

И. И. Горюнова, Ю. А. Красиленко, В. А. Заславский, А. И. Емец

Влияние кадмия на организацию актиновых филаментов в клетках корней *Arabidopsis thaliana*

(Представлено академиком НАН Украины Я. Б. Блюмом)

Влияние распространенного загрязнителя почв — кадмия (Cd^{2+}) на актиновые филаменты растительной клетки в настоящее время недостаточно изучены. В нашей работе показано, что NdSO_4 ингибирует рост главных корней проростков *Arabidopsis thaliana* (*GFP-FABD2*), вызывает различные нарушения морфологии корней, причиной которых (наряду с другими) является нарушение организации актиновых филаментов. В частности, было установлено, что обработка проростков NdSO_4 в концентрациях 5–20 мкмоль/л вызывает реориентацию и деполимеризацию актиновых филаментов в клетках меристемы, переходной зоны и зоны роста главных корней, что может быть причиной изменений темпов их роста и морфологии. Следовательно, микрофиламенты являются одной из внутриклеточных мишеней Cd^{2+} при реализации клеточных механизмов его фитотоксичности.

Кадмий (Cd^{2+}) является одним из наиболее распространенных водорастворимых загрязнителей, который накапливается как в корнях, так и в побегах растений, ингибируя их рост, нарушая поглощение и транспорт воды, кальция, магния, фосфора и калия [1]. На клеточном уровне Cd^{2+} накапливается в вакуолях цитоплазмы, при этом образуя наполненные Cd^{2+} везикулоподобные структуры [2] и нарушая функциональность цитоплазматических мембран [1]. Наравне с ингибированием роста при обработке семян *Pisum sativum* L. $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ происходит задержка и/или нарушение митоза (появление κ -митозов, одинарных и двойных мостов, преждевременное расхождение хромосом и т. д.), в том числе и вследствие деполимеризации веретен деления [3]. В научной публикации [4] показано, что в меристематических клетках корней *Vicia faba* L. Cd^{2+} вызывает развитие мультиполярности, полиплоидию, появление хромосомных мостов и фрагментацию веретен деления. CdSO_4 в широком диапазоне концентраций обладает анеугенным действием (нарушает прохождение митоза и цитокинеза) при обработке клеток меристемы *Allium cepa* L., а также способствует образованию двуядерных клеток, одной из причин чего, как предполагалось, является нарушение цитоскелета клетки [5]. Ранее было установлено [6], что реориентация и частичная деполимеризация микротрубочек происходят в клетках меристемы *A. cepa* L. под воздействием ионов кадмия, что может быть объяснено инициацией ионами Cd^{2+} значительной реорганизации микротрубочек, вследствие сокращения свободных сульфгидрильных групп тубулина, наличие которых играет важную роль в полимеризации микротрубочек. Обработка проростков *Allium sativum* L. Cd^{2+} нарушает механизмы организации кортикальных микротрубочек интерфазных клеток меристемы корней, а именно, процессы их обратимой сборки, что проявляется в зависимой от дозы и времени обработки рандомизации или же частичной деполимеризации микротрубочек [7]. В культуре одноклеточных водорослей *Spirogyra decimata* CdCl_2 вызывает обратимую реориентацию и фрагментацию актиновых филаментов [8], а также нарушение организации актиновых филаментов (АФ)

© И. И. Горюнова, Ю. А. Красиленко, В. А. Заславский, А. И. Емец, 2014

в корневых волосках корней *Arabidopsis thaliana* (GFP-FABD2), что впоследствии вызывает нарушения везикулярного транспорта кальция и его градиента в клетках [9]. Поэтому представлялось целесообразным изучить особенности влияния Cd^{2+} на составляющую часть цитоскелета — АФ, которые играют важную роль в делении клеток, поддержании их формы, движении органелл, осуществлении внутриклеточного транспорта, гравиперцепции. В связи с этим нами было детально изучено влияние кадмия на рост и морфологию главного корня *A. thaliana*, а также на организацию актиновых филаментов в его различных типах клеток.

