

ОТЛИЧИЯ В РЕОРГАНИЗАЦИИ ЦИТОСКЕЛЕТА В КЛЕТКАХ КОРНЕЙ ТАБАКА У ИСХОДНОГО СОРТА И ТРАНСГЕННОЙ ЛИНИИ С ГИПЕРЕЭКСПРЕССИЕЙ *FeSOD1* ПРИ ЗАСОЛЕНИИ*

Е. Н. Баранова^{1,2,3}, И. А. Чабан¹, Е. М. Лазарева^{1,4}, Н. В. Кононенко¹, кандидаты биологических наук, Л. Р. Богоутдинова¹, Л. В. Куренина¹, кандидат биологических наук, А. А. Гулевич¹, П. Н. Харченко¹, Е. А. Смирнова^{1,4}, доктора биологических наук

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, 127434, Москва, ул. Тимирязевская, 42

²Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К. А. Тимирязева, 127434, Москва, ул. Тимирязевская, 49

³Главный ботанический сад им. Н. В. Цицина Российской академии наук, 127276, Москва, ул. Ботаническая, 4

⁴Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, 119234, Москва, Ленинские Горы 1, стр. 12
E-mail: greenpro2007@rambler.ru

Цель исследования – изучить состояние и реакцию элементов цитоскелета (микротрубочек и актиновых филаментов) в клетках корней табака сорта Самсун и его трансгенной линии, экспрессирующей ген *FeSOD1* из *Arabidopsis thaliana* с лидерной последовательностью *rbcS* гороха для локализации продукта гена в хлоропластах, кодирующей Fe зависимую супероксиддисмутазу, конститутивно индуцирующую внутриклеточный окислительный стресс, путем увеличения пула H_2O_2 на продолжительное действие умеренных концентраций NaCl и Na_2SO_4 . Основной гипотезой было выявление положительного защитного действия контролируемого постоянного окислительного стресса на стабильность наиболее чувствительной системы, обеспечивающей рост делением и рост растяжением (тубулиновый цитоскелет), и эффективный внутриклеточный транспорт и стабильность структур (система актиновых филаментов). Электронно-микроскопическая и иммуноцитологическая локализация микротрубочкового цитоскелета и актиновых филаментов с использованием антител к тубулину клон DM1a и актину клон 10-B3, выявленных при обработке вторыми антителами конъюгированными с Alexa-488, позволила установить признаки реорганизации и разборки сети актиновых филаментов при действии NaCl и Na_2SO_4 , как у контрольных, так и у трансгенных растений. При этом у трансгенных растений отличия наблюдали и без воздействия, что свидетельствует об эффективности используемого метода для стимуляции защитного ответа. Состояние системы тубулинового цитоскелета и актиновых филаментов может быть индикатором устойчивости трансгенных по *FeSOD1* растений к засолению. Установлена связь реорганизации цитоскелета с вакуолизацией особенно при Na_2SO_4 .

DIFFERENCES IN CYTOSKELETON REORGANIZATION IN TOBACCO ROOT CELLS IN THE ORIGINAL SAMSUN VARIETY AND A TRANSGENIC LINE WITH *FeSOD1* OVEREXPRESSION UNDER SALINITY

Е. Н. Баранова^{1,2,3}, И. А. Чабан¹, Е. М. Лазарева^{1,4}, Н. В. Кононенко¹, Л. Р. Богоутдинова¹, Л. В. Куренина¹, А. А. Гулевич¹, П. Н. Харченко¹, Е. А. Смирнова^{1,4}

¹All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, 127434, Moskva, ul. Timiryazevskaya, 42

²Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, 127434, Moskva, ul. Timiryazevskaya, 49

³N.V. Tsitsin Main Botanical Garden of Russian Academy of Sciences, 127276, Moskva, ul. Botanicheskaya, 4

⁴Lomonosov Moscow State University, 119234, Moskva, Leninskie Gory 1, str. 12
E-mail: greenpro2007@rambler.ru

The aim of the study was to study the state and reaction of cytoskeletal elements – microtubules and actin filaments, in root cells of Samsun tobacco plants and its transgenic line expressing the *FeSOD1* gene from *Arabidopsis thaliana* with the pea *rbcS* leader sequence for the localization of the gene product in chloroplasts encoding Fe-dependent superoxide dismutase, constitutively inducing intracellular oxidative stress, by increasing the H_2O_2 pool for a long-term effect of moderate concentrations of NaCl and Na_2SO_4 . The main hypothesis was to identify the positive protective effect of controlled constant oxidative stress on the stability of the most sensitive system that provides growth by division and growth by extension – the tubulin cytoskeleton and effective intracellular transport and structural stability – the actin filament system. Localization of the microtubule cytoskeleton and actin filaments using antibodies to tubulin clone DM1a and actin clone 10-B3 by transmission electron microscopy and immunocytologically, detected by treatment with the second antibodies conjugated with Alexa-488, made it possible to establish signs of reorganization and disassembly of the actin filament network under the action of NaCl and Na_2SO_4 as in control and in transgenic plants. At the same time, in transgenic plants, differences can be noted even without exposure, which indicates the effectiveness of this method for stimulating a protective response. These data suggest that the state of the system of the tubulin cytoskeleton and actin filaments may be an indicator of the resistance of *FeSOD1* transgenic plants to salinity. A relationship has also been established between the reorganization of the cytoskeleton and vacuolization, especially with Na_2SO_4 .

Ключевые слова: табак (*Nicotiana tabacum* L.), трансгенные растения, цитоскелет, микротрубочки, актиновые филаменты.

Key words: tobacco (*Nicotiana tabacum* L.), transgenic plants, cytoskeleton, microtubules, actin filaments

Цитоскелет – динамичная система, реагирующая на разные виды внешних воздействий и внутриклеточных сигналов путем регулируемой сборки и разборки, а также реорганизации полимеризованных структур. У растений он участвует в формировании устойчивости к абиотическим и биотическим стрессовым факторам. У высших растений цитоскелет представлен микротрубочками и актиновыми филаментами, которые обеспечивают процессы внутриклеточной подвижности и передачу внутриклеточных сигналов, отвечают за морфогенез клеток и тканей, контролируют локализацию и распределение органелл в цитоплазме, участвуют в делении и поляризованном росте клеток [1, 2].

