НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
«ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА ГЕНОМІКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ»

Цикл наукових праць на здобуття щорічної премії Президента України для молодих вчених

«РОЛЬ ЦИТОСКЕЛЕТУ В ОПОСЕРЕДКУВАННІ ДІЇ АБІОТИЧНИХ ФАКТОРІВ НА РОСЛИННУ КЛІТИНУ»

КРАСИЛЕНКО Юлія Андріївна — к. б.н., науковий співробітник відділу клітинної біології та біотехнології ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»

ГОРЮНОВА Інна Іванівна — к.б.н., науковий співробітник відділу клітинної біології та біотехнології ДУ «Інституту харчової біотехнології та геноміки НАН України»

ПЛОХОВСЬКА Світлана Григорівна — провідний інженер відділу геноміки та молекулярної біотехнології ДУ «Інституту харчової біотехнології та геноміки НАН України»

Київ-2017

Метою даного циклу робіт було:

- з'ясувати залежність процесів росту та диференціації клітин головних коренів проростків *Arabidopsis thaliana* і, відповідно, організації мікротрубочок від дії модуляторів вмісту екзогенного і ендогенного NO та маркеру активності NO 3-нітротирозину, а також дослідити роль NO у відповіді рослинної клітини на дію УФ-В;
- показати залежність процесів росту і морфогенезу клітин головних коренів проростків *A. thaliana* і, відповідно, організації мікротрубочок і актинових філаментів від впливу металів-полютантів Cd^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+} і Zn^{2+};
- продемонструвати залежність процесів росту і морфогенезу клітин головних коренів проростків *A. thaliana* і, відповідно, організацію та орієнтацію актинових філаментів від впливу холодового фактору та з'ясувати функціональні наслідки цього абіотичного фактору на рослинну клітину.

Методи дослідження: світлова та люмінісцентна мікроскопія, лазерна скануюча конфокальна мікроскопія, біохімічні методи, метод культури клітин, методи статистичного аналізу,

Практичні результати досліджень. Отримані результати щодо впливу модуляторів вмісту NO на ріст та морфологію головних коренів *A. thaliana*, а також організацію мікротрубочок у їх клітинах можуть бути використані для подальшого вивчення молекулярних та клітинних механізмів стійкості рослин за участі NO і для пошуку нових біологічно активних сполук, що впливають на компоненти рослинного цитоскелету. Закладено підґрунтя для вивчення можливості використання донору NO нітропрусиду натрію у біотехнології з метою регуляції росту рослин та посилення їх стійкості до дії різноманітних стресових факторів, зокрема, УФ-В. На основі підтвердження факту регуляції NO процесів диференціації кореня, зокрема, формування бічних коренів і кореневих волосків, запропоновано використання екзогенних донорів NO для укорінення регенерантів у культурі *in vitro*. Отримані результати, щодо особливостей впливу Cd^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+} і Zn^{2+}, на ріст і морфологію головних коренів *A. thaliana*, а також на організацію мікротрубочок та актинових філаментів можуть бути використані для подальшого дослідження клітинних та молекулярних механізмів стійкості рослин до інтоксикації токсичними концентраціями металів, що дасть змогу розробити нові більш ефективні стратегії для моніторингу і боротьби із забрудненням ґрунтів цими токсичними металами. Отриманні дані щодо впливу низьких температур мають важливе значення для розуміння механізмів дії цього абіотичного фактору на рослинний організм в цілому і буде слугувати поштовхом для створення практичних підходів для пошуку зменшення негативного впливу холоду на рослину.

Актуальність проведеного дослідження

Найпоширеніші абіотичні фактори:

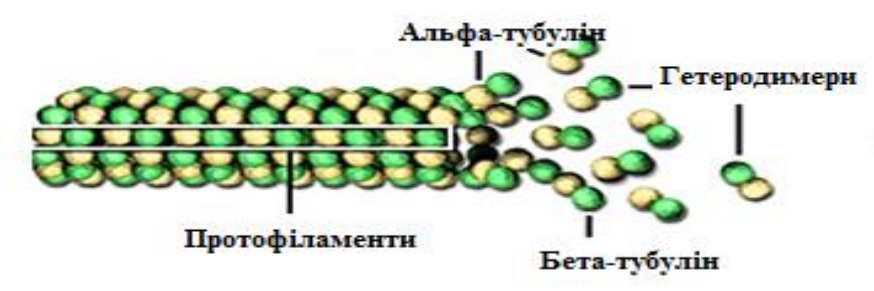
УФ-В

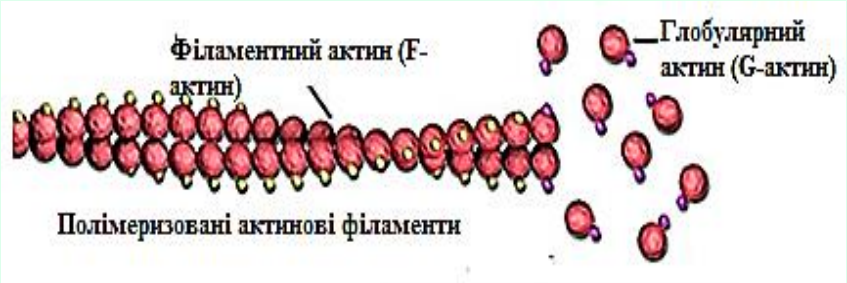
Токсичні метали (кадмій, свинець, нікель, хром та ін.)

Низькі температури

Розробка нових, більш ефективних та економічно вигідних стратегій боротьби з негативними наслідками впливу вказаних абіотичних факторів на рослини. На основі отриманих даних стосовно молекулярних та клітинних механізмів цих впливів визначає надзвичайну актуальність даних досліджень.

Будова і функції цитоскелету у рослинних клітин





Мікротрубочки

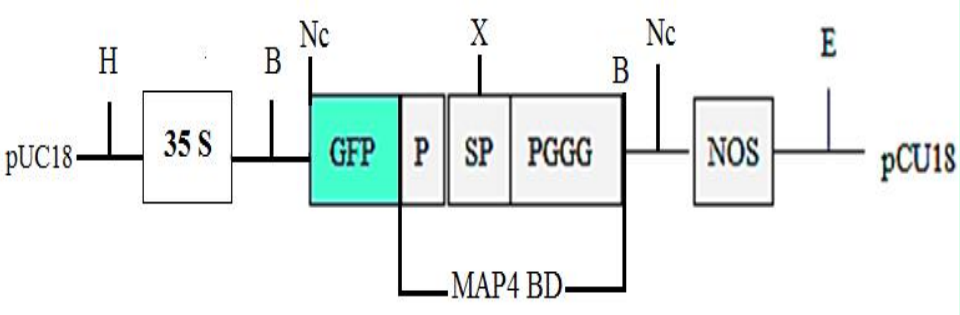
- Поділ клітин
- Форма клітин
- Позиціювання органел
- Продихова активність

Мікрофіламенти

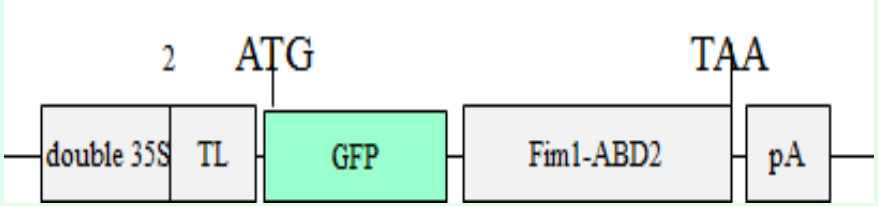
- Поділ клітин
- Мікрокомпартментал ізація
- Форма клітин
- Везикулярний транспорт