Эксперименты проводили на четырехсуточных проростках линии *A. thaliana* (L.) Heynh., экспрессирующей химерный ген *gfp-fabd2* (F-актинсвязывающий домен (ABD) гена фибрина (*AtFIM1*) из *A. thaliana*, слитый с геном *gfp*), что позволяет прижизненно визуализировать АФ [10]. Семена *A. thaliana* (GFP-FABD2) были любезно предоставлены проф. Ж.-П. Вербеленом (Университет Антверпена, Бельгия). Для поверхностной стерилизации семена *A. thaliana* выдерживали в 6%-м (*v : v*) растворе гипохлорита натрия в течение 10–15 мин с последующим пятикратным отмыванием стерильной дистиллированной водой, затем их переносили на твердую питательную среду, содержащую половинный набор макро- и микросолей (2,2 г/л) Мурасиге-Скуга (МС) [11], сахарозу (10 г/л), тиамин гидрохлорид (B_1) (0,1 мг/л), миоинозитол (100 мг/л), джелрайт (4 г/л), pH 5,7. Высаженные семена сначала стратифицировали при +4 °С в течение 24 ч, а затем проращивали при постоянной температуре +22 °С и 16/8-часовом фотопериоде.

Проростки обрабатывали CdSO_4 (“Sigma-Aldrich”, USA) в концентрациях 5, 10 и 20 мкмоль/л на протяжении 1, 6, 24, 48 и 72 ч. Для изучения влияния CdSO_4 на рост главных корней *A. thaliana* определяли показатели относительного прироста корней, рассчитанные как соотношение фактического прироста обработанных корней к фактическому приросту корней контроля, которое вычисляли по формуле $\Delta = ((L_{\text{cp}} - L_0)/L_0) \cdot 100\%$ в программе Microsoft Office Excel 2010, где Δ — показатель относительного прироста главных корней, %; L_{cp} — средние значения длин корней обработанных проростков, мм; L_0 — средние значения длин корней необработанных проростков (контроль), мм [12]. Значение длин корней приводили как среднее арифметическое \pm погрешность среднего отклонения ($M \pm m$). Изображения получали с помощью цифровой фотокамеры Canon Power Shot G6 (Canon, Тайвань) в режиме макросъемки сразу после завершения обработки проростков, а затем через 24, 48 и 72 ч. Длину корней определяли с помощью программы ImageJ (версия 1.38 d; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Изменения морфологии главных корней проростков *A. thaliana* изучали с помощью светового микроскопа Axioskop 40 (“Carl Zeiss”, Германия), объективы Plan-Neofluar 10x/0.30, 20x/0.5 и 40x/1.30 Oil DIC. Организацию АФ в эпидермальных клетках меристематической, переходной (дистальной зоны растяжения (центральной части), после обработки CdSO_4 в течение 2 ч, изучали *in vivo* с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 5 PASCAL (“Carl Zeiss”, Германия). Для получения трехмерного изображения использовали аргоновый лазер с длиной волны 488 нм, разделительный фильтр HFT 405/488, эмиссионный фильтр BP 505–570, объективы Plan Aplanachromat 40x/1.4 DIC и 60x/1.4 Oil DIC. Индивидуальную конфигурацию определяли для каждого объекта путем изменения параметров скорости сканирования, точечной диафрагмы и детектора луча. С помощью программного обеспечения версии 4SP2 LSM 510 META (“Carl Zeiss”, Германия) получены трехмерные структуры организации АФ на основе серии оптических срезов (Z-стеков) с интервалом 0,2–0,7 мкм. Все исследования проводили в 3–5 повторах с использованием не менее 10 проростков для каждой концентрации.

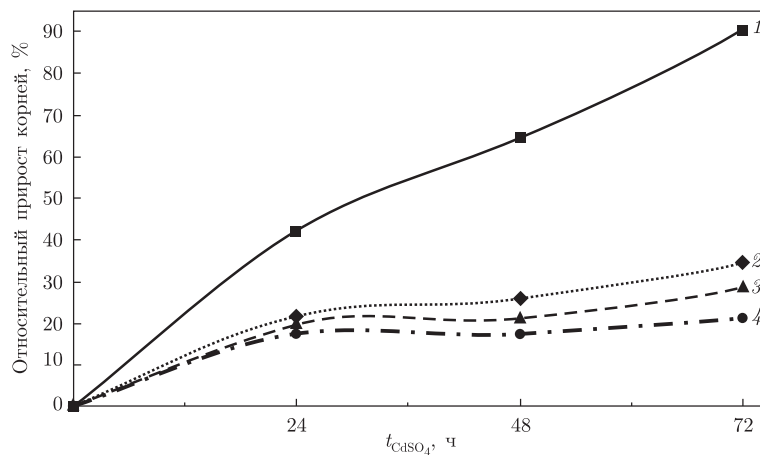


Рис. 1. Влияние Cd^{2+} на рост главных корней *A. thaliana* (GFP-FABD2): 1 — контроль; 2 — 5 мкмоль/л; 3 — 10 мкмоль/л; 4 — 20 мкмоль/л

