

УДК 576.311.348.7+544.475+581.43

Я.А. ШЕРЕМЕТ¹, А.И. ЕМЕЦ¹,
Ж.-П. ВЕРБЕЛЕН², Я.Б. БЛЮМ¹

¹ Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины, Киев
E-mail: alyemets@univ.kiev.ua

² Университет Антверпена, Бельгия

ВЛИЯНИЕ ОКАДАИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА МОРФОЛОГИЮ КОРНЯ *ARABIDOPSIS THALIANA* И ОРГАНИЗАЦИЮ МИКРОТРУБОЧЕК В ЕГО КЛЕТКАХ



Для изучения роли гиперфосфорилирования в растительной клетке исследовано влияние оксадиновой кислоты, специфического ингибитора протеинфосфатаз ПФ1 и ПФ2А, на общую морфологию корней проростков *Arabidopsis thaliana* и структурно-функциональные особенности кортикальных микротрубочек в разных типах клеток всех ростовых зон первичного корня. Установлено, что оксадиновая кислота по-разному влияет на организацию микротрубочек в зависимости от типа клеток и зоны корня. Обнаружено, что наибольшей чувствительностью к 0,1, 1 и 10 нМ концентрациям оксадиновой кислоты обладают кортикальные микротрубочки в эпидермальных клетках и клетках коры зоны растяжения корня, которые полностью разрушались после обработки ингибитором. В трихобластах и атрихобластах, а также в эпидермальных клетках зоны дифференциации обработка оксадиновой кислотой вызывала стабилизацию кортикальных микротрубочек. Установлено также, что обработка оксадиновой кислотой в значительной степени влияет на морфологию корневых волосков, вызывая их ветвление и вздутие вследствие нарушения в них исходной ориентации микротрубочек. На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что индукция гиперфосфорилирования белков посредством ингибирования протеинфосфатаз принимает активное участие в организации микротрубочек растительных клеток.

© Я.А. ШЕРЕМЕТ, А.И. ЕМЕЦ, Ж.-П. ВЕРБЕЛЕН,
Я.Б. БЛЮМ, 2009

Введение. Обратимое фосфорилирование белков – универсальный механизм регуляции их структурных и функциональных свойств в эукариотических клетках [1]. Ранее нами было установлено, что обе субъединицы растительного тубулина (α - и β -), являющиеся главными составляющими микротрубочек, могут подвергаться фосфорилированию как по остаткам серина/треонина, так и по остаткам тирозина [2, 3]. Поскольку микротрубочки являются одним из важнейших компонентов растительной клетки, вовлеченных в регуляцию ее роста, деления и дифференциации [4], основной интерес представляет определение роли данного типа посттрансляционной модификации в регуляции структуры и функций микротрубочек. Известно, что процесс фосфорилирования белков катализируется взаимосбалансированной системой ферментов: протеинкиназ, которые осуществляют перенос концевой остатка фосфата с АТФ на определенные остатки белковой молекулы [5], и протеинфосфатаз, катализирующих процесс дефосфорилирования [6]. На сегодняшний день в зависимости от субстратной специфичности в растительной клетке, как и в животной, выделено два основных типа протеинфосфатаз: серин/треонин- и тирозин-специфические [6]. Среди протеинфосфатаз первого типа в клетках *Arabidopsis thaliana* были найдены ПФ1, ПФ2А и ПФ2С [7, 8].

В ряде работ с помощью специфического ингибитора ПФ1 и ПФ2А, оксадиновой кислоты [9], показано, что ингибирование процесса дефосфорилирования белков в растительных клетках влияет как на организацию кортикальных [10], так и митотических микротрубочек [11, 12], однако тонкие механизмы упомянутого процесса остаются невыясненными.

В связи с этим для более глубокого изучения роли процесса дефосфорилирования белков в организации микротрубочек в растительной клетке нами была использована линия *A. thaliana*, которая экспрессирует химерный белок GFP-MAP4, декорирующий микротрубочки *in vivo*. Соответственно, целью настоящей работы явилось изучение влияния оксадиновой кислоты на особенности организации и ориентации микротрубочек в разных типах клеток первичного корня *Arabidopsis thaliana*.

Материалы и методы. В качестве экспериментального материала использовали четырехдневные проростки линии *Arabidopsis thaliana*.

na (L.), экспрессирующие химерный ген *gfp-tap4* [13]. Для получения проростков семена *A. thaliana* предварительно стерилизовали в 6%-ном растворе гипохлорита натрия и промывали в стерильной дистиллированной воде. Далее семена высаживали на твердую модифицированную среду Мурасиге и Скуга (МС) [14], содержащую 2,2 г/л набора макро- и микроэлементов («Duchefa», Нидерланды), 10 г/л сахарозы, 4 г/л джелрайта («Duchefa», Нидерланды), рН 5,7. Высаженные семена стратифицировали при температуре +4 °С в течение 24 ч. Далее чашки Петри с семенами оставляли для проращивания в вертикальном положении в течение 4 сут при постоянной температуре 22 °С и 16-часовом периоде освещения.