Абиотическим фактором, который оказывает сильное негативное воздействие на урожайность сельскохозяйственных культур и качество почвы во всем мире считают засоление. Оно вызывает у растений стрессовую реакцию, ведущую к повышению уровня активных форм кислорода в клетках (АФК) и индукции окислительного стресса [3]. В нормальном физиологическом состоянии АФК – важные сигнальные молекулы, которые, в частности, участвуют в регуляции роста пыльцевых трубок, гаметогенезе и развитии зародыша, развитии корневых волосков, функциях устьиц, опосредуют ответ растений на гормональные стимулы [4]. Во время стрессов уровень АФК быстро возрастает, вызывая так называемый окислительный взрыв, а серьезные нарушения гомеостаза АФК и их избыточное образование могут индуцировать процессы клеточной гибели [5]. Система защиты растений от нарушений гомеостаза АФК включает в себя активацию и работу важных сигнальных молекул и молекулярных комплексов – различных дисмутаз, аскорбатпероксидаз и низкомолекулярных антиоксидантов (аскорбат и глутатион). Представители семейства дисмутаз – супероксиддисмутазы FeSOD1, эволюционно консервативные ферменты, которые у высших растений преимущественно функционируют в хлоропластах и пластидах. FeSOD1 отвечает за удаление супероксида, образующегося во время фотосинтетического переноса электронов, так как катализирует быструю дисмутацию супероксида в пероксид водорода и таким образом, участвует в метаболизме активных форм кислорода [6]. Абиотические факторы вызывают у растений стрессовую реакцию, в ходе которой увеличивается уровень выработки в клетках разных вариантов АФК и, если антиоксидантная защита способна справиться с избыточной выработкой АФК, растения переходят в адаптированное к стрессу состояние. Если антиоксидантная защита недостаточно активна и клетки накапливают поврежденные молекулы и структуры, запускаются механизмы программируемой клеточной гибели. Одним из вариантов повышения устойчивости растений к действию стрессовых факторов и защиты от окислительного стресса считают экспрессию дополнительных генов белков, кодирующих компоненты антиоксидантной защиты. Например, продемонстрировано повышение устойчивости к окислительному стрессу у трансгенных растений с гиперэкспрессией чужеродных генов, кодирующих супероксиддисмутазы, аскорбат пероксидазы, каталазу [7]. Однако возникают вопросы, касающиеся влияния продуктов экспрессии чужеродных генов на структурно-функциональную организацию клеток и тканей таких трансгенных растений. Кроме того, неясно, есть ли какие-то морфофункциональные критерии, которые отличают реакцию клеток на стрессовые факторы у трансгенных растений более или менее устойчивых к действию этих факторов.

В связи с изложенным, цель исследования – изучить состояние динамичных клеточных структур –

микротрубочек и актиновых филаментов – в клетках корней табака сорта Самсун и его трансгенной линии, экспрессирующей ген *FeSOD1* и установить, отличается ли организация систем микротрубочек и актиновых филаментов у этих растений после продолжительного действия невысоких концентраций NaCl и Na₂SO₄.

Методика. Объектами исследования служили растения табака (*Nicotiana tabacum* L.) сорта Самсун, а также полученные и охарактеризованные независимые трансгенные растения, экспрессирующие ген *FeSOD1*, который кодирует цитоплазматическую Fe-зависимую супероксиддисмутазу из *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. с сигнальной последовательностью гена *rbcs* гороха (*Pisum sativum* L.) для локализации продукта в пластидах [8]. Все растения ранее поддерживали в культуре *in vitro* в асептических условиях.

Как исходные растения сорта Самсун, выступавшие контролем, так и трансгенные подращивали *in vitro* на среде ½ MS с добавлением 2 % сахарозы, 0,2 мг/л 3-индолилмасляной кислоты и 0,7 % агар до появления зачатков корней. Схожие по размеру растения табака с развивающимися корнями примерно одинаковой величины 2...3 мм асептически пересаживали в пробирки с агаризованной питательной средой MS с добавлением NaCl или Na₂SO₄ в концентрациях 76,5 мМ и 96,2 мМ соответственно, что приводило к увеличению осмотического давления питательной среды до 400 кПа и создавало солевой стресс. Питательную среду без добавления NaCl или Na₂SO₄ использовали в качестве контроля. Культивирование осуществляли в условиях световой комнаты при температуре 23 °С, освещенности 3,0 клк и 16/8 ч (день/ночь) фотопериода. На 8 сутки культивирования растения извлекали из пробирок. Фрагменты корней (длиной до 0,6 см) отсекали острой бритвой и помещали в раствор фиксатора (4 °С). Растительный материал (фрагменты корней пробирочных растений) отмывали для удаления фиксатора и анализировали с использованием иммуноцитохимии, световой и трансмиссионной электронной микроскопии в соответствии с методикой. Концентрация NaCl и Na₂SO₄ и длительность воздействия (8 суток) были выбраны на основании результатов предыдущих исследований [9, 10].

Для цитологических исследований использовали по 30 растений дикого типа и трансгенной линии. Растения разделяли на три группы и подвергали действию изоосмотических концентраций NaCl или Na₂SO₄. Затем 20 растений оставляли для культивирования на среде MS (по 10 растений каждого генотипа), по 20 растений помещали на среду MS 76,5 мМ NaCl и 96,2 мМ Na₂SO₄ соответственно (по 10 растений сорта Самсун и FeSOD1 трансгенной линии).

Иммуноцитохимия. Для выявления микротрубочек и актиновых филаментов использовали кончики корней длиной не более 5 мм. Фиксацию, приготовление препаратов мацерированных клеток корня и иммуноцитохимическое окрашивание осуществляли по методике, предложенной ранее [11]. В качестве первых антител использовали мышинные моноклональные антитела к тубулину клон DM1α (Merck, Германия) и к актину клон 10-B3 (Merck, Германия), в качестве вторых антител – козы антитела к IgG мыши, конъюгированные с Alexa-488 (Termo Fisher Scientific, США). Препараты анализировали и фотографировали с использованием микроскопа Axiovert 200 M (Zeiss, Германия) с объективом Neofluar X 100/1,24, эпифлуоресцентным освещением и набором фильтров. Изображения получали с помощью цифровой камеры AxioCam HRm и обрабатывали в программе Adobe Photoshop 7.