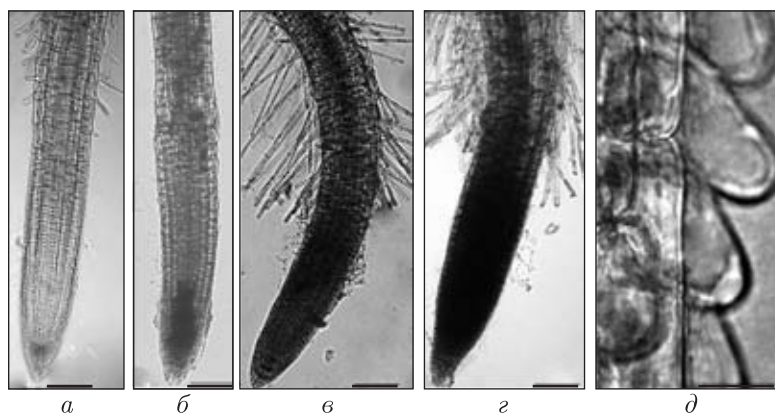


Рис. 2. Морфология главных корней *A. thaliana* (GFP-FABD2) после обработки проростков CdSO_4 в течение 24 ч: а — контроль; б — 5 мкмоль/л; в — 10 мкмоль/л, г — 20 мкмоль/л, д — 5 мкмоль/л. Масштаб: а... г — 200 мкм; д — 20 мкм

В результате проведенных нами исследований было установлено ингибирующее влияние CdSO_4 на рост главных корней проростков *A. thaliana*. Так, через 24 ч обработки CdSO_4 прирост главных корней уменьшался примерно в 1,8–1,9 раза (рис. 1) при 5 мкмоль/л, в 1,9 раза, при 10 мкмоль/л, в 2,1 раза при 20 мкмоль/л. В свою очередь, обработка CdSO_4 на протяжении 48 и 72 ч приводила к ингибированию роста корней приблизительно в 2,3 и 2,5 раза после обработки 5 мкмоль/л, в 2,5 и 2,8 раза при 10 мкмоль/л, в 3,2 и 3,6 раза при 20 мкмоль/л соответственно.

Полученные нами данные согласовываются с результатами других исследований. Так, например, ранее было показано [8], что CdCl_2 в диапазоне концентраций 5–40 мкмоль/л ингибирует рост главных корней и появление корневых волосков у проростков *A. thaliana* (GFP-faBD2), а в диапазоне концентраций 1–1000 мкмоль/л ингибирует рост главных корней *A. sativum* L. [4, 12]. Нами наблюдались изменения морфологии корней после их обработки 5–20 мкмоль/л CdSO_4 , в частности увеличение количества корневых волосков (рис. 2, в, г), а также частичное отмирание меристематических клеток и клеток колумеллы (24 ч) (см. рис. 2, б, в, г), количество которых значительно уве-

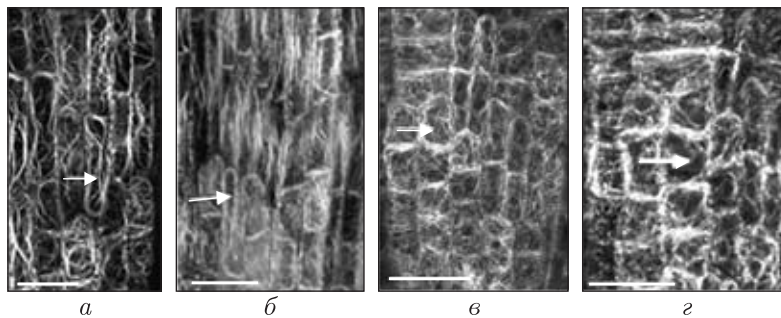


Рис. 3. Организация актиновых филаментов (указано стрелками) в эпидермальных клетках корневого апекса корней *A. thaliana* (GFP-FABD2) после обработки проростков CdSO_4 в течение 1 ч: *a* — контроль; *b* — 5 мкмоль/л; *c* — 10 мкмоль/л; *d* — 20 мкмоль/л.
Масштаб: 20 мкм