Окадаиновую кислоту («Sigma», США) растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) и хранили в концентрации 10 мкМ при температуре –20 °С. В зависимости от варианта исследования свежие рабочие концентрации ингибитора готовили на основе дистиллированной воды либо добавляли окадаиновую кислоту в питательную среду МС, которую разливали по чашкам Петри. Общая концентрация ДМСО в растворе не превышала 0,5 %.

В первой серии экспериментов для изучения влияния окадаиновой кислоты на рост и морфологию корней четырехдневные проростки *Arabidopsis* помещали на твердую среду МС, содержащую 0,1–100 нМ ингибитора, и изучали после обработки в течение 6–48 ч. Следующую серию экспериментов по исследованию влияния окадаиновой кислоты на прорастание семян *Arabidopsis* и общую морфологию корневых апексов проводили после высаживания семян на среду МС, содержащую те же концентрации ингибитора протеинфосфатаз. Эффекты окадаиновой кислоты на прорастание семян фиксировали на протяжении 4 сут.

Полученные данные документировали с помощью цифровой фотокамеры Canon Power Shot G6 в режиме макросъемки. Длину корней *A. thaliana* измеряли согласно методике, описанной ранее [15]. Все эксперименты проведены в трех повторностях, результаты экспериментальных данных обрабатывали согласно общепринятым статистическим методикам [16].

Для изучения краткосрочного (1 и 3 ч) и пролонгированного (6–48 ч) влияния окадаи-

новой кислоты на организацию и ориентацию микротрубочек в клетках различных ростовых зон первичного корня четырехдневные проростки обрабатывали ингибитором в концентрациях 0,1–100 нМ. GFP-меченые микротрубочки в клетках *Arabidopsis* визуализировали *in vivo* с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 510 META («Carl Zeiss», Германия). Для получения трехмерного изображения использовали 488-ю линию аргонного лазера (волновое возбуждение 488/543 нм; эмиссия при 510/540 нм), иммерсионный объектив с 63-кратным увеличением (Plan-Apochromat). На основании серийных оптических срезов (с интервалом 0,3–0,5 мкМ) строили трехмерные модели построений микротрубочек с помощью программного обеспечения Image Axiovision («Carl Zeiss», Германия).

Результаты исследований и их обсуждение. Влияние окадаиновой кислоты на рост и морфологию первичного корня проростков *A. thaliana*.

В ходе экспериментов установлено, что обработка первичных корней проростков *A. thaliana* окадаиновой кислотой вызывала изменение скорости их роста и морфологии (рис. 1). Следует отметить, что обработка проростков 0,1 и 1 нМ окадаиновой кислотой не вызывала значительных изменений в скорости роста их корней по сравнению с контролем. В свою очередь экспозиция проростков с 10 нМ окадаиновой кислотой оказывала стимулирующее действие на рост первичных корней. Установлено, что обработка проростков ингибитором в упомянутой концентрации в течение 24 и 48 ч вызывала увеличение длины корней в 1,3 и 1,4 раза по сравнению с длиной корней в контроле. Вместе с тем повышение концентрации окадаиновой кислоты до 100 нМ приводило к ингибированию роста первичных корней в 1,4 и 1,5 раза после 24 и 48 ч обработки соответственно по сравнению с контролем.

Известно, что наибольшей чувствительностью к действию окадаиновой кислоты обладает ПФ2А (0,1–1 нМ), тогда как для ингибирования ПФ1 необходима более высокая концентрация этого вещества (в 10–100 раз выше) [17, 18]. Ранее в ряде работ было показано, что обработка проростков *Arabidopsis* ингибиторами протеинфосфатаз (окадаиновая кислота и каликулин А) вызывает значительное замед-

ление роста первичных корней [10, 19]. В частности, обработка проростков *Arabidopsis* ооадаиновои кислотой в концентрации 100 нМ и выше вызывала более чем 50%-ное ингибирование роста первичных корней. В то же время нами впервые продемонстрировано, что рост корней в присутствии этого ингибитора протеинфосфатаз в низкой концентрации (10 нМ) может вызывать противоположное, стимулирующее рост действие.