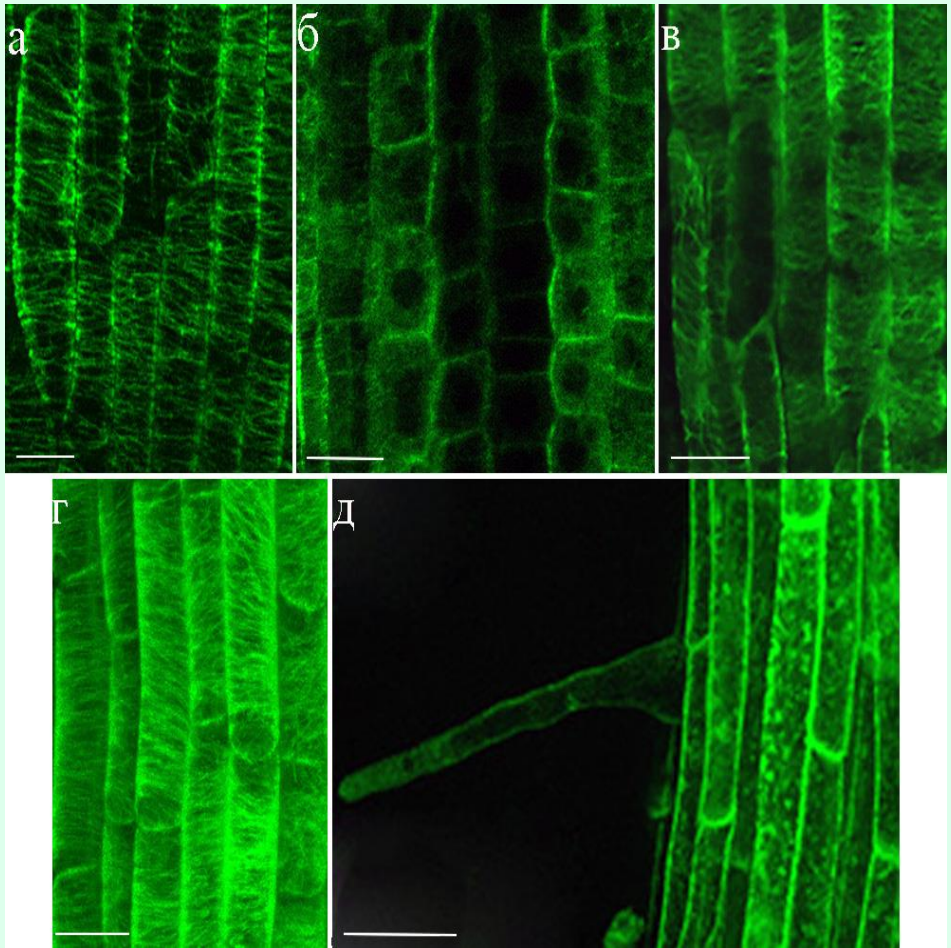
Об’єкти дослідження

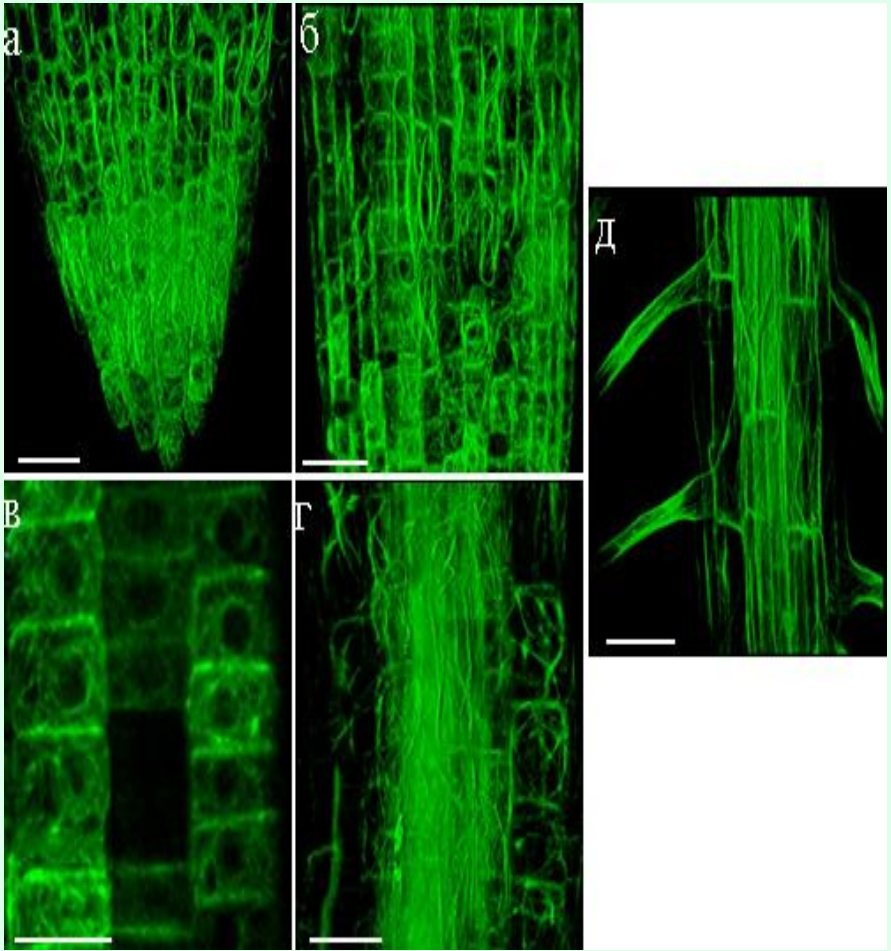
A.thaliana GFP-MAP4



A.thaliana GFP-FABD2

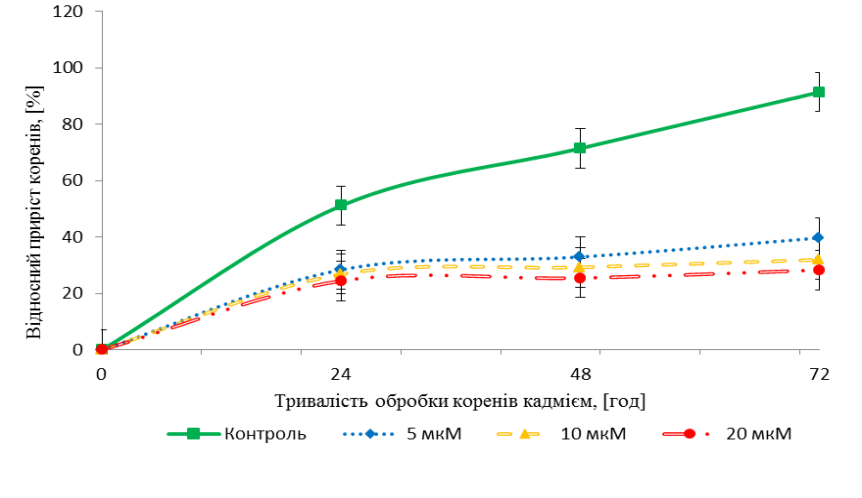






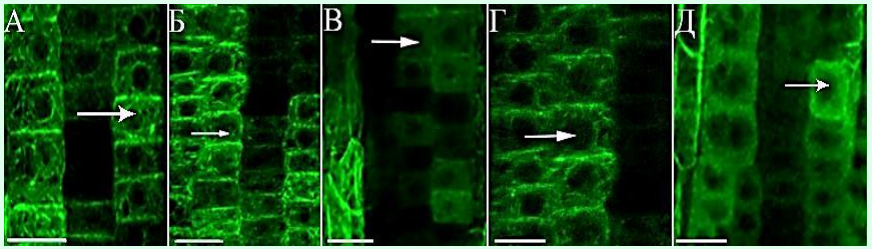
Вплив іонів кадмію на ріст, морфологію головних коренів *A. thaliana* та організацію мікротрубочок та мікрофіламентів в їх клітинах

Вперше було показано, дозо- та часозалежне інгібування росту коренів, відмирання клітин кореневого апексу та інші стресові зміни кореневої морфології і доведено, що в основі цих явищ лежить безпосередній вплив кадмію на мікротрубочки клітин перехідної зони та мікрофіламенти клітин апікальної меристеми.

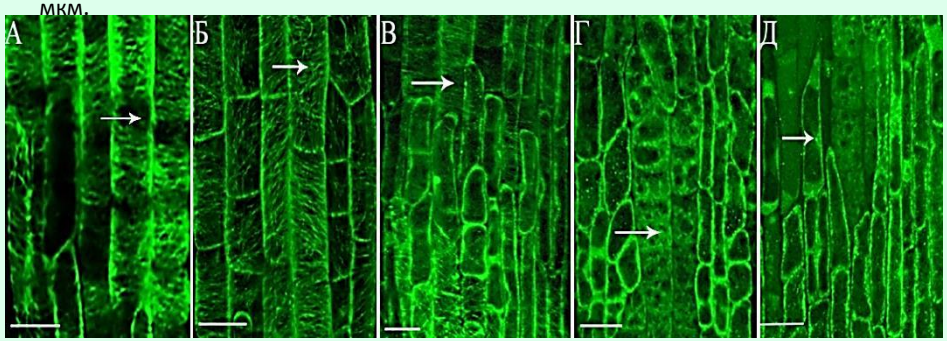


Результати впливу Cd^{2+} на ріст головних коренів *A. thaliana*

Морфологія головних коренів *A. thaliana* після 48 год обробки Cd^{2+} у концентраціях 1, 5, 10 і 20 мкМ (Б–Д) в прохідному світлі та після фарбування пропідіум йодитом (Ж–К): А, Е – контроль; Б, Ж – 1 мкМ; В, З – 5 мкМ, Г, І – 10 мкМ, Д, К – 20 мкМ. Масштаб: А–Г, Е–К – 250 мкм; Д – 500 мкм.



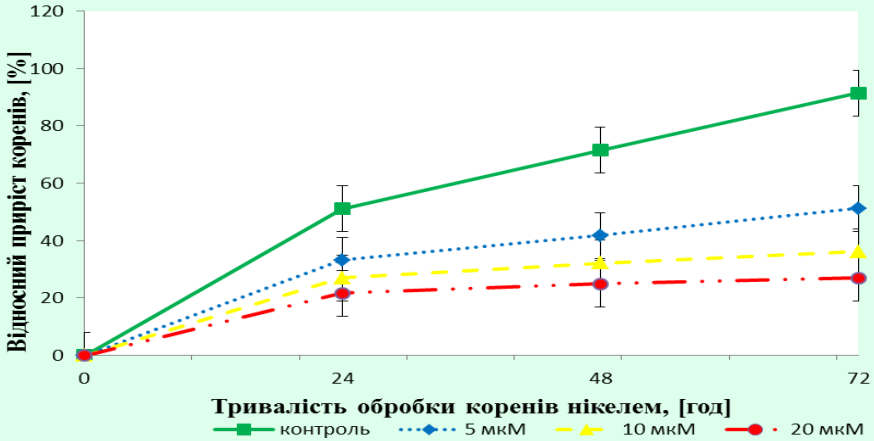
Організація актинових філаментів у клітинах апікальної меристеми головних коренів проростків *A.thaliana* (GFP-FABD2) після обробки 1 год обробки Cd^{2+}– контроль, Б – 5 мкМ, В – 10 мкМ, Г – 20 мкМ. Масштаб – 20 мкм



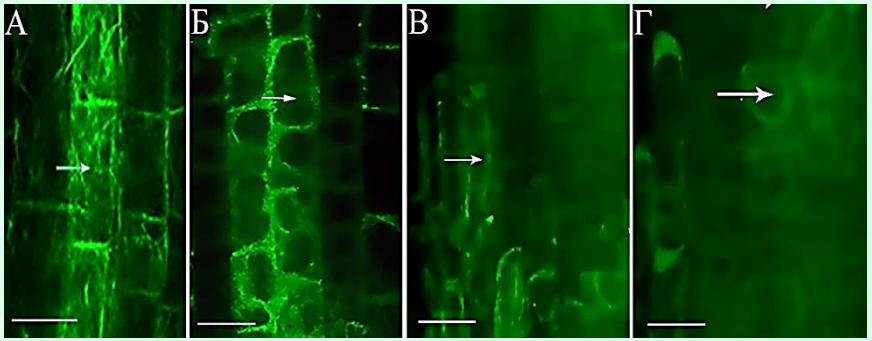
Організація мікротрубочок у клітинах перехідної зони головних коренів проростків *A.thaliana* (GFP-MAP4) після 1 год обробки Cd^{2+}: А – контроль, Б – 1 мкМ, В – 5 мкМ, Г – 10 мкМ, Д – 20 мкМ. Масштаб – 20 мкм

Вплив іонів нікелю на ріст, морфологію головних коренів *A. thaliana* та організацію мікротрубочок та мікрофіламентів в їх клітинах

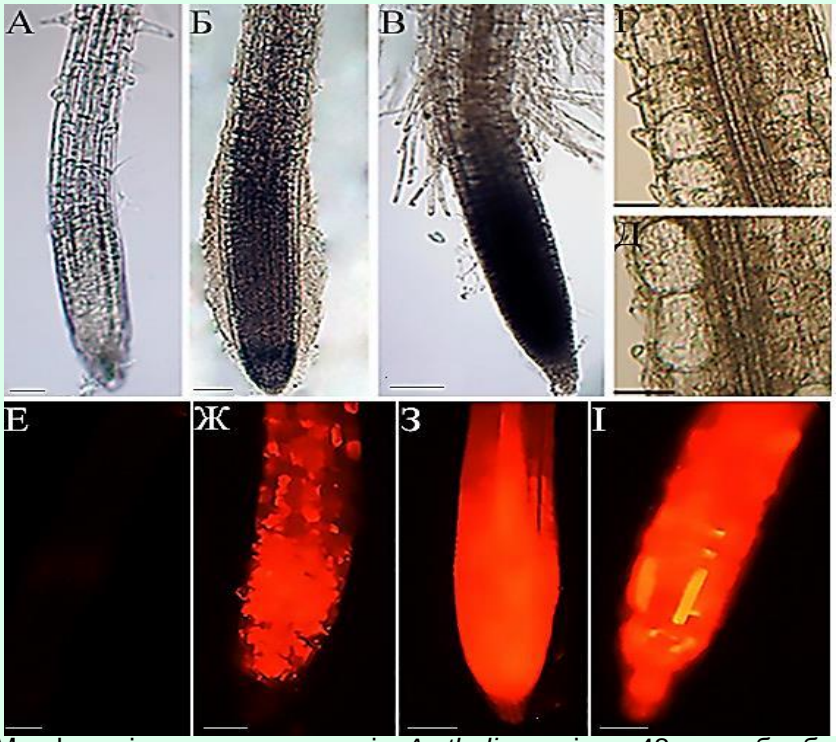
Вперше було показано, дозо- та часозалежне інгібування росту коренів, відмирання клітин кореневого апексу та інші стресові зміни кореневої морфології і доведено, що в основі цих явищ лежить безпосередній вплив нікелю на мікротрубочки клітин апікальної меристеми та мікрофіламентів клітин епідермісу та кори перехідної зони