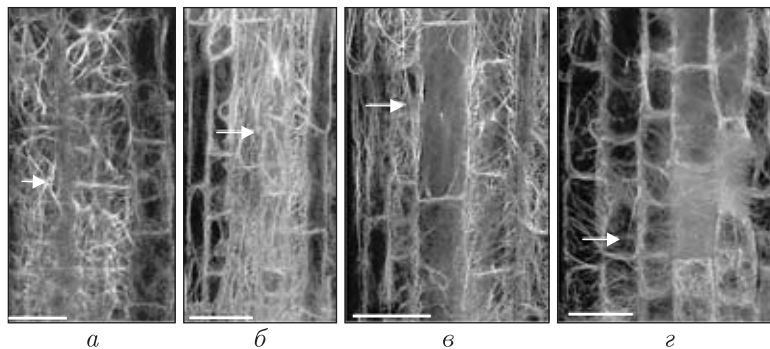


Рис. 4. Организация актиновых филаментов (указано стрелками) в эпидермальных клетках переходной зоны корней *A. thaliana* (GFP-FABD2) после обработки проростков CdSO_4 в течение 1 ч: *a* — контроль; *b* — 5 мкмоль/л; *c* — 10 мкмоль/л; *d* — 20 мкмоль/л.
Масштаб: 20 мкм

личивалось при увеличении времени обработки (48 и 72 ч). В единичных случаях данный эффект наблюдался уже после 6-часовой обработки CdSO_4 . Через 24 ч обработки 5 мкмоль/л CdSO_4 у некоторых образцов наблюдали анизотропное увеличение (набухание) размеров эпидермальных клеток зоны растяжения (см. рис. 2, *b*, *d*). Данные изменения можно частично объяснить повышенной вакуолизацией эпидермальных клеток корневого апекса (набухание эпидермальных клеток) и изменениями организации микрофиламентов.

Известно, что одной из причин изменений роста и морфологии корней является нарушение организации компонентов цитоскелета, в том числе и АФ, поскольку при нефизиологических концентрациях тяжелых металлов существенно замедляется рост корня [4], который в зоне растяжения обеспечивают микрофиламенты [14]. Поэтому следующим этапом работы было изучение организации АФ *in vivo* у разного типа клеток *A. thaliana* (GFP-FABD2) после обработки CdSO_4 .

Так, нами установлено, что актиновые филаменты (микрофиламенты) в интерфазных меристематических клетках необработанных корней *A. thaliana* (GFP-FABD2) представляют собой тонкую и высокодинамическую сетчатую структуру, а в эпидермальных клетках (рис. 3, *a*) и клетках кортекса зон растяжения и дифференциации (рис. 4, *a*) — удлиненные закруженные толстые тяжи.

После обработки 5 мкмоль/л CdSO_4 актиновые филаменты в клетках меристемы представляли собой утолщенные пучки, расположенные вокруг ядра в виде сетчатой структуры, в то время как CdSO_4 в концентрации 10–20 мкмоль/л вызывал частичную или полную их деполимеризацию. В эпидермальных клетках корневого апекса под действием CdSO_4 также наблюдалось изменение ориентации АФ (см. рис. 3, б–г) по сравнению с клетками необработанных проростков (см. рис. 3, а). Так, после обработки 5 мкмоль/л CdSO_4 они формировали утолщенные пучки преимущественно с продольной ориентацией (см. рис. 3, б), тогда как при обработке 10 и 20 мкмоль/л CdSO_4 наблюдался анизотропный рост клеток, в которых актиновые филаменты организовывались в толстые пучки, образуя густую сеть сложноорганизованных структур (см. рис. 3, в, г). Также 20 мкмоль/л CdSO_4 вызывал частичную деполимеризацию АФ (см. рис. 3, г). Следует отметить, что после двухчасовой обработки увеличивалось количество клеток с частичной деполимеризацией, а в некоторых случаях наблюдали их полную деполимеризацию.