Световая и трансмиссионная электронная микроскопия. Для ультраструктурного анализа кончики корней 1,0...1,5 мм фиксировали в 2,5 %-ном растворе глутарового альдегида на 0,1 М фосфатном буфере Соренсена (pH 7,2) с добавлением 1,5 % сахарозы. После отмывки от фиксирующей смеси образцы дофиксиrowали 1,0 %-ным раствором четырехокси осмия (OsO_4), обезвоживали в этаноле повышающейся концентрации (30, 50, 70, 96 и 100 %), окиси пропилена и заключали в смесь эпон-аралдитных эпоксидных смол. Полутонкие и ультратонкие срезы изготавливали с использованием ультрамикротомы LKB-V. Полутонкие срезы толщиной 1...2 мкм окрашивали 0,1 %-ным водным раствором метиленового синего (Merck, Германия) и анализировали на микроскопе Olympus BX51 (Olympus, Япония), оборудованном камерой Color View II (Soft Imaging System, Германия). Ультратонкие срезы контрастиrowали уранилацетатом и цитратом свинца по Рейнольдсу и анализировали при увеличении $\times 10,000$ с использованием трансмиссионного электронного микроскопа H-300 (Hitachi, Япония).

Результаты и обсуждение. Анализ структуры корней на полутонких срезах с использованием световой микроскопии показал, что в присутствии NaCl и Na_2SO_4 в корнях табака сорта Самсун происходят изменения в вакуолизации клеток коры, причем в случае Na_2SO_4 вакуолизация более выражена (рис. 1 а, б, в). У трансгенных растений структура тканей и коры клеток корня в присутствии NaCl имела менее выраженную вакуолизацию (см. рис. 1 г, д), однако была обнаружена значительная вакуолизация клеток всех тканей в присутствии Na_2SO_4 (см. рис. 1 е), превышающая вакуолизацию в клетках корня при аналогичном воздействии (рис. 1 в).

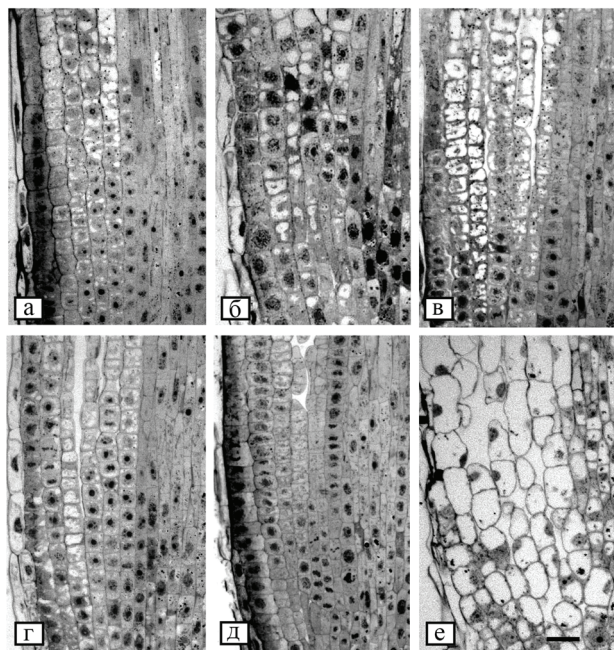


Рис. 1. Полутонкие срезы корней растений табака сорта Самсун (а, б, в) и его трансгенной линии с геном FeSOD1 (г, д, е): а, г – корни растений, выращенных в нормальных условиях; б, д – в присутствии NaCl ; в, е – в присутствии Na_2SO_4 (масштабная линейка 50 мкм).

Система микротрубочек в интерфазных клетках корней табака сорта Самсун имела типичную организацию и была представлена короткими перинуклеарными микротрубочками, радиально отходящими от ядра