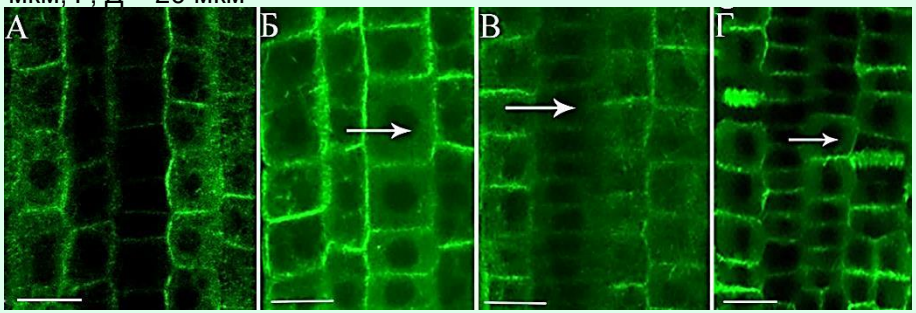
Результати впливу Ni^{2+} на ріст головних коренів *A. thaliana*



Організація актинових філаментів у клітинах перехідної зони головних коренів проростків *A.thaliana* (GFP-FABD2) після 1 год обробки Ni^{2+}: – контроль, Б – 5 мкМ, В – 10 мкМ, Г – 20 мкМ. Масштаб – 20 мкм



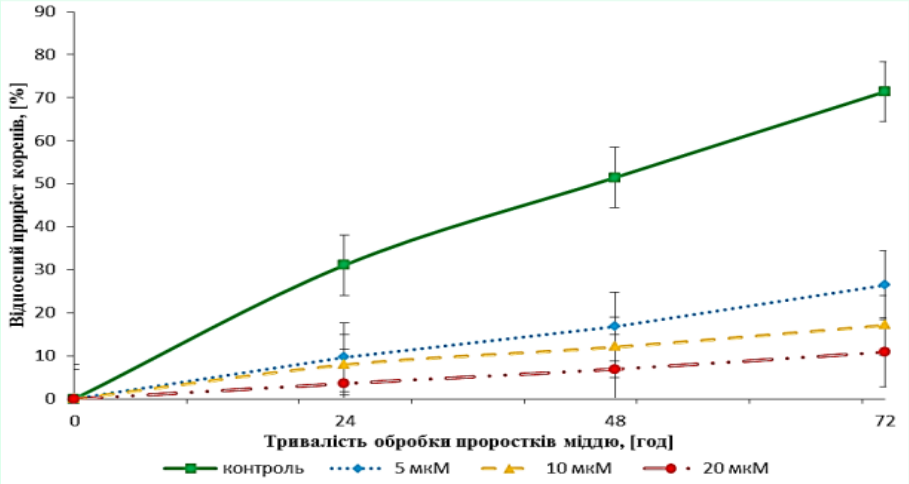
Морфологія головних коренів *A. thaliana* після 48 год обробки Ni^{2+} у концентраціях 5, 10 і 20 мкМ (Б–Д) в прохідному світлі та після фарбування пропідіум йодитом (Ж–І): А, Е – контроль; Б, Ж – 5 мкМ; В, Г, З – 10 мкМ, Д, І – 20 мкМ. Масштаб: А–В, Е–І – 250 мкм; Г, Д – 20 мкм



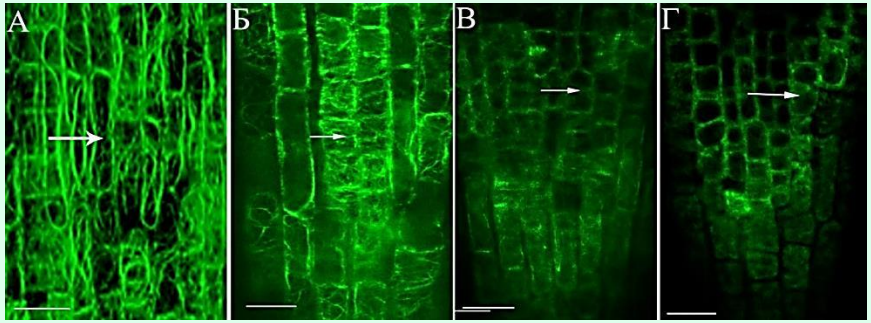
Організація мікротрубочок у клітинах апікальної меристеми головних коренів проростків *A.thaliana* (GFP-MAP4) після 1 год обробки Ni^{2+} : А – контроль, Б – 5 мкМ, В – 10 мкМ, Г – 20 мкМ. Масштаб – 20 мкм

Вплив іонів міді на ріст, морфологію головних коренів A. thaliana та організацію мікротрубочок та мікрофіламентів в їх клітинах

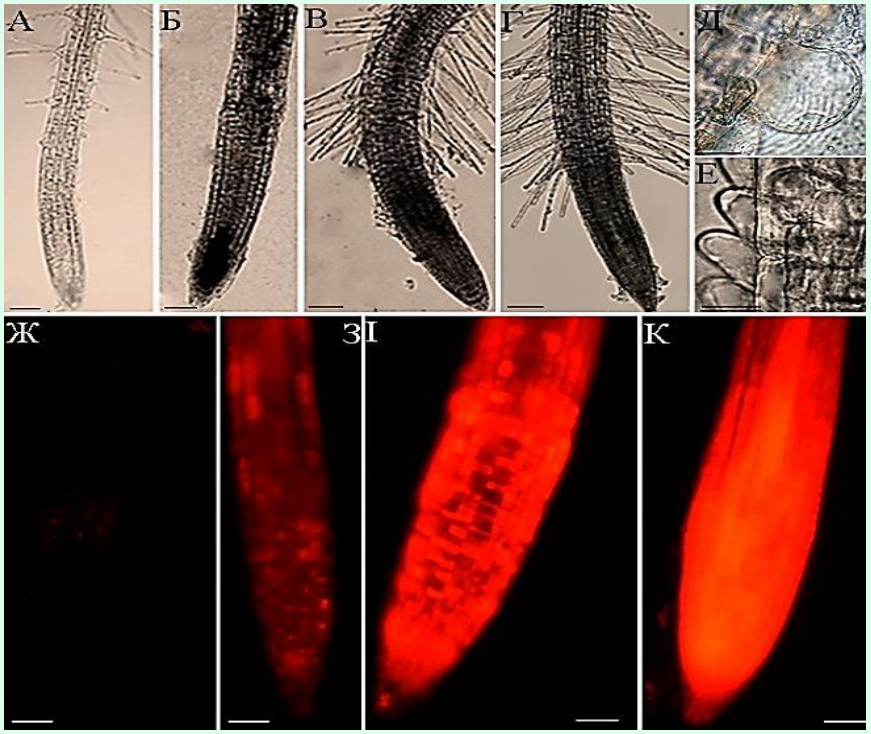
Вперше було показано, дозо- та часозалежне інгібування росту коренів, відмирання клітин кореневого апексу та інші стресові зміни кореневої морфології і доведено, що в основі цих явищ лежить безпосередній вплив міді на мікротрубочки та актинові філаменти клітин кореневого апексу та



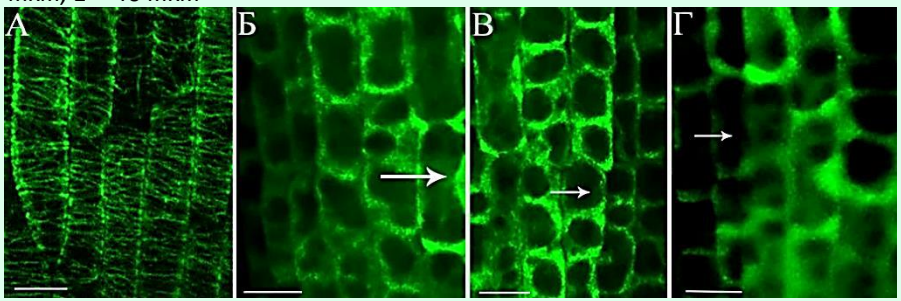
Результат впливу Cu^{2+} на ріст головних коренів *A. thaliana*



Організація актинових філаментів у клітинах епідермісу кореневого апексу головних коренів проростків *A.thaliana* (GFP-FABD2) після 1 год обробки Cu^{2+}: А – контроль, Б – 5 мкМ, В – 10 мкМ, Г – 20 мкМ. Масштаб – 20 мкм



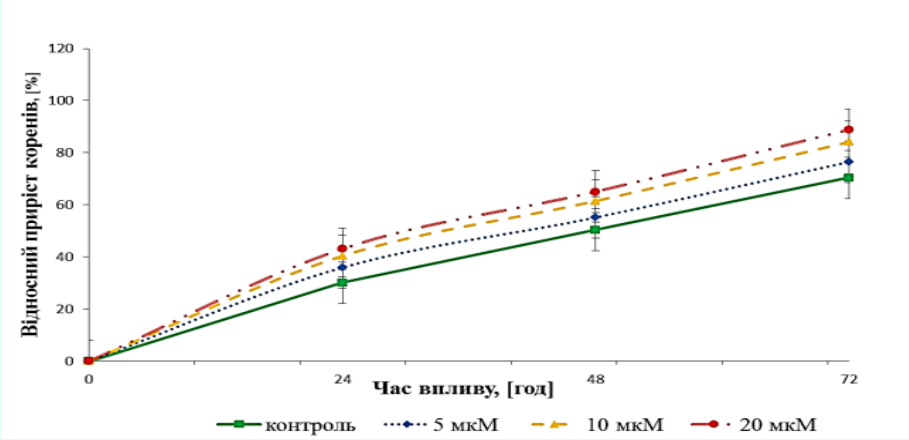
Морфологія головних коренів *A. thaliana* після 48 год обробки Cu^{2+} у концентраціях 5, 10 і 20 мкМ (Б–Е) в прохідному світлі та після фарбування пропідіум йодитом (З–К): А, Ж – контроль; Б, З – 5 мкМ; В, Д, І – 10 мкМ, Г, Е, К – 20 мкМ. Масштаб: А-Г, Ж – К – 250 мкм; Д – 2 мкм, Е – 40 мкм