Как и в эпидермальных клетках корневого апекса, так и в эпидермальных клетках зоны растяжения главных корней *A. thaliana* (GFP-FABD2) микрофиламенты представляют собой систему длинных и толстых пучков филаментных структур, заполняющих кортекс клетки (см. рис. 3, а и рис. 4, а). В эпидермальных клетках зоны растяжения после обработки 5 мкмоль/л CdSO_4 в течение 1 ч актиновые филаменты представляли собой тонкую сеть с более выраженной продольной ориентацией по сравнению с контролем (см. рис. 4, а). После обработки 10 мкмоль/л CdSO_4 сеть микрофиламентов приобретала в основном косую и продольную ориентации, а при обработке 20 мкмоль/л CdSO_4 АФ формировали в основном тонкую сеть преимущественно поперечно ориентированных филаментов (см. рис. 4, г). Однако после 2 ч обработки 20 мкмоль/л CdSO_4 наблюдалась частичная деполимеризация микрофиламентов, чего не происходило при использовании 5 и 10 мкмоль/л CdSO_4 .

Ранее были показаны только изменения организации АФ в корневых волосках *A. thaliana* в ответ на действие CdCl_2 [10] и высказано предположение, что возможным механизмом действия кадмия на клетки корней *A. thaliana* является избыточное прохождение его по Ca^{2+} -каналам (поскольку Ca^{2+} и Cd^{2+} имеют схожие ионные радиусы) при этом нарушается внутриклеточный кальциевый градиент и происходит замещение Ca^{2+} в клетках, далее активизируется деполимеризация актина. Также показано [9], что Cd^{2+} способен заменять кальций в гельзолине, активизируя его деполимеризирующие свойства по отношению к актину. Поскольку актин является высококонсервативным белком, то результаты, полученные с актином животных клеток, могут в известной степени объяснять механизмы воздействия Cd^{2+} на АФ растительных клеток. Так, было продемонстрировано, что внесение CdCl_2 в концентрации 10 мкмоль/л в клеточную культуру нефронов собаки приводит к необратимой деполимеризации микрофиламентов [15].

Таким образом, нами впервые проведено исследование влияния кадмия на различные типы клеток главных корней проростков *A. thaliana*, установлена взаимосвязь между ингибированием роста главных корней, изменениями их морфологии и реорганизацией АФ в клетках. Установлено, что наиболее чувствительными к действию CdSO_4 являются АФ эпидермальных клеток корневого апекса и клеток меристемы и в меньшей мере микрофиламенты эпидермальных клеток зоны растяжения. Среди возможных механизмов действия Cd^{2+} на эти цитоскелетные структуры следует рассматривать реорганизацию АФ вследствие конкурентного связывания Cd^{2+} с Ca^{2+} , необходимого для функционирования гельзолина, а также через опосредованные механизмы действия Cd^{2+} , среди которых следует выде-

лить кальмодулинзависимые пути. Еще одним общим для токсических металлов молекулярным механизмом действия Cd^{2+} на белки цитоскелета может быть присоединение его ионов к свободным сульфгидрильным группам актина, а также связывание металлов со специфичными сайтами, что целесообразно показать путем создания трехмерных моделей подобных взаимодействий методами *in silico*.

Исследования, результаты которых представлены в данной публикации, частично поддерживались Грантом для молодых ученых от компании ОПТЕК (2013 г.).