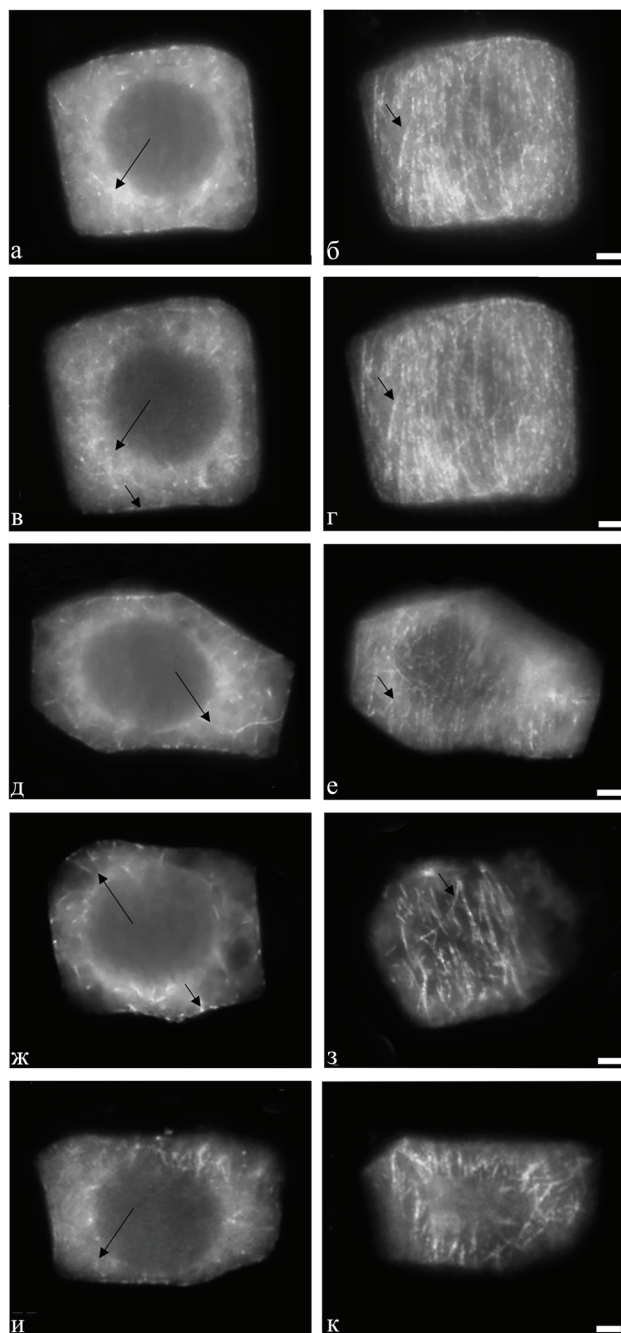


Рис. 2. Иммуноцитохимическое выявление микротрубочек в интерфазных клетках корней табака сорта Самсун (правая колонка – околоядерная зона, левая колонка – зона кортикальной цитоплазмы): а, б – растения контрольной группы; в, г, д, е – через 8 суток выращивания в присутствии NaCl ; ж, з, и, к – через 8 суток выращивания в присутствии Na_2SO_4 (длинными стрелками указаны перинуклеарные пучки микротрубочек, короткими стрелками указаны пучки кортикальных микротрубочек; масштабный отрезок 5 мкм).

(рис. 2 а) и длинными пучками (кортикальными пучками), расположенными в кортикальной зоне цитоплазмы (см. рис. 2 б), вдоль клеточных стенок. В присутствии NaCl существенных изменений в организации перинуклеарных (см. рис. 2 в, д) и кортикальных микротрубочек (см. рис. 2 г, е) не наблюдали. Даже в присутствии Na_2SO_4 перинуклеарные микротрубочки сохраняли упо-

рядоченную радиальную организацию (см. рис. 2 ж, и), однако было отмечено более хаотичное расположение, укрупнение пучков и уменьшение плотности тонкой сети кортикальных микротрубочек (рис. 2 з, к).

Система микротрубочек в интерфазных клетках трансгенных растений табака имела такую же организацию, как и у табака сорта Самсун (рис. 3 а, б) и не имела патологических изменений в присутствии NaCl (см. рис. 3 в, г, д, е). В присутствии Na_2SO_4 организация перинуклеарных микротрубочек также не менялась (см. рис. 3 ж, и), но происходило нарушение упорядоченной организации, значительное прореживание сети кортикальных микротрубочек и утрата их параллельного расположения вдоль клеточной стенки (см. рис. 3 з, к).

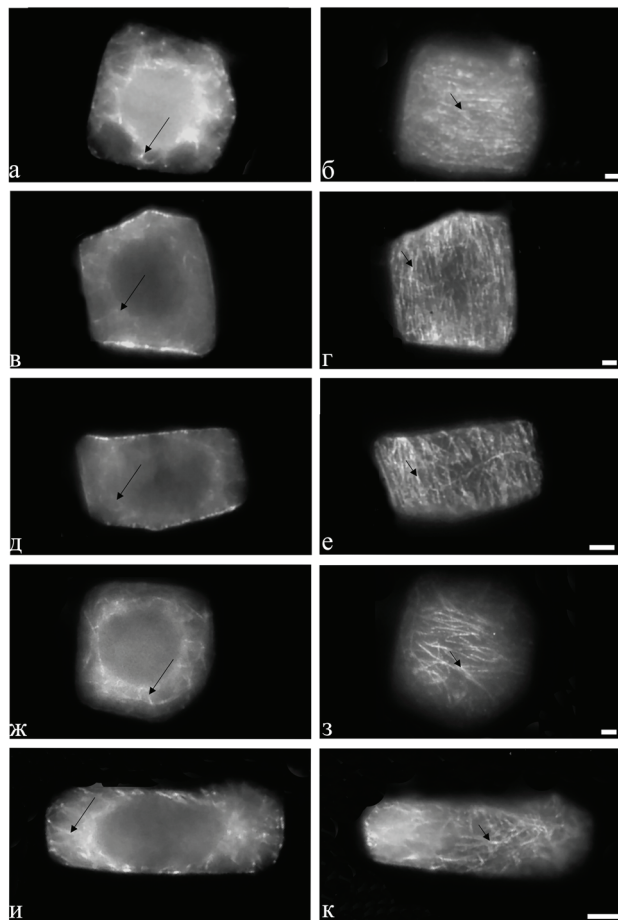


Рис. 3. Иммуноцитохимическое выявление микротрубочек в интерфазных клетках корней растений табака трансгенной линии с геном *FeSOD1* (правая колонка – околоядерная зона, левая колонка – зона кортикальной цитоплазмы): а, б – растения контрольной группы; в, г, д, е – растения через 8 суток выращивания в присутствии NaCl; ж, з, и, к – растения через 8 суток выращивания в присутствии Na_2SO_4 (длинными стрелками указаны перинуклеарные пучки микротрубочек, короткими – пучки кортикальных микротрубочек; масштабный отрезок 5 мкм).

Несмотря на изменения в организации микротрубочек интерфазных клеток у растений табака сорта Самсун и его трансгенной линии при действии Na_2SO_4 , дестабилизирующих нарушений в организации микротрубочек в делящихся клетках не наблюдали. При изученных концентрациях в корнях отмечали нормально делящиеся клетки на всех фазах митоза, способных нарушить нормальный рост и вызвать асимметрию в ростовых процессах.

Актиновые филаменты в интерфазных клетках табака сорта Самсун были представлены пучками, отходящими от ядра и/или окружающими ядро (рис. 4 а, в) и длинными переплетающимися пучками, пересекающими цитоплазму (см. рис. 4 б, г). В присутствии NaCl (см. рис. 4 д, е, ж, з) и Na_2SO_4 (см. рис. 4 и, к, л, м) были обнаружены значительные изменения в плотности распределения диспергированного актина с сохранением околоядерных и цитоплазматических пучков актиновых филаментов.