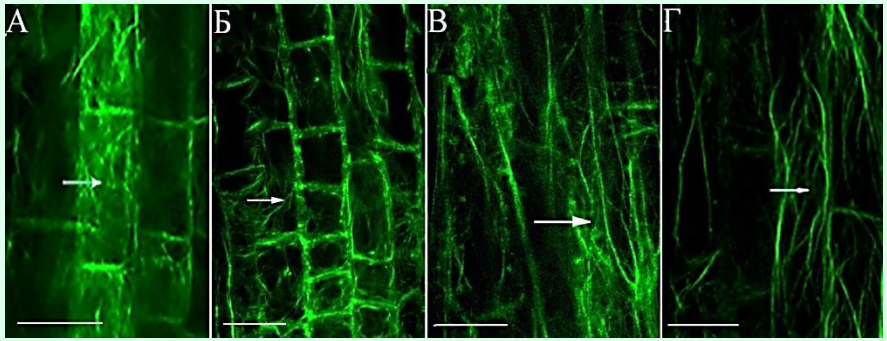
Організація мікротрубочок у клітинах епідермісу кореневого апексу головних коренів проростків *A.thaliana* (GFP-MAP4) після 1 год обробки Cu^{2+}: А – контроль, Б – 1 мкМ, В – 5 мкМ, Г – 10 мкМ, д – 20 мкМ. Масштаб – 20 мкм

Вплив іонів цинку на ріст, морфологію головних коренів *A. thaliana* та організацію мікротрубочок та мікрофіламентів в їх клітинах

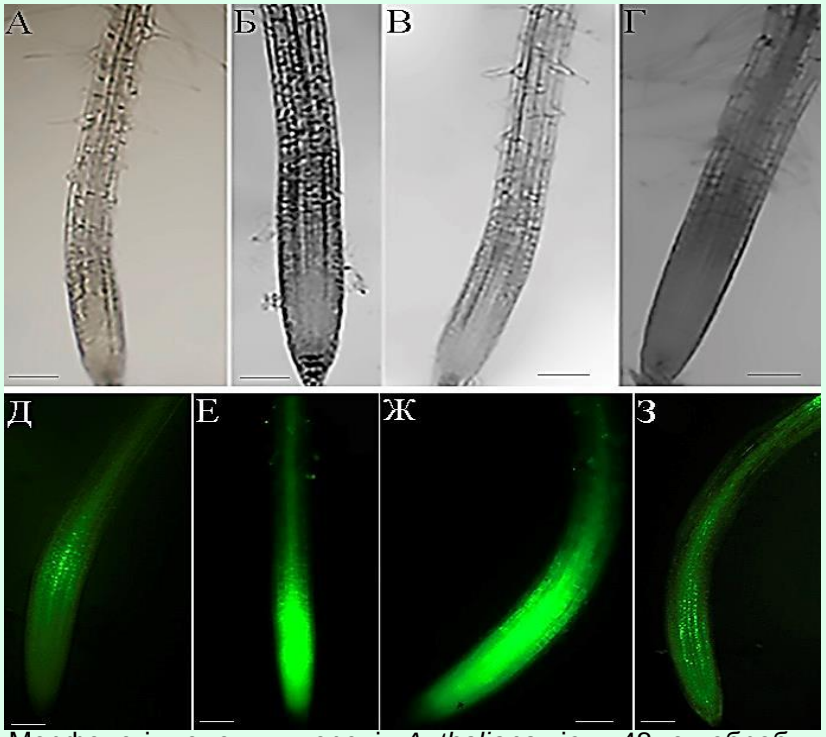
Вперше було показано, дозо- та часозалежне стимулювання росту коренів, при цьому морфологія головних коренів, життєздатність їх клітин та організація компонентів цитоскелету була майже типовою для контролю. Лише спостерігали, незначну зміну організації цитоскелету епідермісу клітин перехідної зони, що не дає підстав стверджувати про виявлену цитотоксичність цинку



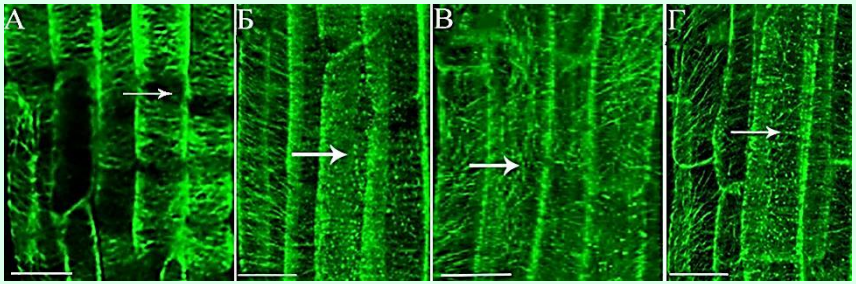
Результат впливу Zn^{2+} на ріст головних коренів *A. thaliana*



Організація актинових філаментів у клітинах епідермісу перехідної зони головних коренів проростків *A.thaliana* (GFP-FABD2) після 1 год обробки Zn^{2+} : А – контроль, Б – 5 мкМ, В – 10 мкМ, Г – 20 мкМ. Масштаб – 20 мкм

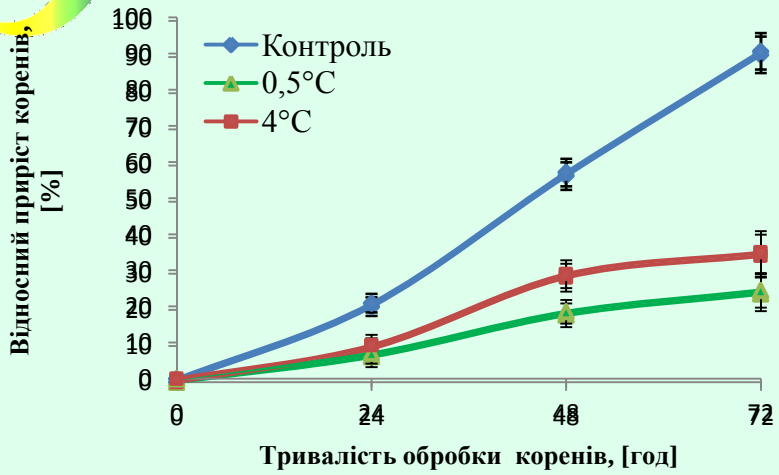


Морфологія головних коренів *A. thaliana* після 48 год обробки Zn^{2+} у концентраціях 5, 10 і 20 мкМ (Б–Г) в прохідному світлі та після фарбування флюресцеїн діацетатом (Е–З): А, Д – контроль; Б, Е – 5 мкМ; В, Ж – 10 мкМ, Г, Г, З – 20 мкМ. Масштаб: А–З – 250 мкм



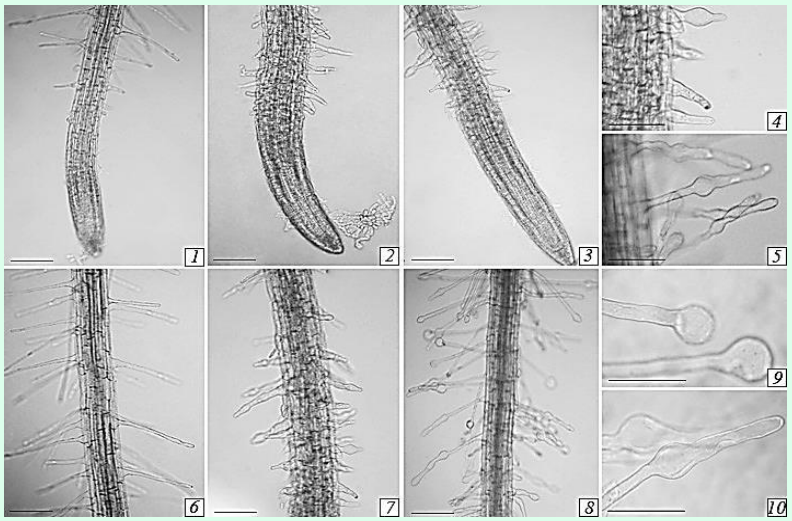
Організація мікротрубочок у клітинах епідермісу перехідної зони головних коренів проростків *A.thaliana* (GFP-MAP4) після 1 год обробки Zn^{2+} А – контроль, Б – 5 мкМ, В – 10 мкМ, Г – 20 мкМ. Масштаб – 20 мкм

Вплив низької температури +4^0 С на ріст, морфологію головних коренів *A. thaliana* та мікрофіламентів в їх клітинах

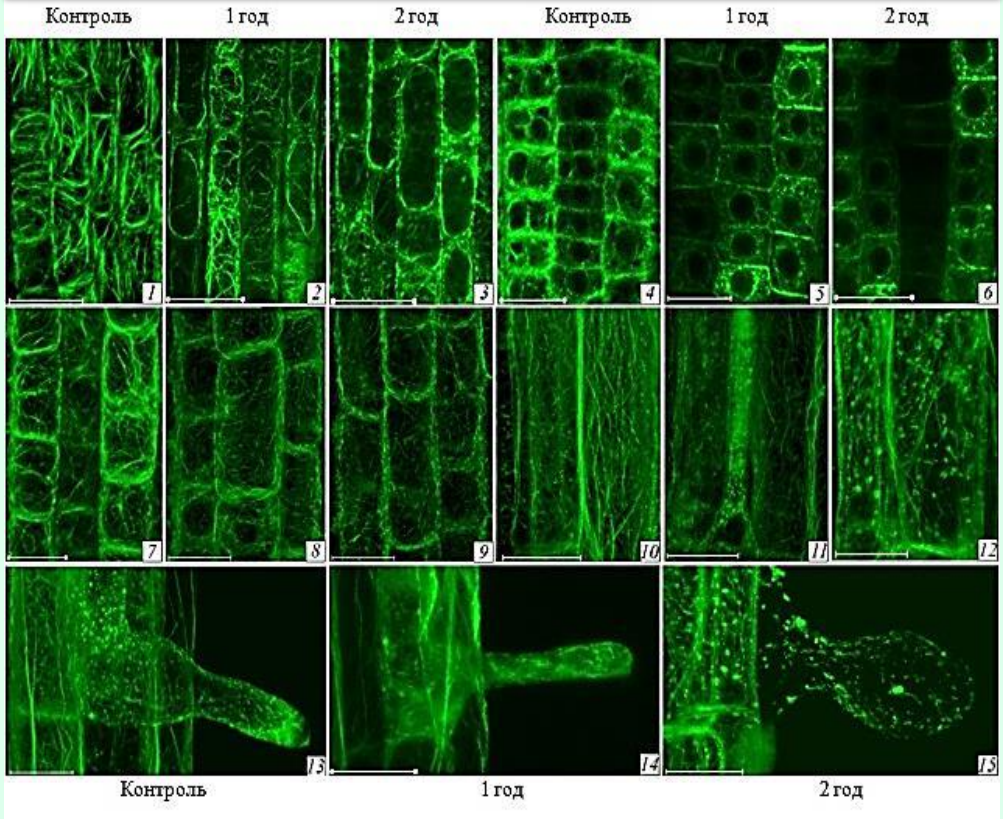


Вперше було показано, дозо- та часозалежне інгібування росту коренів, що пов'язано із змінами їх морфології, а саме відбувався свелінг кореневих волосків. Продемонстровано, що в основі цих явищ лежить безпосередній вплив цієї температури на актинові філаменти епідермальних клітин кореневого апексу та зони розтягу, кореневих волосків.