Известно, что замедление роста корня может быть результатом нарушений двух основных процессов: непосредственно деления клеток в меристематической зоне и/или растяжения клеток. Оказалось, что низкие концентрации ооадаиновои кислоты (0,1 и 1 нМ) не вызывали заметных изменений митотического индекса клеток апикальной меристемы корня, тогда как обработка проростков 10 нМ ооадаиновои кислотой приводила к незначительному увеличению количества делящихся клеток в меристеме, чем и может быть объяснено увеличение скорости роста корня *Arabidopsis*. Повышение концентрации ингибитора до 100 нМ приводило к снижению количества делящихся клеток, а также вызывало уменьшение скорости растяжения клеток корня [19], что подтверждается снижением скорости роста корня после обработки растений ингибитором в указанной концентрации (рис. 1).

Обнаружено, что обработка проростков *A. thaliana* ооадаиновои кислотой в концентрации 100 нМ приводит к нарушению направления роста первичных корней (рис. 2, д–з) по сравнению с необработанными корнями (рис. 2, а–г), тогда как ооадаиновои кислота в концентрациях 0,1; 1 и 10 нМ не вызывала подобного эффекта.

После 12 ч обработки 100 нМ ооадаиновои кислотой большинство корней проростков *Arabidopsis* незначительно отклонялись от положительного геотропного направления роста (рис. 2, е), а при увеличении времени обработки ингибитором до 24 и 48 ч описанный эффект приобретал более выраженный характер (рис. 2, ж, з). Полученные результаты соответствуют данным более ранних работ, однако необходимо отметить, что причина обнаруженного явления авторами так и не была установлена [19].

Для объяснения полученных результатов были проведены дальнейшие исследования

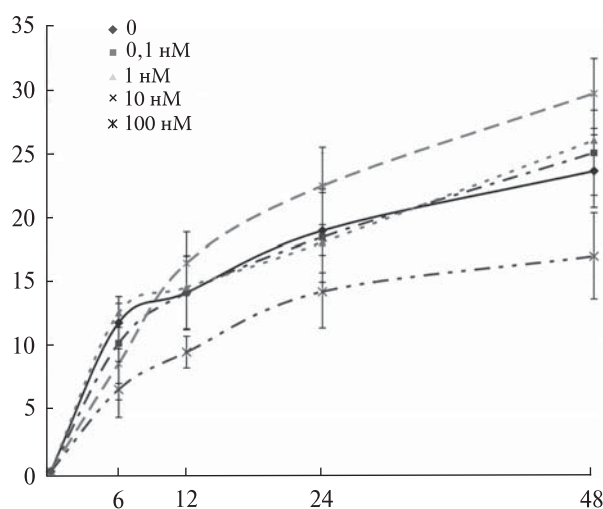


Рис. 1. Прирост длины первичных корней *A. thaliana* (по вертикали, %) после обработки ооадаиновои кислотой; по горизонтали – время обработки ооадаиновои кислотой, ч

влияния разных концентраций ингибитора на рост и развитие проростков *Arabidopsis*, а именно на прорастание семян, их дальнейший рост и морфологические характеристики корня в присутствии ооадаиновои кислоты. В результате обнаружено, что после высевания семян *A. thaliana* на среды, содержащие все тестируемые концентрации ингибитора, они не теряли способности к прорастанию. Однако прорастание семян и последующий рост проростков, особенно на среде, содержащей 100 нМ ооадаиновои кислоту, сопровождались значительными нарушениями как морфологии корней (рис. 3, г), так и направления их роста (рис. 3, б). Установлено также, что при этой концентрации ингибитора происходили существенные нарушения морфологии корневого апекса (рис. 3, з). Наибольшие изменения претерпевали клетки корневого чехлика. Как видно из рис. 4, в результате обработки 100 нМ ооадаиновои кислотой клетки корневого чехлика изменяли свою исходную форму на раздутую сферическую (рис. 4), при этом большая часть клеток чехлика отпадала в процессе роста корня.

Полученные данные дают возможность предположить, что именно потеря большей части клеток корневого чехлика и, как результат, выполняемых ими функций может быть