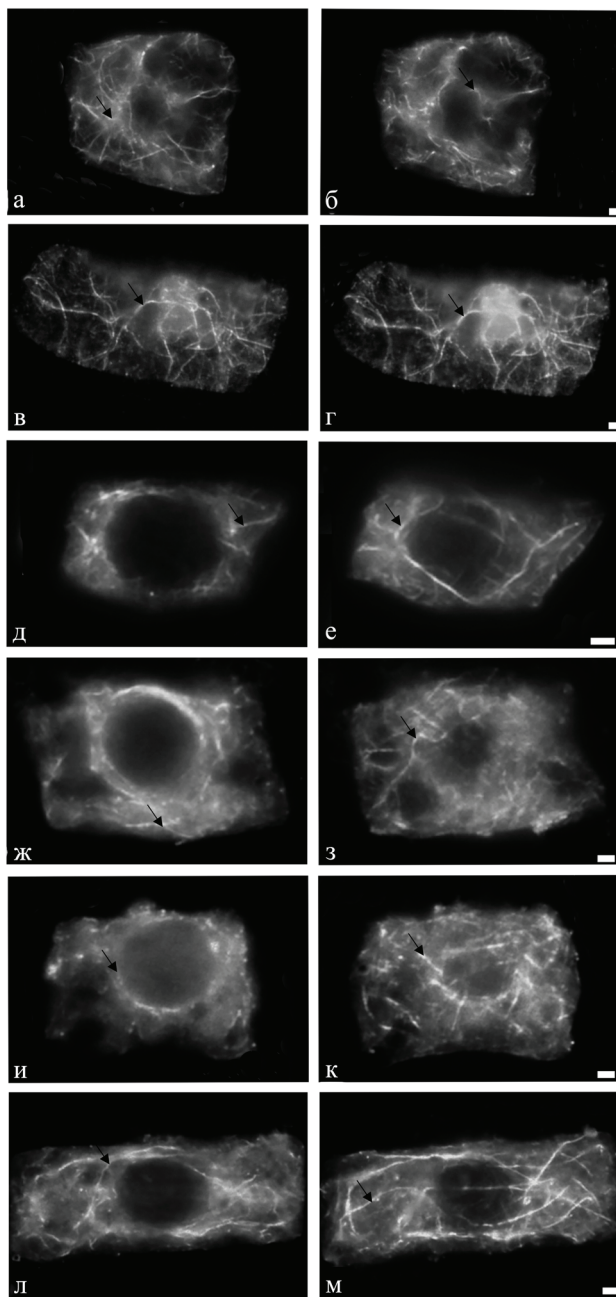


Рис. 4. Иммуноцитохимическое выявление актиновых филаментов в интерфазных клетках корней растений табака сорта Самсун (правая колонка – околоядерная зона, левая колонка – зона кортикальной цитоплазмы): а, б, в, г – растения контрольной группы; д, е, ж, з – растения через 8 суток выращивания в присутствии NaCl; и, к, л, м – растения через 8 суток выращивания в присутствии Na_2SO_4 (стрелками указаны пучки актиновых филаментов, масштабный отрезок 5 мкм).

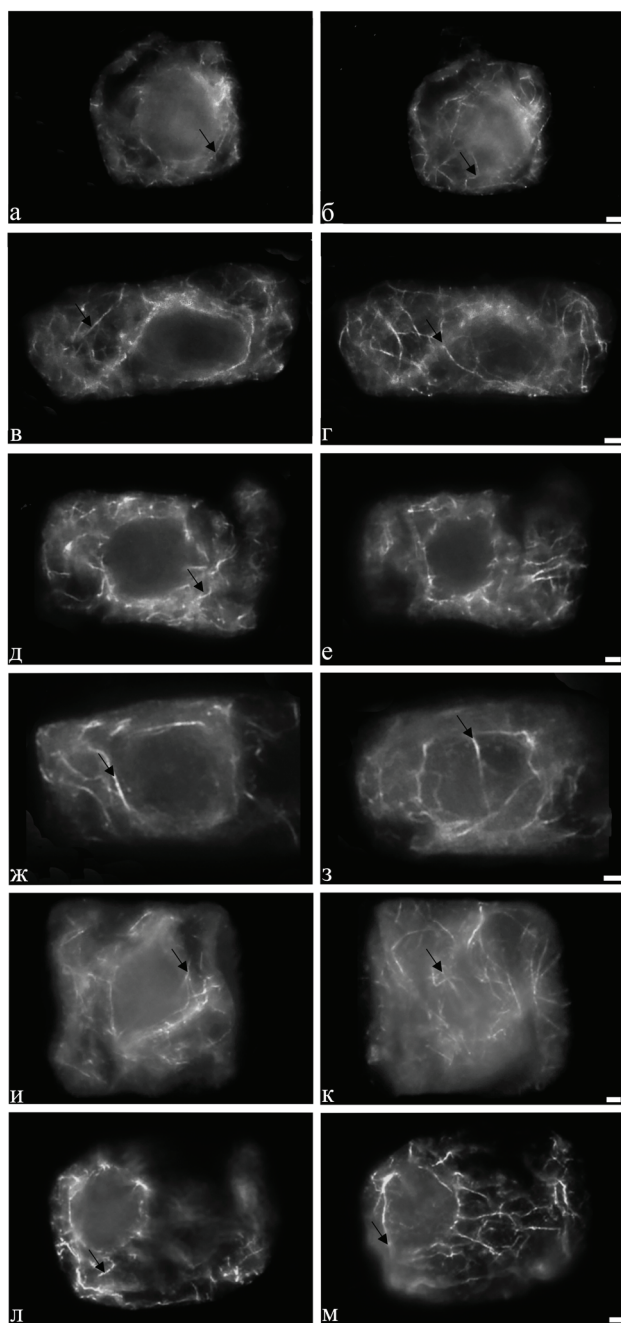


Рис. 5. Иммуноцитохимическое выявление актиновых филаментов в интерфазных клетках корней растений табака трансгенной линии с геном *FeSOD1* (правая колонка – околядерная зона, левая колонка – зона кортикальной цитоплазмы): а, б, в, г – растения контрольной группы; д, е, ж, з – растения через 8 суток выращивания в присутствии NaCl ; и, к, л, м – растений через 8 суток выращивания в присутствии Na_2SO_4 (стрелками указаны пучки актиновых филаментов; масштабный отрезок 5 мкм).