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



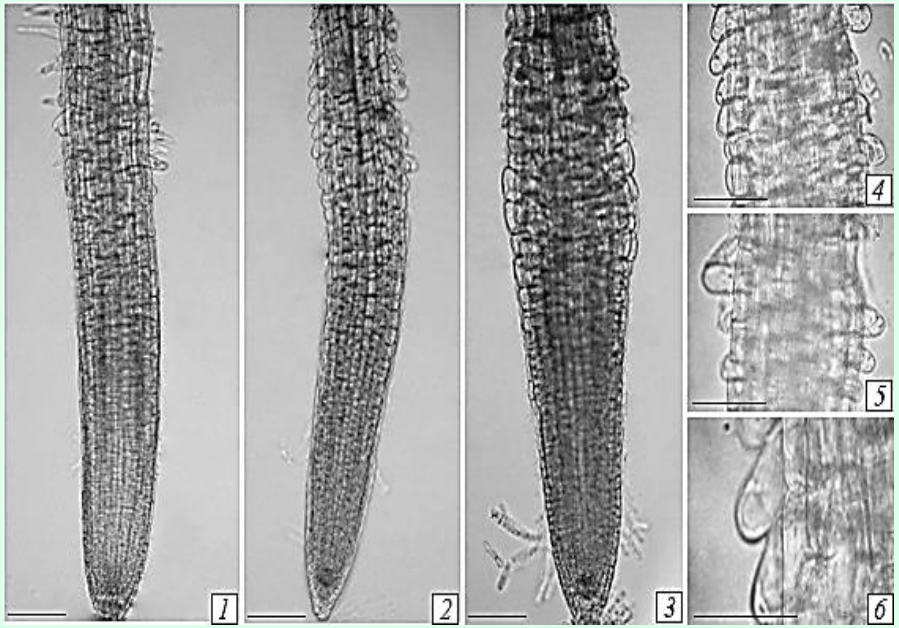
Деформація кореневого апекса проростків *A. thaliana* після обробки +4◦С: *1, 6* - контроль; *2, 4, 7, 9* вкорочення зони розтягу і розбухання кореневих волосків зони диференціації через 24 год; *3, 5, 8, 10* - через 48 год. Масштаб: 10 мкм (*1, 2, 3, 6, 7, 8*), 40 мкм (*4, 5*), 100 мкм (*9, 10*)



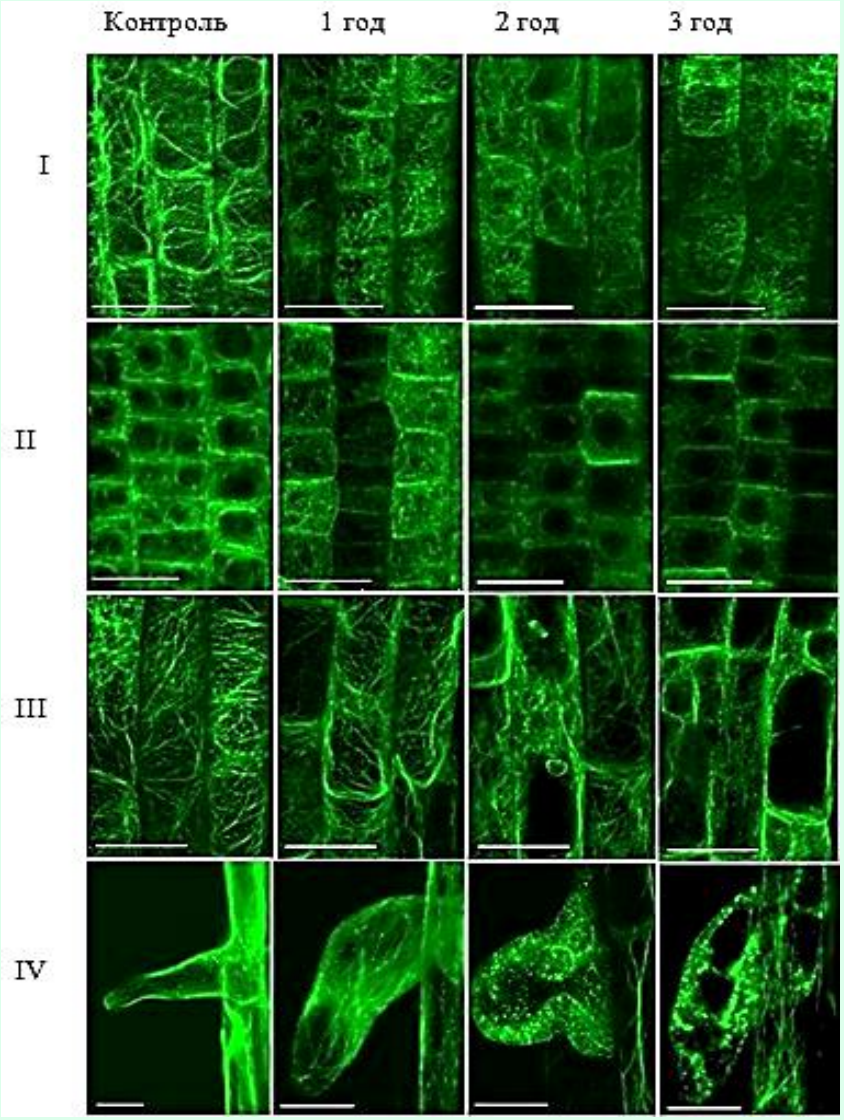
Організація мікрофіламентів в різних типах клітин коренів проростків *A. thaliana* (GFP-ABD-GFP) після обробки температурою +4°С на протязі 1-2 год: *1–3* – епідермальні клітини кореневого апексу; 4–6 – клітини апікальної меристеми; 7–9 – зона розтягу; 10–12 – зона диференціації; 13–15 – кореневі волоски. Масштаб: 20 мкм

Вплив низької температури +0,5^0 С на ріст, морфологію головних коренів A. thaliana та мікрофіламентів в їх клітинах

Показано дозо- та часозалежне інгібування росту коренів і зміни їх морфологі, а саме збільшення діаметру епідермальних клітин зони розтягу. Продемонстровано, що в основі цих явищ лежить безпосередній вплив цієї температури на актинові філаменти епідермальних клітин кореневого апексу та зони розтягу, кореневих волосків

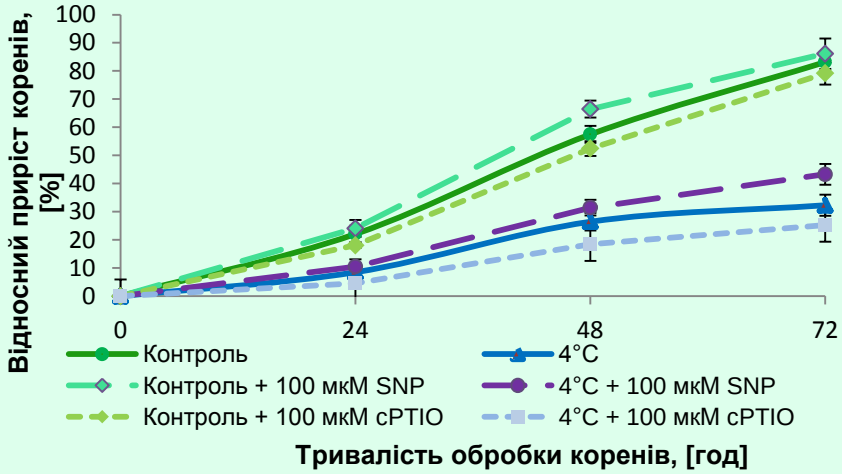


Морфологічні зміни кореневого апексу проростків *A.thaliana* після обробки температурою +0,5◦С: *1* - контроль; *2,4,5* - через 24 год; *3,6* - через 48 год. Масштаб: 10 мкм (*1, 2, 3*), 40 мкм (*4, 5*), 100 мкм (*6*)

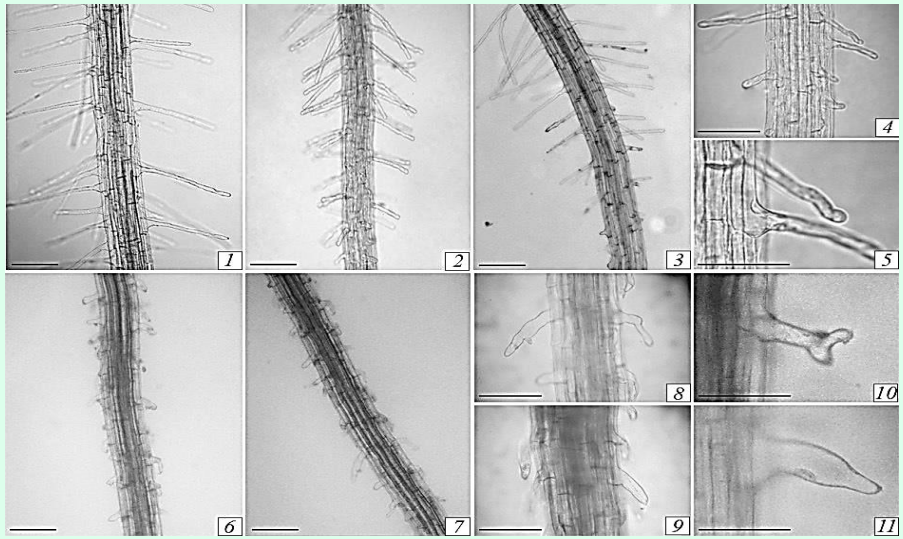


Організація актинових філаментів в різних типах клітин коренів проростків *A. thaliana* (GFP-ABD-GFP) після обробки температурою +0,5°С на протязі 1-3 год : I – епідермальні клітини кореневого апексу; II – клітини апікальної меристеми; III – зона розтягу; IV – кореневі волоски. Масштаб: 20 мкм

Комбінований вплив низьких температур та донора/скавенджера NO на ріст, морфологію та організацію АФ у клітинах кореня проростків *A. thaliana*

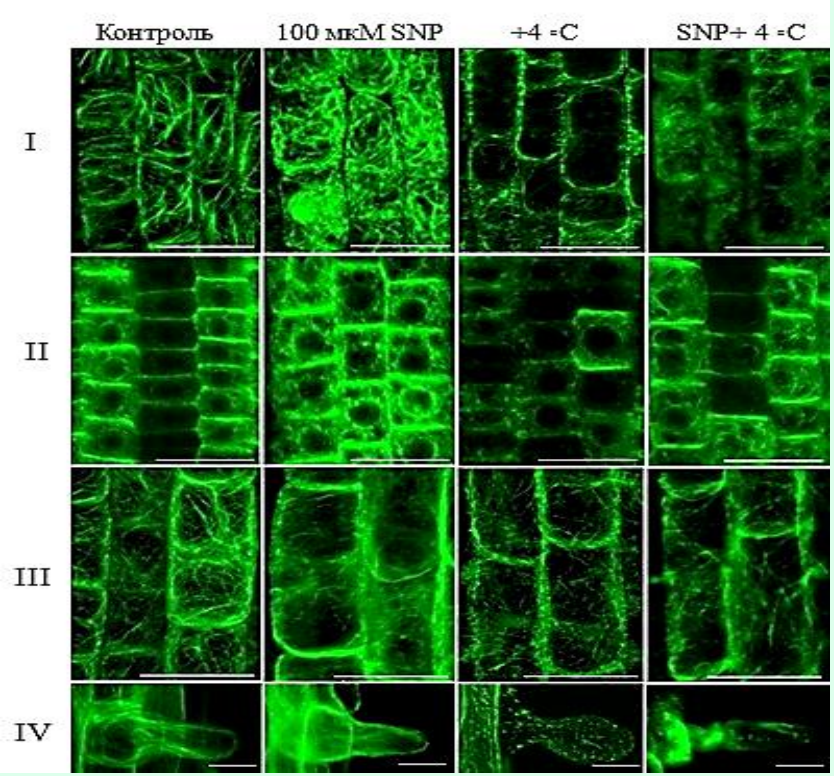


Зміни приросту головного кореня проростків *A. thaliana* при різних строках експозиції в умовах пониженої температури (+4°C) і комбінованого впливу холоду та донора/скавенджера NO