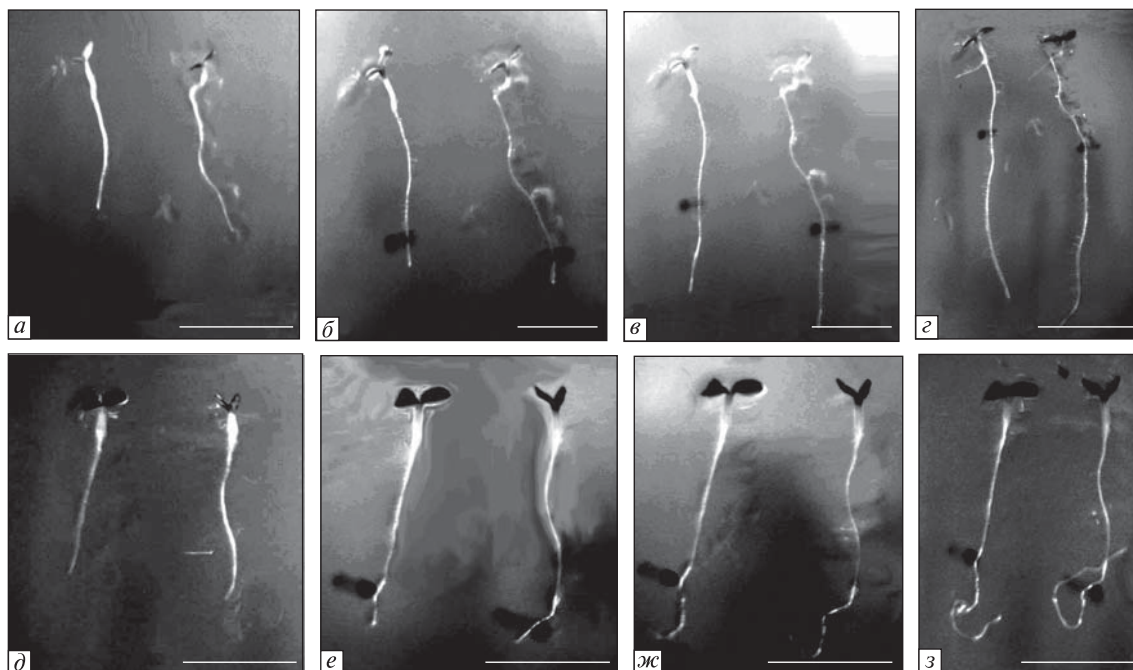


Рис. 2. Влияние 100 нМ окадаиновой кислоты на направление роста корней *A. thaliana*. Контроль: а – 0 ч; б – 12 ч; в – 24 ч; г – 48 ч. Окадаиновая кислота: д – 0 ч; е – 12 ч; ж – 24 ч; з – 48 ч. Масштаб – 10 мм

причиной дезориентированного роста корней под действием окадаиновой кислоты. На сегодняшний день установлено, что основную роль в восприятии гравитационного стимула в корне играют именно высокоспециализированные клетки корневого чехлика – статоциты [20]. Поэтому можно допустить, что в результате потери клеток чехлика (рис. 3, з), выполняющих функции гравиперцепции после обработки 100 нМ окадаиновой кислотой, корни отклонялись от естественного направления роста (рис. 3, б), что и являлось причиной их последующей дезориентации. Ранее было показано, что обработка корней *Arabidopsis* 100 нМ окадаиновой кислотой и другим структурно неродственным типом ингибитора ПФ1 и ПФ2А, каликулином, вызывала сходные нарушения направления роста корней [19]. На основании этих данных можно предположить, что такой эффект ингибиторов протеинфосфатаз связан с опосредованным влиянием процессов гиперфосфорилирования на геотропный рост корня.

Наряду с описанными изменениями морфологии корней вследствие обработки окада-

иновой кислотой особого внимания заслуживают эффекты ингибитора на рост и морфологию корневых волосков. Нами установлено, что обработка проростков 0,1; 1 и 10 нМ окадаиновой кислотой приводила к изменению их морфологии. Эти изменения могут быть следствием влияния ингибитора протеинфосфатаз на организацию и ориентацию микротрубочек в клетках корневых волосков.

Влияние окадаиновой кислоты на организацию микротрубочек в клетках корней *A. thaliana*. Для выяснения возможных причин морфологических изменений корня под воздействием окадаиновой кислоты были исследованы изменения организации микротрубочек в клетках корня *A. thaliana* после обработки этим ингибитором. В ходе экспериментов было установлено, что обработка проростков *Arabidopsis* окадаиновой кислотой в зависимости от концентрации и времени вызывала значительные изменения ориентации кортикальных микротрубочек клеток разных зон корня по сравнению с их исходной ориентацией (рис. 5, а–в, см. вклейку). Обнаружено, что 3–6-часовая обработка проростков 0,1 нМ окадаиновой

