

РЕОРГАНИЗАЦИЯ СИСТЕМЫ МИКРОТРУБОЧЕК КЛЕТОК КОРНЯ *MEDICAGO SATIVA* L. В УСЛОВИЯХ АККЛИМАЦИИ К ОСМОТИЧЕСКОМУ И СОЛЕВОМУ СТРЕССАМ

© Е. М. Лазарева,^{1,2,*} Е. Н. Баранова,² Е. А. Смирнова^{1,2}

¹Кафедра клеточной биологии и гистологии биологического факультета Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, Москва, 119234
²Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, 127550;

* электронный адрес: lazareva-e @yandex.ru

В настоящей работе изучена организация сети микротрубочек в интерфазных клетках корня проростков люцерны посевной *Medicago sativa* L. в условиях акклимации к солевому (NaCl, Na₂SO₄) и осмотическому (маннит Д) стрессам при различных концентрациях агентов. В клетках корня люцерны нами выявлено несколько морфологических типов изменений тубулинового цитоскелета, которые появляются в ходе акклимации к солевому и осмотическому стрессам: 1) прореживание сети микротрубочек, 2) хаотическая ориентация пучков микротрубочек, 3) неоднородные по плотности пучки, 4) утолщение пучков, 5) фрагментация пучков, 6) формирование центров конвергенции микротрубочек. Прореживание сети и утолщение пучков происходит при всех типах стрессов — осмотическом и солевом. Хаотическая ориентация пучков выявляется при действии маннита Д, но не наблюдается при действии солей. Фрагментация пучков, наоборот, происходит при действии солей и проявляется только при высокой концентрации маннита Д. Формирование центров конвергенции микротрубочек чаще встречается в клетках при длительном действии Na₂SO₄, реже NaCl и не наблюдается при действии маннита Д. Наши данные показывают, что в клетках корня люцерны при солевом и осмотическом стрессах сеть кортикальных микротрубочек перестраивается не только в ответ на действие ионов, но и при изменении осмотического давления. Запускать определенные сигнальные пути и молекулярные механизмы, приводящие к реорганизации систем микротрубочек при акклимации растений, могут не только катионы натрия, но и анионы хлора и сульфата в концентрациях, не вызывающих повреждения клеток.

Ключевые слова: *Medicago sativa*, микротрубочки, тубулин, акклимация, солевой стресс, осмотический стресс.

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода, ЦКМТ — центр конвергенции микротрубочек, MAP — белок, ассоциированный с микротрубочками (microtubule associated protein), MAPK — митогенактивируемая протеинкиназа (mitogen activated protein kinase), SOS — сверхчувствительный к соли (salt overly sensitive).

Различные абиотические факторы, такие как почвенное засоление, недостаток влаги и экстремальные температуры, являются основными причинами снижения продуктивности сельскохозяйственных растений. Особую опасность представляет повышенное содержание в почве неорганических ионов, так как их избыток оказывает сильное ингибирующее влияние на рост и урожайность культурных растений (Munns, Tester, 2008). Для разнообразных солончаков мира характерны высокие концентрации солей, включая хлориды, карбонаты и сульфаты магния, кальция, калия и натрия. Для засоленных почв доминантными являются ионы натрия и хлора.

Предполагается, что ключевым ответом клеток на токсическое действие солей является поддержание ионного гомеостаза путем удаления токсических ионов (Tester, Devenport, 2003). Установлено, что толерантность растений к солевому стрессу, вызванному действием хлорида натрия, контролируется эпигенетически, путем активации экспрессии генов специфической регуляторной