Деформація кореневого апексу проростків *A. thaliana* після комбінованого впливу холоду та донора/скавенджера NO: *1* - контроль; *2-5* – 100 мкМ SNP (*2* – 24 год, *3* – 48 год, *4-5* – 72 год); *6-11* – 100 мкМ cPTIO (*6* – 24 год, *7-9* – 48 год, *10-11* – 72 год). Масштаб: 10 мкм (*1, 2, 3, 6, 7*), 40 мкм (*4, 8, 9*), 100 мкм (*5, 10, 11*)

Показано роль сигнальної молекули NO у формуванні стійкості рослин до холодового стресу, при цьому в даному процесі задіяні мікрофіламенти рослинної клітини. Про це свідчить інгібування росту головного кореня після обробки скавенжером NO, тоді як обробка донором NO здійснювала стимулюючий вплив. Також після комбінованого впливу донором NO та холодовим стресом відбувалося відновлення нативної орієнтації та організації мікрофіламентів.

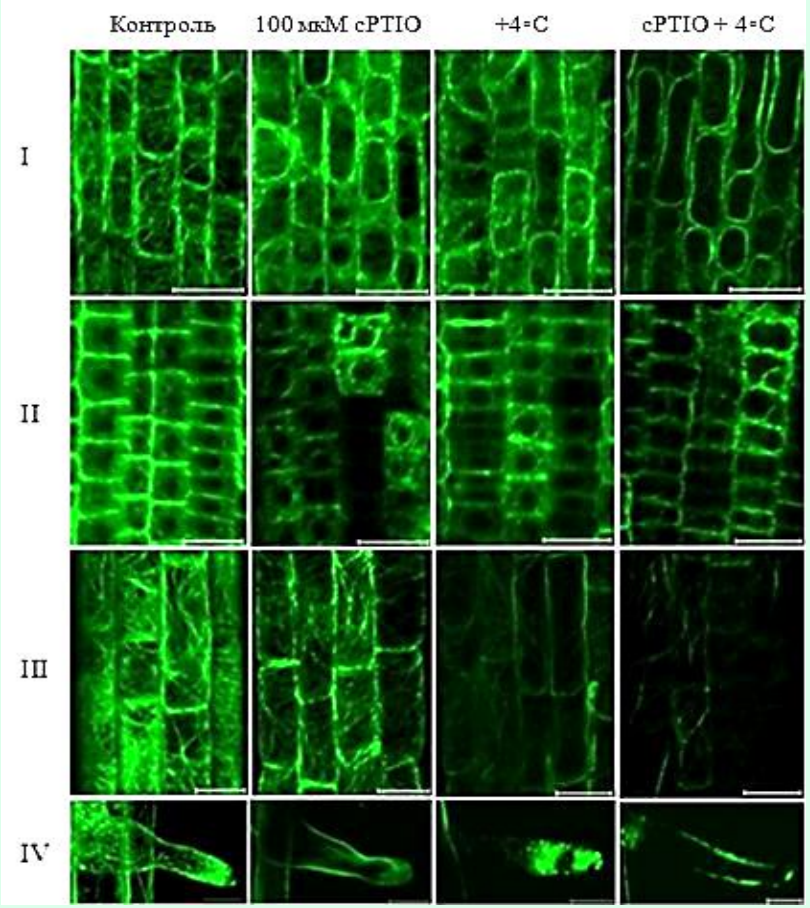


Вплив низької температури (+4°C) та екзогенного донора NO (100 мкМ SNP) на організацію актинових філаментів головного кореня проростків *A. thaliana* (GFP-ABD2-GFP): I – епідермальні клітини апікальної меристеми; II – клітини меристеми; III – епідермальні клітини зони розтягу; г – кореневий волосок. Масштаб: 20 мкм

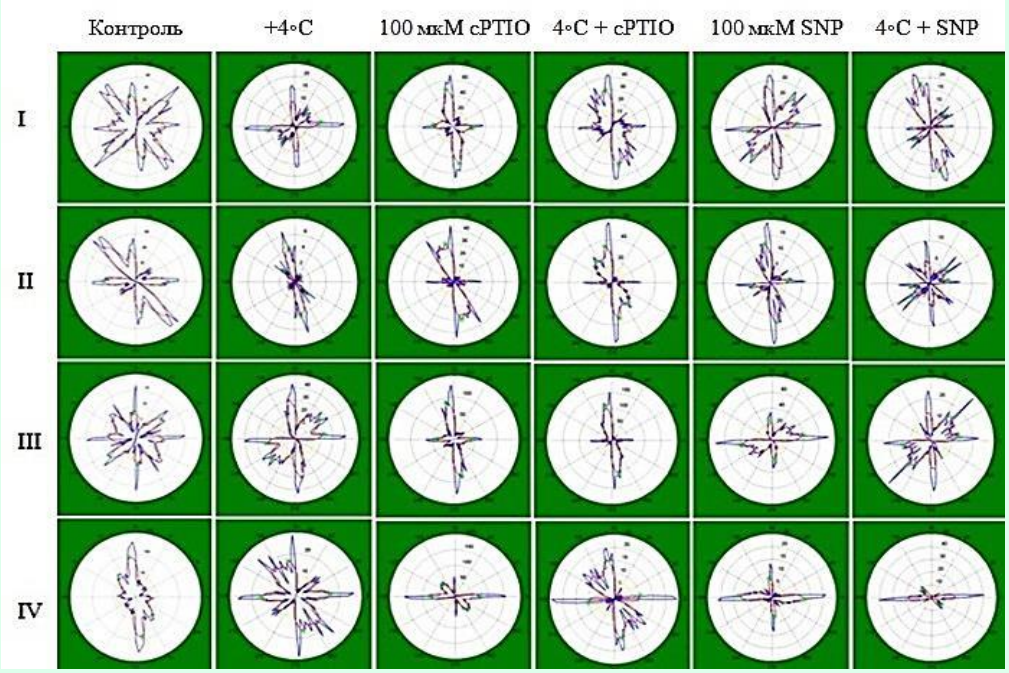
Комбінований вплив низьких температур та скавенджера NO на організацію мікрофіламенти у клітинах кореня проростків A. thaliana. Використання програмного забезпечення MFA для більш точного визначення орієнтації елементів цитоскелету

Обробка скавенжером NO призводила до руйнування мікрофіламентів, а також до зменшення приросту головнигo кореня.

Аналіз конфокальних зображень клітин з різних зон кореня *A.thaliana* (GFP-ABD2-GFP) за допомогою MFA уточнює та суттєво доповнює інформацію щодо впливу досліджуваної температури на організацію та орієнтацію актинових філаментів. За допомогою MFA, нами вперше було встановлено, що під впливом холоду та скавенджера NO відбуваються розрідження динамічної актинової сітки та зміни характеру полімеризації/деполімеризації актину в клітинах різних зон кореневого апексу, а також змінюється орієнтація мікрофіламентів у всіх досліджуваних зонах кореня.



Вплив низької температури (+4°C) та 100 мкМ cPTIO на організацію актинових філаментів головного кореня проростків *A. thaliana* (GFP-ABD2-GFP): I – епідермальні клітини апікальної меристеми; II – клітини меристеми; III – епідермальні клітини зони розтягу; г – кореневий волосок. Масштаб: 20 мкм

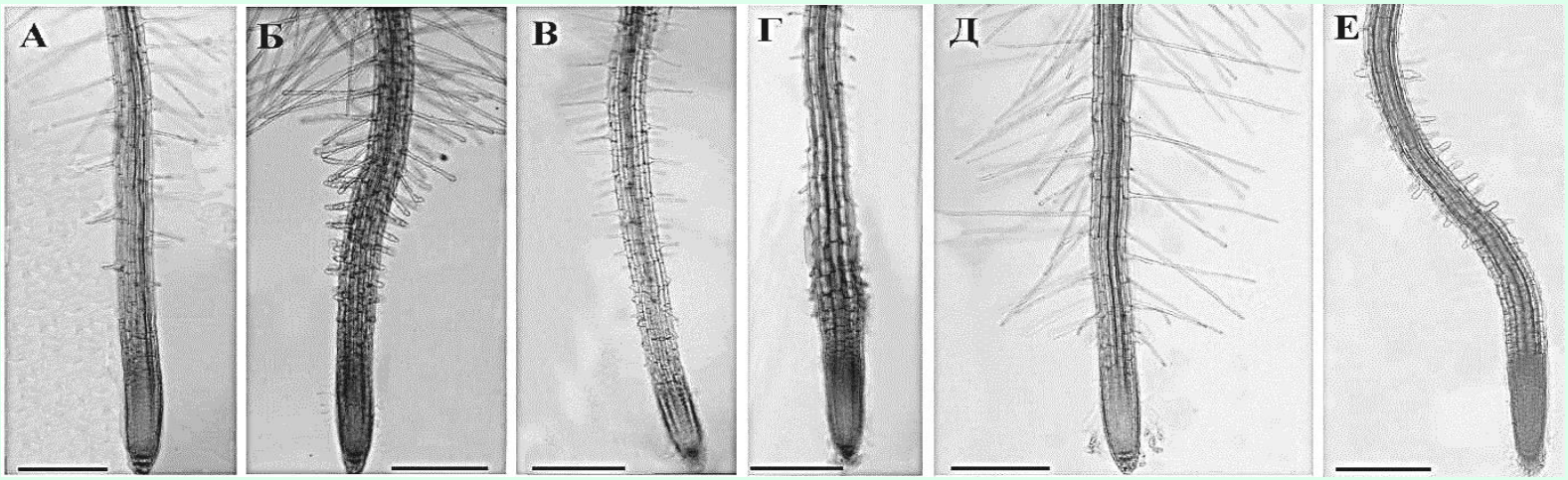


Орієнтація актинових філаментів (за результатами програми MFA) в різних типах клітин кореня *A.thaliana* після впливу низької температури та комбінованого впливу холоду та донора/скавенджера NO: I – епідермальні клітини кореневого апексу; II – клітини апікальної меристеми; III – зона розтягу; IV – зона диференціації