кислотой не вызывала очевидных нарушений в организации кортикальных микротрубочек в клетках корней. После 12 ч обработки проростков указанной концентрацией ингибитора кортикальные микротрубочки в большинстве эпидермальных клеток корневого апекса сохраняли поперечную ориентацию (рис. 6, а, см. вклейку), в то время как в эпидермальных (рис. 6, б), так и в кортикальных клетках зоны растяжения обработка проростков 0,1 нМ оокадиновой кислотой на протяжении 12 ч вызывала изменение ориентации кортикальных микротрубочек из поперечной на хаотическую. В трихобластах и атрихобластах зоны дифференциации и корневых волосках после 12 ч обработки 0,1 нМ оокадиновой кислотой обнаруживали длинные тяжи стабилизированных микротрубочек (рис. 6, в). Как было отмечено нами ранее, морфология корневых волосков после обработки 0,1 нМ концентрацией ингибитора была нарушена, для них был характерен ростовой изгиб вниз вдоль основной оси первичного корня (рис. 6, в), что не характерно для контрольного варианта.

Более выраженное влияние оокадиновой кислоты на организацию кортикальных микротрубочек обнаружено после обработки проростков *A. thaliana* 1 нМ концентрацией ингибитора. Необходимо отметить, что наряду с наблюдаемой дезорганизацией микротрубочек в клетках меристемы после 6 ч экспозиции с ингибитором протеинфосфатаз в отдельных клетках корневого чехлика кортикальные микротрубочки сохраняли исходную ориентацию (рис. 7, а, см. вклейку). В большинстве эпидермальных клеток и клеток коры зоны растяжения микротрубочки были дезорганизованы, хотя в некоторых можно было обнаружить отдельные очень короткие дезориентированные микротрубочки (рис. 7, б). В клетках зоны дифференциации наблюдались стабилизированные кортикальные микротрубочки. После 12 ч обработки 1 нМ концентрацией оокадиновой кислоты микротрубочки в эпидермальных клетках меристематической зоны корня были дезориентированы, а в клетках зоны элонгации полностью разрушены. Для клеток зоны дифференциации, как и после 6 ч обработки, характерно наличие стабилизированных кортикальных микротрубочек (рис. 7, в).

Таким образом, в результате проведенных экспериментов впервые показано, что обработка проростков *Arabidopsis* оокадиновой кислотой в низких концентрациях 0,1 и 1 нМ приводила к выраженным изменениям в организации микротрубочек в разных типах клеток корня уже после 6 и 12 ч обработки. Обнаружено, что повышенной чувствительностью к действию низких концентраций оокадиновой кислоты обладали микротрубочки в клетках зоны элонгации корня, которые дезориентировались либо деполимеризовались после обработки ингибитором, в то время как в клетках зоны дифференциации обработка оокадиновой кислотой приводила к стабилизации кортикальных микротрубочек. Эти результаты позволяют предположить возможное участие протеинфосфатаз, а именно ПФ2А, в регуляции организации кортикальных микротрубочек в клетках высших растений, активность которой,

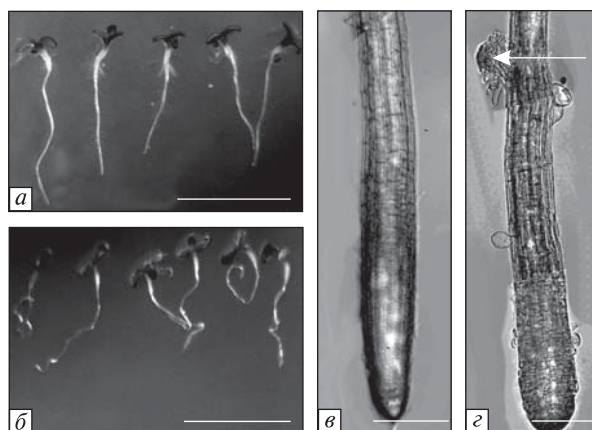


Рис. 3. Направление роста и морфология корней *A. thaliana*: а, в – контрольных; б, з – обработанных 100 нМ оокадиновой кислотой в течение 4 сут. Масштаб: а, б – 10 мм; в, з – 0,1 мм

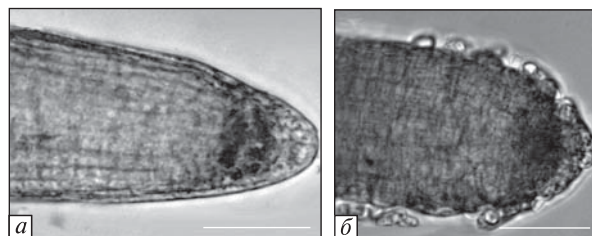


Рис. 4. Морфология корневых апексов проростков *A. thaliana*: а – контроль; б – после обработки 100 нМ оокадиновой кислотой. Масштаб – 100 мкм

как было показано ранее, ингибируется в пределах данных концентраций оокадаиновой кислоты [18, 19]. Правомочность такого предположения подтверждается результатами недавних исследований, в которых было показано, что ПФ2А может вовлекаться в контроль организации кортикальной сети микротрубочек [21]. Недавно с помощью иммунологических и биохимических методов установлено, что ПФ2А кукурузы напрямую взаимодействует с тубулином, что может свидетельствовать о непосредственном взаимодействии этого фермента с микротрубочками *in vivo* [22].