Система актиновых филаментов в интерфазных клетках корней трансгенных растений имела типичную организацию (рис. 5 а, б, в, г), сходную с клетками табака сорта Самсун. Однако в присутствии NaCl (см. рис. 5 д, е, ж, з) и особенно Na_2SO_4 (см. рис. 5 и, к, л, м) плотность сети актиновых филаментов, образованной околядерными (см. рис. 5 д, ж, и, л) и цитоплаз-

матическими (рис. 5 е, з, к, м) пучками, была заметно снижена. Они становились короткими, извилистыми и утолщенными. Можно заключить, что у трансгенных растений при засолении происходит нарушение организации актинового цитоскелета (см. рис. 5), которое ведет к таким изменениям, как нарушение морфогенеза вакуолей (см. рис. 1).

Использованный методический подход визуализации элементов цитоскелета не позволяет количественно оценить наблюдаемые эффекты. Это связано с тем, что выделение клеток сопровождается нарушением их целостности, причем на различных препаратах соотношение поврежденных и целых клеток разное. Именно поэтому метод подходит для визуализации качественных, но не количественных параметров.

Трансмиссионная электронная микроскопия – один из немногих методов, позволяющих выявить атипичные полимерные образования, которые не могут быть идентифицированы путем иммуноцитохимического анализа, так как химически состоят из тех же белков, но имеют существенные структурные различия.

Анализ ультраструктуры интерфазных клеток корней табака сорта Самсун и его трансгенной линии методом электронной микроскопии показал, что микротрубочки обычно выявляются в кортикальной цитоплазме вблизи клеточной стенки (рис. 6 а, б). Многочисленные микротрубочки присутствуют в кортикальной цитоплазме и в клетках корней растений, выращенных в присутствии NaCl и Na_2SO_4 . Однако в этих условиях в клетках корней табака сорта Самсун и у трансгенных растений, наряду с микротрубочками, в цитоплазме выявляются отличающиеся по размеру, форме и плотности фибриллярные тяжи, состоящие из множества прямых или извитых нитей (см. рис. 6 в, г, д, е). Упаковка нитей в тяжах отличается по плотности (см. рис. 6 в, д, е), но на поперечных срезах (см. рис. 6 г) видно, что нити в составе пучка имеют упорядоченную ячеистую упаковку, характерную для описанных в литературе атипичных полимеров – паракристаллов тубулина [12].

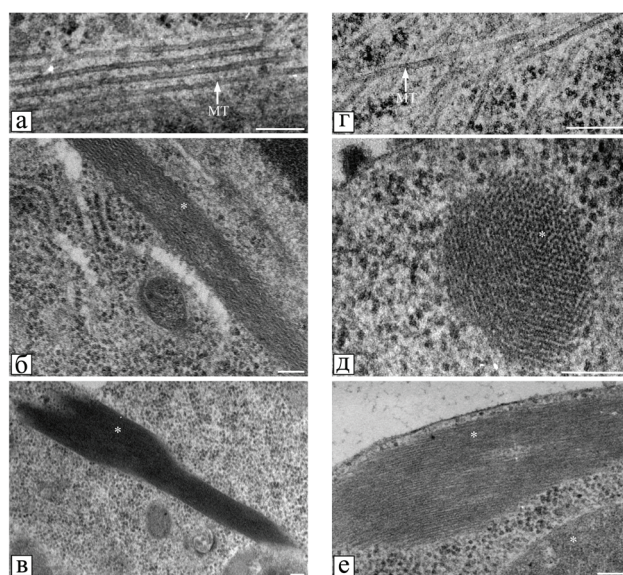


Рис. 6. Ультраструктура микротрубочек (МТ) и фибриллярных паракристаллических пучков (обозначены *) в клетках корней табака сорта Самсун (а, б, в) и его трансгенной линии с геном *FeSOD1* (г, д, е). Паракристаллические пучки присутствуют в клетках корней только при выращивании растений в присутствии NaCl (в, г) и Na_2SO_4 (д, е). Масштабные линейки – 250 нм.

Результаты наших исследований свидетельствуют, что выращивание в течение 8 суток в присутствии NaCl и Na_2SO_4 не приводит к существенным деструктивным процессам в системе микротрубочек в клетках корней табака сорта Самсун и его трансгенной линии. При этом у трансгенных растений плотность системы актиновых филаментов при засолении уменьшается, а у не трансгенных растений меняется не значительно.

В то же время, в клетках корней не трансгенных и трансгенных растений редукцию плотности системы микротрубочек наблюдали только при действии Na_2SO_4 . Уменьшение плотности системы микротрубочек свидетельствует о том, что происходит деполимеризация их определенной субпопуляции. Косвенным свидетельством деполимеризации (разборки) может быть образование атипичных полимерных структур, которые мы обнаружили методом трансмиссионной электронной микроскопии. Поскольку изменений плотности системы микротрубочек при действии NaCl не выявлено, но атипичные полимерные структуры все равно формировались, можно предположить, что NaCl оказывает более мягкое, по сравнению с Na_2SO_4 , воздействие на микротрубочки или деполимеризация идет на более низком уровне.

Обнаруженные атипичные полимерные структуры по морфологическим признакам сходны с тубулиновыми агрегатами, появляющимися при экспериментально индуцированном дисбалансе АФК [12, 13]. Тубулиновые агрегаты были выявлены и охарактеризованы много лет назад как в животных, так и в растительных клетках, при действии ингибиторов полимеризации микротрубочек растительного происхождения – колхицина [14], винбластина, винкристина [15]. В частности, было показано, что обработка колхицином клеток растений в течение короткого времени вызывала разборку микротрубочек, однако длительная обработка (до нескольких суток) приводила к формированию атипичных фибриллярных структур, не имеющих сходства с микротрубочками, но состоящих из тубулина [11, 14]. Интересно, что полимерные тубулиновые агрегаты, индуцированные в клетках растения колхицином, по структуре идентичны тубулиновым паракристаллам, которые формировались в клетках животных при действии растительных алкалоидов винбластина и винкристина [15]. Роль атипичных тубулиновых агрегатов в клетках растений до сих пор не ясна. В связи с тем, что тубулиновые паракристаллические образования выявили в клетках пшеницы после гиперосмотического стресса, высказано предположение о том, что сборка таких структур может быть неспецифической реакцией и/или базовым ответом клеток на различные стрессовые факторы [9].