Вплив модуляторів вмісту NO на ріст та морфологію головних коренів A.thaliana

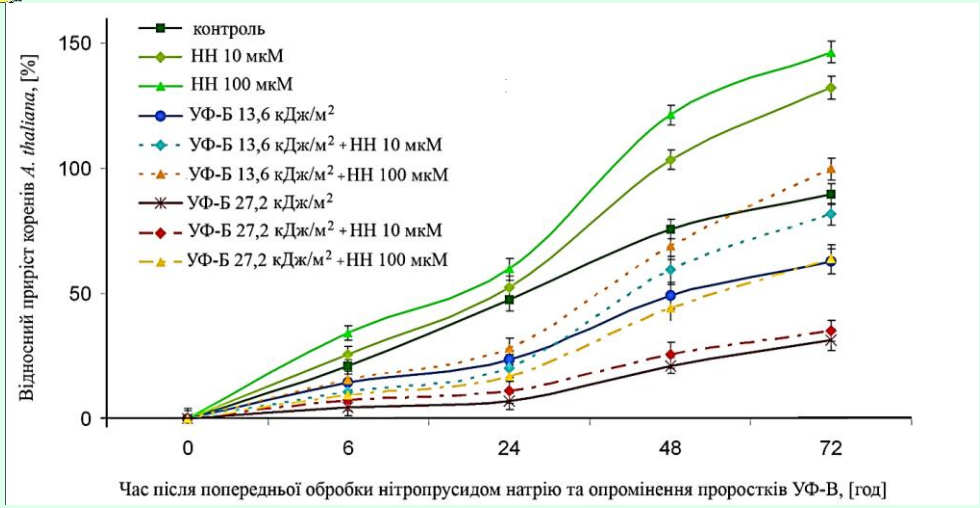
Назва речовини	Ріст головних коренів, 24 год	Свелінг (збіль-шення розміру клітин)	Бічні та адвен-тивні корені	Кореневі волоски			
				поява зачатків	ріст	морфологія	
						свелінг	галуження
нітропрусид натрію	↑	–	+	+	↑	–	–
S-НАП	↑	–	+	+	↑	–	–
к-ФТІО	↓	+	–	+	↓	+	–
L-НАМ	↓	+/–	–	+	↑	–	–
3-нітротирозин	**↓**	**+/–**	**–**	**+**	**↓**	**+**	**+**

Умовні позначення: **+** наявність порівняно з контролем; **–** відсутність порівняно з контролем; **+/–** нерегулярна поява ефекту**;** ↑ стимулювання росту; ↓ уповільнення росту.

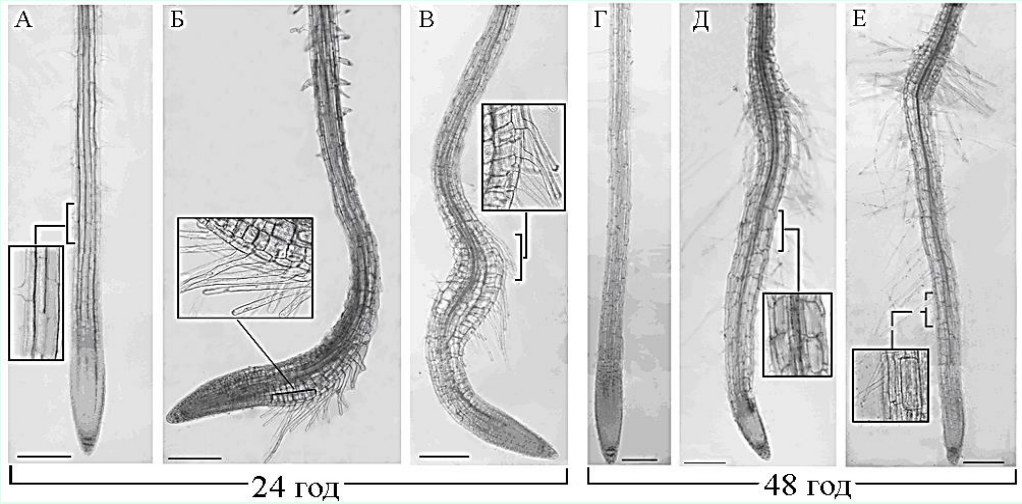


Морфологія головних коренів *A. thaliana* після обробки проростків модуляторами вмісту NO протягом 24 год: А – контроль; Б – нітропрусид натрію, 250 мкМ; В – S-НАП, 10 мкМ; Г – к-ФТІО, 200 мкМ; Д – L-НАМ, 100 мкМ; Е – 3-нітротирозин, 50 мкМ. Масштаб – 200 мкм

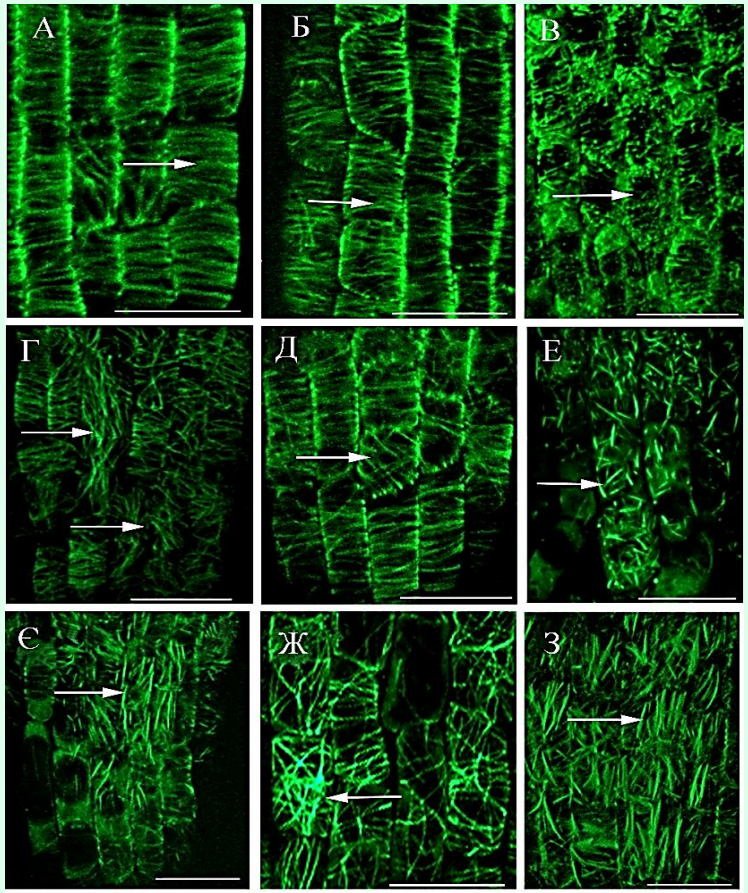
Комбінований вплив модуляторів вмісту NO та УФ-В на ріст, морфологію головних коренів *A. thaliana* та організацію мікротрубочок в їх клітинах



Відносний приріст головних коренів *A. thaliana* після обробки нітропрусидом натрію (НН) з подальшим УФ-В опроміненням дозами 13,6 та 27,2 кДж/м²



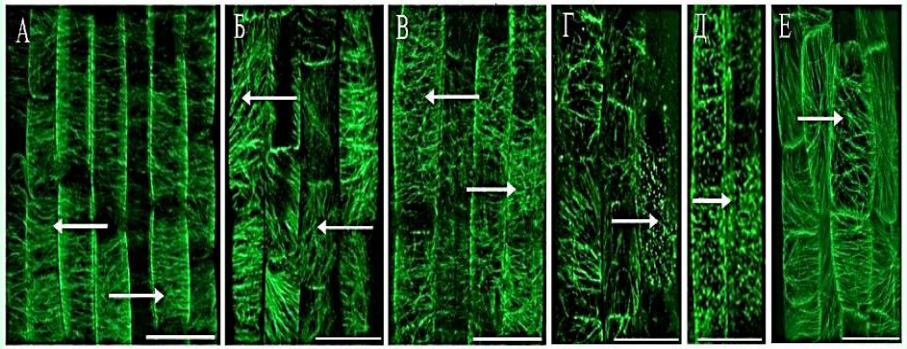
Морфологічні особливості головних коренів проростків *A. thaliana* через 24 та 48 год: А, Г – контроль; Б, Д– УФ-В, 27,2 кДж/м²; В, Е – 100 мкМ нітропрусиду натрію + 27,2 кДж/м² УФ-В. Масштаб – 200 мкм



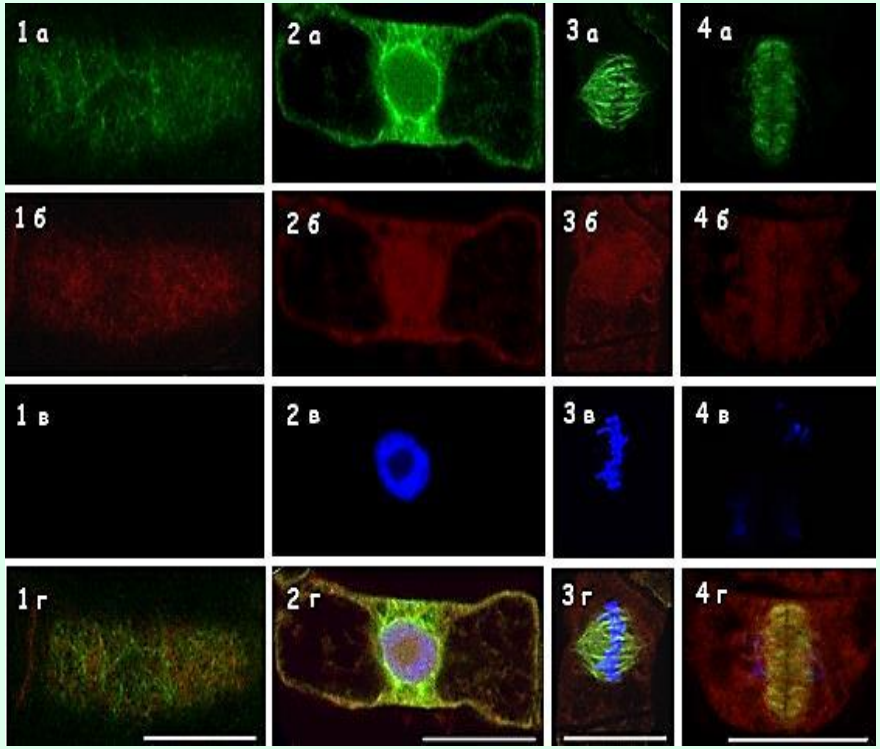
Організація мікротрубочок у клітинах коренів *A. thaliana* (GFP-MAP4) через 48 год після дії УФ-В: А – контроль; Б – 100 мкМ нітропрусиду натрію; В – 200 мкМ к-ФТІО; Г – 13,6 кДж/м² УФ-В; Д – 100 мкМ нітропрусиду натрію + 13,6 кДж/м² УФ-В; Е – 200 мкМ к-ФТІО + 13,6 кДж/м² УФ-В; Є – 27,2 кДж/м² УФ-В; Ж – 100 мкМ нітропрусиду натрію + 27,2 кДж/м² УФ-В ; З – к-ФТІО, 200 мкМ + 27,2 кДж/м² УФ-В. Масштаб − 20 мкм

Вплив модуляторів вмісту NO на організацію мікротрубочок у клітинах головних коренів *A. thaliana*

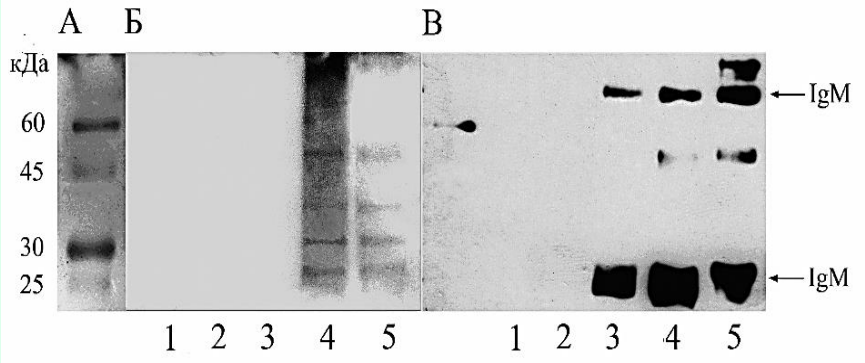
Найбільш чутливими до дії модуляторів вмісту NO є кортикальні мікротрубочки в епідермальних клітинах і/або клітинах кори перехідної зони Крім того, мікротрубочки у клітинах меристеми виявляли підвищену чутливість до 3-нітротирозину, що може свідчити про його вплив на процеси клітинного поділу. Вперше продемонстровано, що функціональна роль нітротирозилювання α-тубуліну рослин може бути пов'язана з регулюванням динамічних властивостей мікротрубочок.