В случае же обработки проростков оокадаиновой кислотой в более высокой концентрации (10 нМ) изменения в организации и ориентации кортикальных микротрубочек наблюдались уже после 3 ч экспозиции растений с ингибитором протеинфосфатаз: в отдельных клетках корневого чехлика микротрубочки были дезорганизованы (рис. 8, а, см. вклейку); в клетках меристемы и клетках коры зоны растяжения кортикальные микротрубочки были полностью деполимеризованы, только в отдельных эпидермальных клетках зоны растяжения сохранились фрагменты кортикальных микротрубочек (рис. 8, б). В клетках зоны дифференциации обработка ингибитором вызывала стабилизацию кортикальных микротрубочек (рис. 8, в). После 1 ч обработки проростков *Arabidopsis* оокадаиновой кислотой в самой высокой из используемых концентраций (100 нМ) во всех типах клеток корня микротрубочки не были обнаружены вообще.

Полученные нами данные относительно влияния оокадаиновой кислоты на организацию микротрубочек в клетках корней *A. thaliana* несколько отличаются от более ранних результатов других авторов. В работе [10] показано, что только длительная обработка проростков оокадаиновой кислотой в высокой концентрации (300 нМ, 15 ч) приводит к дезорганизации кортикальных микротрубочек в клетках зоны элонгации, тогда как 100 нМ оокадаиновая кислота после аналогичного времени обработки не вызывает видимых изменений в организации кортикальных микротрубочек. Такие отличия в эффективности действия ингибитора протеинфосфатаз на организацию кортикальной сети микротрубочек можно объяснить за

счет разницы в используемых методах обработки проростков оокадаиновой кислотой. В наших экспериментах проростки *Arabidopsis* инкубировали в жидкой среде, содержащей оокадаиновую кислоту, за счет чего вся поверхность корня находилась в непосредственном контакте с ингибитором. В то же время авторы цитируемой работы изучали влияние оокадаиновой кислоты на организацию микротрубочек в клетках корней *A. thaliana* после экспозиции проростков на твердой среде [10], что в свою очередь не обеспечивало полного контакта всех эпидермальных клеток корня с ингибитором.

В ходе наших экспериментов также впервые установлено, что обработка проростков 1 и 10 нМ оокадаиновой кислотой приводит к значительным изменениям в организации микротрубочек корневых волосков. Обнаружено, что после 3 ч обработки проростков 1 нМ оокадаиновой кислотой микротрубочки в корневых волосках имели неупорядоченную ориентацию (рис. 9, а, см. вклейку) по сравнению с исходной ориентацией микротрубочек в корневых волосках необработанных проростков (рис. 5, в). После более продолжительной обработки первичных корней ингибитором протеинфосфатаз в 1 нМ концентрации корневые волоски разветвлялись в процессе роста, а микротрубочки в них были стабилизированы (рис. 9, б). Обработка проростков *Arabidopsis* оокадаиновой кислотой в более высокой концентрации (10 нМ) также приводила к изменениям в организации микротрубочек в корневых волосках. Установлено, что после 3 ч экспозиции проростков с ингибитором протеинфосфатаз в 10 нМ концентрации микротрубочки в корневых волосках были дезориентированы (рис. 9, в), что впоследствии после более длительной обработки оокадаиновой кислотой приводило к их вздутию (рис. 9, г).

Известно, что микротрубочки принимают участие в регуляции направления и стабильности апикального роста корневых волосков [23]. Ранее установлено, что деполимеризация или стабилизация микротрубочек в клетках корневых волосков приводит к нарушению полярности их роста и вызывает формирование множественных независимых точек роста в одном корневом волоске [24]. Анализируя по-

лученные данные, можно предположить, что изменение исходной ориентации микротрубочек в корневых волосках вследствие возможного ингибирования ПФ2А может являться причиной изменения их морфологии и направленности роста. Представленные нами результаты согласуются с литературными данными относительно роли ПФ2А в клетках, обладающих апикальным типом роста, а именно в пыльцевых трубках [25]. Недавно было показано, что ингибирование ПФ2А после обработки пыльцевых трубок у *Lilium longiflorum* наномольными концентрациями ингибиторов протеинфосфатаз, в том числе и окадаиновой кислотой, приводило к нарушению организации микротрубочек и соответственно вызывало ветвление пыльцевых трубок [25].