Гомеостаз АФК представляет собой важный фактор в регуляции жизни растений, в том числе, путем влияния на состояние цитоскелета. Предполагают, что взаимодействие АФК и микротрубочек способствует восприятию стрессовой ситуации и запускает соответствующие сигнальные механизмы и клеточную реакцию. Оказалось, что в ходе этого процесса важную роль играет ремоделирование тубулинового цитоскелета. Оно включает в себя рекрутирование определенных белков семейства MAP с помощью MAPK сигнального каскада и регуляторных механизмов, действующих на транскрипционном и посттранскрипционном уровне [13]. При этом изменяется и организация системы микротрубочек. Наблюдения за проростками *Arabidopsis*, которые инкубировали

до 40 часов в присутствии 25...125 mM NaCl [16] показали, что на ранних этапах воздействия кортикальные микротрубочки разбираются, а затем снова собираются и реорганизуются в новые системы. Стабилизация микротрубочек паклитаксолом приводила к усилению гибели проростков в присутствии NaCl, в то время как разрушение микротрубочек оризалином или пропизамидом спасало проростки от гибели. Более того, проростки, у которых произошла реорганизация кортикальных микротрубочек, не реагировали на солевой стресс. Такие результаты свидетельствуют о том, что динамика микротрубочек (деполимеризация и реорганизация) важны для повышения устойчивости растений к засолению [16]. Есть мнение, что динамическая регуляция тубулинового цитоскелета – часть клеточного механизма, направленного на восстановление гомеостаза АФК [13].

Реакция актинового цитоскелета растений на действие абиотических факторов изучена намного меньше. Например, была исследована роль актиновых филаментов в солеустойчивости проростков *Arabidopsis thaliana* [17]. У проростков в присутствии 150 mM NaCl наблюдали сборку филаментов и формирование пучков, а вот обработка 250 mM NaCl первоначально индуцировала сборку филаментов, но затем происходила их разборка. То есть, сборка и формирование пучков актина индуцируются на начальных стадиях солевого стресса, а после сильного воздействия полимеризация филаментов подавляется. Стимуляция сборки филаментов с использованием фаллоидина уменьшала гибель проростков от солевого стресса, тогда как блокирование сборки с помощью латрункулина А и цитохалазина D приводило к снижению их выживаемости. Кроме того, полимеризация актиновых филаментов обеспечивала выживание растений, подвергшихся осмотическому стрессу. Эти данные свидетельствуют о том, что ремоделирование актина участвует в обеспечении устойчивости растений к солевому и осмотическому стрессу [17].

Взаимосвязь изменений динамики актинового цитоскелета с уровнем АФК также была продемонстрирована у проростков *Arabidopsis thaliana* [18]. Обработка 200 mM NaCl нарушала динамику преобразования актиновых филаментов и повышала уровень АФК в клетках зоны растяжения корня, а обработка ингибитором активности НАДФН-оксидазы, дифенилениодонием, блокировала увеличение АФК в условиях солевого стресса. Роли динамики актина и НАДФН-оксидаз в образовании АФК были дополнительно проанализированы с использованием латрункулина В (вызывает разборку актиновых филаментов) и джасплакинолида (вызывает сборку актиновых филаментов). Было обнаружено, что оба агента повышают уровень АФК после обработки NaCl. Таким образом, динамика актинового цитоскелета участвует в регуляции уровня АФК в условиях солевого стресса.

Обращает на себя внимание тот факт, что нарушение полимеризации актиновых филаментов обработкой латрункулином А и цитохалазином D вызывало снижение выживаемости проростков *Arabidopsis*, а устранялся этот эффект стабилизацией актиновых филаментов с использованием фаллоидина [18]. Однако в другом исследовании [12] было показано, что латрункулин и джасплакинолид, обладающие противоположными эффектами (то есть полимеризацией и деполимеризацией актина соответственно) повышают уровень АФК в клетках зоны растяжения корня *Arabidopsis* при солевом стрессе. Высказано

предположение, что нарушение динамики актина – основная причина увеличения АФК в условиях солевого стресса [18].

В то же время пока остается неясным, влияет ли динамика актина на гомеостаз АФК, или, наоборот, дисбаланс АФК вызывает ремоделирование актинового цитоскелета при действии абиотических стрессовых факторов. Однако при биотическом стрессе именно повышение уровня АФК вызывает реорганизацию актинового цитоскелета, что не исключает и существования петли обратной связи между динамикой актина и выработкой АФК [19]. Результаты более поздних исследований указывают на то, что деполимеризация актинового цитоскелета способствует усилению устойчивости растений к биотическим факторам благодаря активации сигнального пути с участием салициловой кислоты [20]. Если предположить, что сходные механизмы могут быть задействованы и при действии таких абиотических факторов как засоление, то можно выдвинуть предположение, что уменьшение плотности расположения актиновых филаментов (разборка и ремоделирование), которое наблюдали при засолении у трансгенных по *FeSOD1* растений табака, указывает на их повышенную устойчивость к засолению. В этом случае, состояние системы актиновых филаментов может служить критерием для оценки устойчивости растений к действию абиотических стрессовых факторов, которые вызывают увеличение выработки АФК.

Выводы. Таким образом, актиновый и тубулиновый цитоскелет – чувствительная к засолению динамическая система. Его изменение напрямую связано с изменением вакуолизации клеток корня. Трансгенные растения незначительно отличались от исходных в организации перенуклеолярного и кортикального микротрубочкового цитоскелета и системе организации околядерных и цитоплазматических пучков актиновых филаментов. Na_2SO_4 оказывал более значимое воздействие на обе системы цитоскелета, как у трансгенных растений, так и растений дикого типа, при равных изотонических воздействиях. Влияние NaCl было практически незаметным на уровне модификаций цитоскелета у трансгенных растений, что свидетельствует о высокой эффективности их защиты. Можно предположить, что гипертрофированное усиление вакуолизации под воздействием Na_2SO_4 связано с активацией системы локализации ионов натрия в вакуолях из-за того, что при равном изотоническом давлении количество ионов натрия при индукции засоления Na_2SO_4 удваивается.