Організація мікротрубочок у епідермальних клітинах зони розтягу головних коренів *A. thaliana* (GFP-MAP4) після обробки проростків модуляторами вмісту NO протягом 24 год: А – контроль; Б – нітропрусид натрію, 250 мкМ; В – S-НАП, 10 мкМ; Г – к-ФТІО, 200 мкМ; Д – L-НАМ, 100 мкМ; Е – 3-нітротирозин, 50 мкМ. Масштаб – 20 мкм



Колокалізація антитіл проти α-тубуліну (TU-01) та нітротирозину у необроблених клітинах BY-2: а – антитіла проти α-тубуліну (зелений сигнал); б – антитіла проти нітротирозину (червоний сигнал); в – фарбування DAPI (синій сигнал); г – поєднання зображень а, б та в. Типи побудов мікротрубочок: 1 – кортикальна сітка; 2 – препрофазна стрічка; 3 – мітотичне веретено; 4 – фрагмопласт. Масштаб − 20 мкм



. Результати імунопреципітації α-тубуліну за допомогою специфічних антитіл TU-16, іммобілізованих на протеїн-L-агарозі, і Вестерн-блот аналізу з антитілами проти нітротирозину і α-тубуліну. Умовні позначення: А – маркери молекулярних мас (нітроцелюлозна мембрана, забарвлена Ponceau S); Б – антитіла проти нітротирозину; В – антитіла проти α-тубуліну (TU-01);1 – протеїн-L-агароза, інкубована з лізатом клітин BY-2; 2 – протеїн-L-агароза, інкубована з лізатом клітин BY-2 і негативними антитілами; 3 – протеїн-L-агароза, інкубована з антитілами TU-16; 4, 5 – імунопреципітація α-тубуліну з лізату клітин BY-2

Висновки

- ✓ показано, що Cd^{2+}, Ni^{2+} та Cu^{2+} інгібують ріст головних коренів *A. thaliana* та викликають порушення морфогенезу коренів у вигляді ініціації росту і збільшення довжини кореневих волосків, свелінгу епідермальних клітин та клітин кортексу зон елонгації і диференціації головних коренів. В той же час, Zn^{2+} стимулює ріст головних коренів *A. thaliana* і не викликає суттєвих змін їх морфології;
- ✓ встановлено, що Cd^{2+}, Ni^{2+} та Cu^{2+} спричиняють відмирання клітин кореневого апексу і частково перехідної зони головних коренів;
- ✓ за допомогою лазерної скануючої конфокальної мікроскопії визначено, що причиною даних порушень є безпосередній вплив іонів важких металів на мікротрубочки клітин різних ростових зон головних коренів *A. thaliana* (GFP-MAP4) *in vivo* під впливом усіх використаних токсичних металів. Проте найбільш чутливими до дії Cd^{2+} є кортикальні мікротрубочки клітин апікальної меристеми та перехідної зони, Ni^{2+} – зони клітинних поділів та розтягу, Cu^{2+} – зони клітинних поділів, та Zn^{2+} – перехідної зони;
- ✓ вперше показано диференціальну чутливість актинових філаментів різних функціональних зон головних коренів *A. thaliana* (GFP-ABD2-GFP) *in vivo* до впливу іонів важких металів. Так, до дії Cd^{2+} найбільш чутливими виявилися мікрофіламенти епідермальних клітин зони клітинних поділів і перехідної зони, Ni^{2+} – перехідної зони та зони елонгації, Cu^{2+} – зони клітинних поділів та диференціації, в той час як як Zn^{2+} не викликав суттєвих змін в організації актинових філаментів;
- ✓ вперше описано особливості просторової організації актинових філаментів в різних типах клітин всіх функціональних зон первинного кореня *A. thaliana* (GFP-ABD2-GFP) *in vivo* після впливу низьких температур +4°C та +0,5°C, що пов’язано у часі зі змінами показників росту та морфології кореня;
- ✓ встановлено, що актинові філаменти в клітинах різних ростових зон кореня мають різну ступінь чутливості до дії низьких температур. Найбільш чутливими до впливу досліджуваних температур виявились мікрофіламенти клітин кореневих волосків, апікальної меристеми, а також епідермальних клітинах зони розтягу;
- ✓ продемонстровано негативний вплив комбінованої дії низьких температур та перехоплювача к-ФТІО у концентрації 100 μM на прижиттєву організацію мікрофіламентів в різних типах клітин головних коренів *A. thaliana.* Встановлено, що к-ФТІО посилює хаотизацію актинових філаментів, а також призводить до їх часткової або повної деполімеризації;
- ✓ вперше проведено аналіз конфокальних зображень клітин різних зон головних коренів *A.thaliana* за допомогою програмного забезпечення MicroFilament Analyzer (MFA), що уточнює та суттєво доповнює отримані результати щодо впливу низьких температур на просторову організацію актинових філаментів в різних типах клітин коренів. Так, нами вперше було встановлено, що під впливом холоду відбуваються не тільки реорієнтація актинових філаментів, але й зміни характеру полімеризації/деполімеризації актину в клітинах різних зон кореневого апексу.
- ✓ визначено, що опромінення надземної частини рослин *A. thaliana* УФ-В призводить до опосередкованого уповільнення росту їх головних коренів, активного формування кореневих волосків, а також реорганізації мікротрубочок насамперед у клітинах перехідної зони коренів. Цей факт свідчить про наявність дистанційної передачі сигналу при опроміненні рослин УФ-В, яка може реалізуватися, в тому числі, і за участю NO;

Висновки (продовження)

- ✓ виявлено, що попередня обробка проростків *A. thaliana* нітропрусидом натрію за умов подальшого опромінення УФ-В дозами 6,8−68 кДж/м2 сприяє відновленню активності росту та початкової морфології головних коренів, а також реорганізації мікротрубочок у їх клітинах. Отримані результати вказують на існування функціонального взаємозв'язку між змінами вмісту NO та організацією мікротрубочок при дії УФ-В на рослини;
- ✓ показано залежність процесів росту та диференціації клітин головних коренів проростків *A. thaliana* і, відповідно, організації мікротрубочок від дії модуляторів вмісту екзогенного (донори NO − нітропрусид натрію і S-НАП; перехоплювач NO − к-ФТІО) та ендогенного NO (інгібітор синтази NO − L-НАМ), а також маркеру активності NO (3-нітротирозину), що поглиблює відомості про NO як сигнальну молекулу, яка опосередковує процеси морфогенезу рослин. Досліджено роль NO у забезпеченні відповіді рослинної клітини на дію такого важливого абіотичного фактора як УФ-В;
- ✓ встановлено, що донори NO нітропрусид натрію та S-НАП стимулюють ріст головних коренів *A. thaliana* та реорганізацію мікротрубочок у епідермальних клітинах зони диференціації, що призводить до появи зачатків кореневих волосків. В той же час, перехоплювач NO к-ФТІО є негативним регулятором росту головних коренів та утворення кореневих волосків, оскільки спричиняє деполімеризацію мікротрубочок у трихобластах та свелінг клітин різних зон головних коренів;
- ✓ виявлено, що ріст і диференціація головних коренів *A. thaliana*, а також організація мікротрубочок у їх клітинах змінюються під впливом конкурентного інгібітора синтази NO L-НАМ, що свідчить про важливість L-аргінінзалежного шляху синтезу ендогенного NO для підтримання організації рослинних мікротрубочок;
- ✓ продемонстровано, що 3-нітротирозин спричиняє сповільнення росту головних коренів *A. thaliana* і призводить до рандомізації ендоплазматичної сітки мікротрубочок у клітинах апікальної меристеми, а також кортикальних мікротрубочок у епідермальних клітинах перехідної зони та зони розтягу, що може бути однією з причин інгібування росту головних коренів *A. thaliana;*
- ✓ шляхом імунопреципітації α-тубуліну з клітин BY-2 за допомогою специфічних антитіл TU-16, іммобілізованих на протеїн-L-агарозі, і наступним Вестерн-блот аналізом з антитілами проти нітротирозину встановлено наявність нітротирозилювання рослинного α-тубуліну. α-Тубулін також було виявлено у фракції нітротирозильованих білків з лізату інтактних клітин суспензійної культури тютюну *Nicotiana tabacum* Bright Yellow-2 (BY-2), що свідчить про наявність нітротирозилювання α-тубуліну за фізіологічних умов;
- ✓ за допомогою імунофлуоресцентної мікроскопії з використанням специфічних антитіл проти α-тубуліну та 3-нітротирозину виявлена переважна колокалізація 3-нітротирозину і α-тубуліну на препрофазних стрічках, мітотичних веретенах та фрагмопластах клітин BY-2, що свідчить на користь залучення нітротирозильованого α-тубуліну до регуляції динамічних властивостей мікротрубочок;
- ✓ донор NO нітропрусид натрію не призводить до порушень організації мікротрубочок у інтерфазних та мітотичних клітинах BY-2, проте спричиняє дозозалежне зменшення загальної кількості мітотичних побудов мікротрубочок порівняно з контролем, що підтверджує зв'язок функціональної ролі нітротирозилювання α-тубуліну з регулюванням динамічних властивостей мікротрубочок.

Результати досліджень за темою роботи викладено в 21 статтях (в т.ч. 9 – у закордонних журналах) , 1 розділі у монографії і 38 тезах. Загальна кількість бібліографічних посилань (згідно баз даних GoogleScholar) становить 121, h-індекс авторів становить 6. ***Загальна кількість публікацій авторів – 59.***

Дякуємо за увагу!!!