На основании полученных результатов о влиянии окадаиновой кислоты на организацию микротрубочек в клетках различных функциональных зон первичного корня *A. thaliana* показано, что ингибирование протеинфосфатаз по-разному влияет на организацию микротрубочек в зависимости от типа клеток, вызывая деполимеризацию кортикальных микротрубочек в клетках зоны растяжения корня либо приводя к стабилизации микротрубочек в клетках зоны дифференциации. Таким образом, можно сделать вывод о том, что индукция гиперфосфорилирования белков посредством ингибирования протеинфосфатаз может принимать активное участие в организации микротрубочек растительных клеток.

Ya.O. Sheremet, A.I. Yemets,
J.-P. Verbelen, Ya.B. Blume

THE EFFECT OF OKADAIC ACID ON ROOT MORPHOLOGY OF *ARABIDOPSIS THALIANA* AND MICROTUBULE ORGANIZATION IN ITS CELLS

To investigate the functional role of protein hyperphosphorylation in plant cells the general morphology of *Arabidopsis thaliana* primary roots and structural-functional property of cortical microtubules were studied after treatment with okadaic acid, specific inhibitor of protein phosphatases PP1 and PP2A. It has been estimated that okadaic acid affects microtubule organization in a different manner depending from the type of the cells and functional zones of the primary root. It was found that the microtubules in epidermis and cortex cells of distal elongation zone which depolymerized after inhibitor treatment were the most sensitive to 0,1, 1 and 10 nM okadaic acid con-

centrations. In trichoblasts, antichoblasts and cortex cells of differentiation zone treatment with okadaic acid caused the microtubules stabilization. Okadaic acid influences were particularly evident in root hair morphology, root hairs swelling and branching as a result of abnormal microtubules orientation observed. According to the data obtained, we can suggest that induction of protein hyperphosphorylation as a result of protein phosphatase inhibition plays crucial key in plant cell microtubule organization.

Я.О. Шеремет, А.І. Ємець,
Ж.-П. Вербелен, Я.Б. Блюм

ВПЛИВ ОКАДАЇНОВОЇ КИСЛОТИ НА МОРФОЛОГІЮ КОРЕНЯ *ARABIDOPSIS THALIANA* ТА ОРГАНІЗАЦІЮ МІКРОТРУБОЧОК В ЙОГО КЛІТИНАХ

Для вивчення функціональної ролі гіперфосфорилування в рослинній клітині досліджено вплив окадаїнової кислоти, специфічного інгібітора протеїнфосфатаз ПФ1 та ПФ2А на загальну морфологію коренів проростків *Arabidopsis thaliana* та структурно-функціональні особливості кортикальних микротрубочок в різних типах клітин всіх ростових зон первинного кореня. Встановлено, що окадаїнова кислота по-різному впливає на організацію микротрубочок в залежності від типу клітин і функціональної зони кореня. Виявлено, що найбільшу чутливість до 0,1; 1 та 10 нМ концентрацій інгібітора мають кортикальні микротрубочки в епідермальних клітинах та клітинах кори зони розтягу кореня, які повністю деполімеризувались після обробки інгібітором. В трихобластах та атрихобластах, а також в епідермальних клітинах зони диференціації обробка окадаїновою кислотою викликала стабілізацію кортикальних микротрубочок. Показано також, що обробка окадаїновою кислотою в значній мірі впливає на морфологію кореневих волосків, викликаючи їх розгалуження та вздуття внаслідок порушення в них нативної орієнтації микротрубочок. Із отриманих результатів можна зробити висновок про те, що індукція гіперфосфорилування білків шляхом інгібування протеїнфосфатаз приймає активну участь в організації микротрубочок рослинних клітин.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Hunter T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling // Cell. – 1995. – **80**. – P. 225–236.
2. Blume Ya.B., Smertenko A., Ostapets N.N., Vyklický V., Draber P. Post-translational modifications of plant tubulin // Cell Biol. Int. – 1997. – **21**. – P. 918–920.
3. Blume Ya., Yemets A., Sulimenko V., Sulimenko T., Chan J., Lloyd C., Draber P. Evidence of tyrosine phosphorylation of plant tubulin // Planta. – 2008. – **228**(6). – P. 1–8.
4. Goddard R., Wick S., Silflow C., Snustad D. Microtubule