1. Nagajyoti P. C., Lee K. D., Sreekanth T. V. M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review // Environ. Chem. Lett. – 2010. – **8**. – P. 199–216.
2. Leintemeir B., Kupper H. Cadmium uptake and sequestration kinetics in individual leaf cell protoplasts of the Cd/Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* // Plant Cell Environ. – 2001. – **34**. – P. 208–219.
3. Siddiqui S., Meghvansi M. K., Wani M. A., Jabee F. Evaluating cadmium toxicity in the root meristem of *Pisum sativum* L // Acta Phys. Plant. – 2009. – **31**. – P. 531–536.
4. Parween T., Jan S., Sharma M. P. M. et al. Genotoxic impact of cadmium on root meristem of *Vicia faba* L // Russ. Agricult. Sci. – 2011. – **37**. – P. 115–119.
5. Довгалоук А. И., Калиняк Т. Б., Блюм Я. Б. Оценка фито- и цитотоксической активности соединений тяжелых металлов и алюминия с помощью корневой апикалярной меристемы лука // Цитология и генетика. – 2001. – **1**. – С. 3–8.
6. Dovgalyuk A., Kalynyak T., Blume Ya. B. Heavy metals have a different action from aluminium in disrupting microtubules in *Allium cepa* L. meristematic cells // Cell Biol. Int. – 2003. – **27**. – P. 193–195.
7. Xu P., Liu D., Jiang W. Cadmium effects on the organization of microtubular cytoskeleton in interphase and mitotic cells of *Allium sativum* // Biol. Plantarum. – 2009. – **53**(2). – P. 387–390.
8. Pribyl P., Cepák V., Zachleder V. Cytoskeletal alterations in interphase cells of the green alga *Spirogyra decimina* in response to heavy metals exposure: I. The effect of cadmium // Protoplasma. – 2005. – **226**. – P. 231–240.
9. Fan J.-L., Wei X.-G., Wan L.-C. et al. Disarrangement of actin filaments and Ca^{2+} gradient by $CdCl_2$ alters cell wall construction in *Arabidopsis thaliana* root hairs by inhibiting vesicular trafficking // J. Plant Physiol. – 2011. – **168**. – P. 1157–1167.
10. Voigt B., Timmers A. C. J., Samaj J. et al. GFP-FABD2 fusion construct allows *in vivo* visualization of the dynamic actin cytoskeleton in all cells of *Arabidopsis* seedlings // Eur. J. Cell Biol. – 2005. – **84**. – P. 95–608.
11. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol Plant. – 1962. – **15**(3). – P. 473–497.
12. Yemets A., Sheremet Y., Vissenberg K. et al. Effects of tyrosine kinase and phosphatase inhibitors on microtubules in *Arabidopsis* root cells // Cell Biol. Int. – 2008. – **32**(6). – P. 630–637.
13. Liu D., Jiang W., Gao X. Effects of cadmium on root growth, cell division and nucleoli in root tip cells of garlic // Biol. Plant. – 2003–2004. – **47**. – P. 79–83.
14. Rahman A., Bannigan A., Sulaman W. et al. Auxin, actin and growth of the *Arabidopsis thaliana* primary root // Plant J. – 2007. – **50**. – P. 514–528.
15. Diaz-Barriga F., Carrizalaens L., Yanez. L. Interaction of cadmium with actin microfilaments *in vitro* // Toxicol. In Vitro. – 1989. – **3**(4). – P. 277–284.

ГУ “Институт пищевой биотехнологии
и геномики НАН Украины”, Киев
Институт ботаники им. Н. Г. Холодного
НАН Украины, Киев

Поступило в редакцию 12.02.2014

І. І. Горюнова, Ю. А. Красиленко, В. А. Заславський, А. І. Ємець

Вплив кадмію на організацію актинових філаментів у клітинах коренів *Arabidopsis thaliana*

*Вплив поширеного поллютанту ґрунтів — кадмію (Cd^{2+}) на актинові філаменти рослинної клітини на сьогодні недостатньо вивчено. У нашій роботі показано, що NdSO_4 інгібує ріст головних коренів проростків *Arabidopsis thaliana* (*GFP-FABD2*), викликає зміну морфології коренів, причиною яких (поряд з іншими) є порушення організації актинових філаментів. Зокрема, було встановлено, що обробка проростків NdSO_4 у концентраціях 5–20 мкмоль/л викликає реорієнтацію і деполімеризацію актинових філаментів у клітинах меристеми, перехідної зони і зони росту головних коренів, що може бути причиною змін темпів їхнього зростання і морфології. Отже, мікрофіламенти є однією з внутрішньоклітинних мішеней Cd^{2+} при реалізації клітинних механізмів його фітотоксичності.*

I. I. Goriunova, Yu. A. Krasylenko, V. A. Zaslavsky, A. I. Yemets

Cadmium effects on the organization of actin filaments in *Arabidopsis thaliana* primary root cells

*The effects of cadmium (Cd^{2+}) as a widespread soil pollutant on the organization of plant actin filaments have not been elucidated. It is revealed that CdSO_4 inhibits the growth of *Arabidopsis thaliana* (*GFP-FABD2*) primary roots that is accompanied by morphological alterations and disturbances of actin filaments organization in primary root cells. It is found that the treatment of seedlings with NdSO_4 (5–20 μM) lead to the reorientation and/or depolymerization of actin filaments in cells of the meristematic, transition, and elongation root zones. Hence, actin filaments are supposed to be one of the intracellular targets for Cd^{2+} in the realization of cellular mechanisms of its phytotoxicity.*