Литература.

1. Nick P. Microtubules, signaling, and biotic stress // *The Plant Journal*. 2013. No. 75. P. 309–323. doi: 10.1111/tpj.12102.
2. Ma X., Liu M. The microtubule cytoskeleton acts as a sensor for stress response signaling in plants // *Molecular Biology Reports*. 2019. No. 46. P. 5603–5608. doi: 10.1007/s11033-019-04872-x.
3. Baxter A., Mittler R., Suzuki N. ROS as key players in plant stress signaling // *J Exp Bot*. 2014. Vol. 65. No. 5. P. 1229–2014. doi: 10.1093/jxb/ert375.
4. Mhamdi A., Van Breusegem F. Reactive oxygen species in plant development // *Development*. 2018. Vol. 145. No. 5. Article dev164376. URL: <https://journals.biologists.com/dev/article/145/5/dev164376/48468/Reactive-oxygen-species-in-plant-development> (дата обращения 25.08.2023). doi: 10.1242/dev.164376.
5. ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants / V. Petrov, J. Hille, B. Mueller-Roeber, et al. // *Frontiers in Plant Science*. 2015. Vol. 6. No. 69. URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.00069/full> (дата обращения 25.08.2023). doi: 10.3389/fpls.2015.00069.
6. Pilon M., Ravet K., Tapken W. The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010. Vol. 1807. No. 8. P. 989–998. doi: 10.1016/j.bbabo.2010.11.002.
7. Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses / A. Sofo, A. Scope, M. Nuzzaki, et al. // *Int J Mol Sci*. 2015. No. 16. P. 13561–13578. doi: 10.3390/ijms160613561.
8. Activity of the photosynthetic apparatus and antioxidant enzymes in leaves of transgenic *Solanum lycopersicum* and *Nicotiana tabacum* plants, with *FeSOD1* gene / E. N. Baranova, E. K. Serenko, T. I. Balachina, et al. // *Russian Agricultural Science*. 2010. Vol. 36. No. 4. P. 242–249. doi: 10.3103/S1068367410040075.
9. Formation of atypical tubulin structures in plant cells as a nonspecific response to abiotic stress / E. N. Baranova, N. K. Christov, L. V. Kurenina, et al. // *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 2016. Vol. 22. No. 6. P. 987–992. URL: <https://www.agrojournal.org/22/06-17.pdf> (дата обращения 25.08.2023).
10. Root cells structural changes induced by salt stress are mitigated in *FeSOD* transgenic tomato plants / L. R. Bogoutdinova, E. M. Lazareva, I. A. Chaban, et al. // *Biology*. 2020. Vol. 9. No. 9. Article 297. URL: <https://www.mdpi.com/2079-7737/9/9/297> (дата обращения 25.08.2023). doi: 10.3390/biology9090297.
11. Time and cell-cycle dependent formation of heterogeneous tubulin arrays induced by colchicine in *Triticum aestivum* root meristem / E. M. Lazareva, V. Y. Polyakov, Y. S. Chentsov, et al. // *Cell Biol Intern*. 2003. Vol. 27. No. 8. P. 633–646. doi: 10.1016/S1065-6995(03)00120-3.
12. Disturbance of reactive oxygen species homeostasis induces atypical tubulin polymer formation and affects mitosis in root-tip cells of *Triticum turgidum* and *Arabidopsis thaliana* / P. Livanos, B. Galatis, H. Quader, et al. // *Cytoskeleton*. 2012. No. 69. P. 1–21. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cm.20538> (дата обращения 25.08.2023). doi: 10.1002/cm.20538.
13. Livanos P., Galatis B., Aposolakis P. The interplay between ROS and tubulin cytoskeleton in plants // *Plant Signaling Behav*. 2014. No. 9. Article e28069 *Landes Bioscience*. URL: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/psb.28069> (дата обращения 25.08.2023). doi: 10.4161/psb.28069.
14. Bennett M. D., Smith J. B. Colchicine-induced paracrystals in the tapetum of wheat anthers // *J Cell Sci*. 1979. No. 38. P. 23–32. doi: 10.1242/jcs.38.1.23.
15. Masurovsky E. B., Horwitz S. B. Ultrastructural effects of colchicine, vinblastine and taxol in drug-sensitive and multidrug-resistant J774.2 cells // *Protoplasma*. 1989. No. 148. P. 138–149. doi: 10.1007/BF02079333.
16. Wang C., Li J., Yuan M. Salt tolerance requires cortical microtubule reorganization in *Arabidopsis* // *Plant Cell Physiol*. 2007. No. 48. P. 1534–1547. doi: 10.1093/pcp/pcm123.
17. The microfilament cytoskeleton plays a vital role in salt and osmotic stress tolerance in *Arabidopsis* / C. Wang, L. Zhang, M. Yuan, et al. // *Plant Biology*. 2009. Vol. 12. No. 1. P. 70–78. doi: 10.1111/j.1438-8677.2009.00201.x.
18. Disrupted actin dynamics trigger an increment in the reactive oxygen species levels in the *Arabidopsis* root

- under salt stress* / S. G. Liu, D. Z. Zhu, G. H. Chen, et al. // *Plant Cell Rep.* 2012. No. 31. P. 1219–1226. doi: 10.1007/s00299-012-1242-z.
19. *Lipid signaling requires ROS production to elicit actin cytoskeleton remodelling during plant innate immunity* / L. Cao, W. Wang, W. Zhang, et al. // *Int J Mol Sci.* 2022. No. 23. Article 2447. URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/5/2447> (дата обращения 25.08.2023). doi: 10.3390/ijms23052447.
20. *Actin depolymerization is able to increase plant resistance against pathogens via activation of salicylic acid signalling pathway* / H. Leontovycova, T. Kalachova, L. Trda, et al. // *Scientific Reports.* 2019. No. 9. Article 10397. URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-46465-5> (дата обращения 25.08.2023). doi: 10.1038/s41598-019-46465-5.

Поступила в редакцию 06.08.2023

После доработки 26.08.2023

Принята к публикации 19.09.2023