- components of plant cell cytoskeleton // *Plant Physiol.* – 1994. – **104**. – P. 1–6.
5. Гусев Н. Протеинкиназы: строение, классификация, свойства и биологическая роль // *Соров. обзорно-научный журн.* – 2000. – **12**. – С. 4–12.
 6. Luan S. Protein phosphatases in plants // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2003. – **54**. – P. 63–92.
 7. Farkas I., Dombrádi V., Miskei M., Szabados L., Koncz C. *Arabidopsis* PPP family of serine/threonine phosphatases // *Trends Plant Sci.* – 2007. – **12**. – P. 169–176.
 8. Wang H., Chevalier D., Larue C., Ki Cho S., Walker J. The protein phosphatases and protein kinases of *Arabidopsis thaliana*. The *Arabidopsis* book / Eds C.R. Somerville, E.M. Meyerowitz. – Rockville : Amer. Soc. Plant Biol., 2007. – P. 1–38.
 9. Fernández J.J., Candenás M.L., Souto M.L., Trujillo M.M., Norte M. Okadaic acid, useful tool for studying cellular processes // *Curr. Med. Chem.* – 2003. – **9**. – P. 229–262.
 10. Baskin T.I., Wilson J.E. Inhibitors of protein kinases and phosphatases alter root morphology and disorganize cortical microtubules // *Plant Physiol.* – 1997. – **113**. – P. 493–502.
 11. Hasezava S., Nagata T. Okadaic acid as a probe to analyse the cell cycle progression in plant cells // *Bot. Acta.* – 1992. – **105**. – P. 63–69.
 12. Katsuta J., Shibaoka H. Inhibition by kinase inhibitors of the development and the disappearance of the preprophase band of microtubules in tobacco BY-2 cells // *Cell Sci. J.* – 1992. – **103**. – P. 397–405.
 13. Mathur J., Chua N.H. Microtubule stabilization leads to growth reorientation in *Arabidopsis* trichomes // *Plant Cell.* – 2000. – **12**. – P. 465–477.
 14. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* – 1962. – **15**. – P. 473–497.
 15. Yemets A., Sheremet Y., Vissenberg K., Van Orden J., Verbelen J.-P., Blume Y. B. Effects of tyrosine kinase and phosphatase inhibitors on microtubules in *Arabidopsis* root cells // *Cell Biol. Int.* – 2008. – **32**. – P. 630–637.
 16. Лакун Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1980. – 293 с.
 17. Smith R., Walker J. Plant protein phosphatases // *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1996. – **47**. – P. 101–125.
 18. Rojo E., Titarenko E., Leon J., Berger S., Vancanney G., Sanchez-Serrano J. Reversible protein phosphorylation regulates jasmonic acid-dependent and independent wound signal transduction pathways in *Arabidopsis thaliana* // *Plant J.* – 1998. – **13**. – P. 153–165.
 19. Smith R., Wilson J., Walker J., Baskin T. Protein-phosphatase inhibitors block root hair growth and alter cortical cell shape of *Arabidopsis* roots // *Planta.* – 1994. – **194**. – P. 516–524.
 20. Masson P.H., Tasaka M., Morita M.T., Guan C., Chen R., Boonsirichai K. *Arabidopsis thaliana*: a model for the study of root and shoot gravitropism. The *Arabidopsis* book / Eds C.R. Somerville, E.M. Meyerowitz. – Rockville : Amer. Soc. Plant Biol., 2002. – P. 1–23.
 21. Camilleri C., Azimzadeh J., Pastuglia M., Bellini C., Grandjean O., Bouchez D. The *Arabidopsis* TONNEAU2 gene encodes a putative novel protein phosphatase 2A regulatory subunit essential for the control of the cortical cytoskeleton // *Plant Cell.* – 2002. – **14**. – P. 833–845.
 22. Awotunde O., Lechward K., Krajewska K., Zolnierowicz S., Muszynska G. Interaction of maize (*Zea mays*) protein phosphatase 2A with tubulin // *Acta Biochem. Pol.* – 2003. – **50**. – P. 131–138.
 23. Vassileva V., Kouchi H., Ridge R. Microtubule dynamics in living root hairs: transient slowing by lipochitin oligosaccharide nodulation signals // *Plant Cell.* – 2005. – **17**. – P. 1777–1787.
 24. Bibikova T., Blancaflor E., Gilroy S. Microtubules regulate tip growth and orientation in root hairs of *Arabidopsis thaliana* // *Plant J.* – 1999. – **17**. – P. 657–665.
 25. Foissner I., Grolig F., Obermeyer G. Reversible protein phosphorylation regulates the dynamic organization of the pollen tube cytoskeleton: effects of calyculin A and okadaic acid // *Protoplasma.* – 2002. – **220**. – P. 1–15.

Поступила 18.06.08