kameya // Plant Physiol. – 1996. – Vol. 112. – P. 585-590.

257. Yu M. Visualization of actin cytoskeletal dynamics during the cell cycle in tobacco *Nicotiana tabacum* L. / M. Yu, M. Yuan, H. Ren // Biol. Cell. – 2006. – Vol. 98 (5). – P. 295-306.

258. Yuan J.S. Plant systems biology comes of age / J.S. Yuan, D.W. Galbraith, S.Y. Dai, P. Griffin et al. / Trends Plant Sci. – 2008. – Vol. 13. – P. 165-171.

259. Zhang A. Nitric oxide induced by hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade involved in antioxidant defense in maize leaves / A. Zhang, M. Jiang, J. Zhang, H. Ding et al. // New Phytol. – 2007. – Vol. 175. – P. 36-50.

260. Zhang S. Sex-related differences in morphological, physiological, and ultrastructural responses of *Populus cathayana* to chilling / S. Zhang, H. Jiang, S. Peng, H. Korpelainen, C. Li // J. Exp. Bot. – 2011. – Vol. 62. – P. 675-686.

261. Zhang Y.Y. Nitric oxide alleviates growth inhibition of maize seedlings under NaCl stress / Y.Y. Zhang, J. Liu, Y.L. Liu // *Nitric Oxide*. – 2004. – V. 30. – P. 455-459..
262. Zhao J.L. Chilling stability of microtubules in root-tip cells of cucumber / J.L. Zhao, X.J. Li, H. Zhang, Y. Li // *Plant Cell Rep.* – 2003. – Vol. 22 (1). – P. 32-37.
263. Zhao M.-G. Glucose-induced inhibition of seed germination in *Lotus japonicus* is alleviated by nitric oxide and spermine / M.-G. Zhao, R.-J. Liu, L. Chen et al. // *Plant Physiol.* – 2009. – Vol. 166. – P. 213-218.
264. Zhao Z. Nitric oxide functions as a signal in salt resistance in the calluses from two ecotypes of reed / Z. Zhao, F. Zhang, J. Guo, Y. Yang, B. Li, L. Zhang // *Plant Physiol.* – 2004. – Vol. 134. – P. 849–857.
265. Zhu J. Involvement of *Arabidopsis* HOS15 in histone deacetylation and cold tolerance / J. Zhu, J.C. Jeong, Y. Zhu, I. Sokolchik, S. Miyazaki, J.K. Zhu, P.M. Hasegawa, H.J. Bohnert, H. Shi, D.J. Yun, R.A. Bressan // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2008. – Vol. 105. – P. 4945-4950.
266. Zhu J.H. Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation / J.H. Zhu, C.H. Dong, J.K. Zhu // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2007. – Vol. 10. – P. 290-295.
267. Zottini M. Nitric oxide affects plant mitochondrial functionality *in vivo* / M. Zottini, E. Formentin, M. Scattolin, F. Carimi et al. // *FEBS Lett.* – 2002. – Vol. 515 (1-3). – P. 75-78.
268. Горюнова И.И. Влияние кадмия на организацию актиновых филаментов в клетках корней *Arabidopsis thaliana* / И.И. Горюнова, Ю.А. Красиленко, В.А. Заславский, А.И. Емец, Я.Б. Блюм // *Доп. НАН України*. – 2014. – Т. 9. – С. 127-133.
269. Кундельчук О.П. Сравнение действия амипрофосметила на структуру клеток корня у чувствительных и устойчивых линий *Nicotiana plumbaginifera* / О.П. Кундельчук, Л.В. Тарасенко, Я.Б. Блюм // *Физиол. Раст.* – 2002. – Т. 49, № 3. – С. 425-430.



270. Плоховская С.Г. Участие актиновых филаментов в ответе клеток корня *Arabidopsis thaliana* на действие низкой температуры / С.Г. Плоховська, В.А. Заславский, А.И. Емец, Я.Б. Блюм // Доп. НАН України. – 2015. – Т. 7. – С. 137-143.

271. 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. Ємец // Фактори експ. еволюції орг. – 2016. – Т. 19. – С. 176-18.

272. Плоховська С.Г. Вивчення ролі NO та актинових філаментів у відповіді рослин на дію холоду / С.Г. Плоховська, Ю.А. Красиленко, А.І. Ємец, Я.Б. Блюм // Фактори експ. еволюції орг. – 2015. – Т. 17. – С. 236-240.

273. Хаблак С. Г. Корневая система *Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh. дикого типа расы Landsberg / С. Г. Хаблак, Я. А. Абдуллаева // Экосистемы, их оптимизация и охрана. – 2010. – Т. 2 (21). – С. 92-98.