системы SOS (Salt Overly Sensitive). Основными компонентами этой системы являются гены, кодирующие кальцийсвязывающий белок p8 (SOS3), серин-треониновую протеинкиназу 8 (SOS2) и Na⁺-H⁺-антипортер плазматической мембраны (SOS1) (Ji et al., 2013). Ответ на солевой стресс специфичен для тканей и органов растения, что проявляется в разном уровне экспрессии генов определенных компонентов каскада сигнальной цепи SOS. Сильнее всего реагируют на солевой стресс клетки корня (Dinpeny et al., 2008). В клетках эпидермиса корней *Arabidopsis thaliana* обнаружен высокий уровень экспрессии SOS1 (Shi et al., 2002) и низкий уровень экспрессии SOS3 (Dinpeny et al., 2008), тогда как в клетках коры и эндодермы выявлен высокий уровень экспрессии только SOS3 (Ji et al., 2013). Также известны сигнальные пути ответа клеток растений на действие солевого стресса, в которых принимают участие фосфолипиды, ионы Ca²⁺, происходит повышение уровня активных форм кислорода (АФК) и выработки абсцизовой кислоты (Julkowska, Testerink, 2015).

Т а б л и ц а 1

Концентрации используемых реагентов

Используемый раствор		[NaCl]		[Na ₂ SO ₄]		[Маннит Д]	
Осмотическое давление		%	мМ	%	мМ	%	мМ
кПа	атмосферы						
202.7	2	0.28	47.8	0.56	44.4	1.51	82.8
405.3	4	0.57	99.1	1.10	87.2	3.03	166.2
607.95	6	0.85	145.2	1.66	131.7	4.55	249.7
810.6	8	1.12	191.4	2.22	176.1	6.06	332.6

Установлены функциональные связи между компонентами сигнального пути SOS и динамикой цитоскелета. Так, хлорид натрия вызывает значительные изменения цитоскелета у мутантов *Arabidopsis sos1* и *sos2*, клетки которых лишены белка переносчика ионов натрия, а ионный гомеостаз нарушен. Этот факт, как считают авторы, свидетельствует о том, что натрий является основным фактором деполимеризации кортикальных микротрубочек при солевом стрессе и что после деполимеризации происходит восстановление уже измененной системы микротрубочек (Wang et al., 2007). Эта реорганизация не приводит к гибели клеток, а является необходимым условием выживания, так как действие паклитаксела, реагента стабилизирующего микротрубочки, вызывало гибель клеток проростков *Arabidopsis* при действии соли. В этой же работе было показано, что в клетках эпидермиса корня нормальных проростков *Arabidopsis* действие хлорида натрия (100 мМ) приводит к деполимеризации пучков кортикальных микротрубочек. При действии солевого стресса нормальное расположение интерфазных микротрубочек меняется и в клетках кукурузы *Zea mays* L. (Blancaflor, Hasenstein, 1995; Dhonukshe et al., 2003).

Необходимо учитывать, что обязательной составляющей солевого воздействия является осмотический стресс, который включает собственные сигнальные системы ответа (Yuzyuk et al., 2002). В работе Ванга и соавторов (Wang et al., 2007) показано, что добавление 100 мМ маннита в среду, не влияет на организацию кортикальных микротрубочек в клетках эпидермиса корня проростков *Arabidopsis*. На этом основании авторы утверждают, что перестройка сети микротрубочек происходит в ответ на действие солевого стресса, а осмотический стресс, вызванный маннитом, не вызывает изменений (Wang et al., 2007). Однако данные о действии соли и маннита трудно сопоставимы, так как осмотическое давление раствора, содержащего 100 мМ NaCl, составляет около 4 атм, а тот же показатель раствора, содержащего 100 мМ маннита, составляет только 2 атм. Поэтому принципиально важный вопрос о различном влиянии на динамику микротрубочек осмотического и солевого стрессов остается открытым.

В настоящей работе изучена организация сети микротрубочек в интерфазных клетках корня проростков люцерны посевной *Medicago sativa* L. в условиях акклимации к солевому и осмотическому стрессам. Целью работы являлось изучение влияния осмотической составляющей солевого стресса на микротрубочки интерфазных клеток при пролонгированном действии на проростки люцерны осмотика — маннита и солей — сульфата и хлорида натрия. Для оценки влияния компонентов солевого и осмотического

стресса использовали изотонические соотношения солей хлорида и сульфата натрия и маннита, поддерживающие в растворах одинаковое осмотическое давление.

Материал и методика

Объект исследований — люцерна полевая *Medicago sativa* L. (2n = 32), сорт «Надежда». Семена получены во Всероссийском научно-исследовательском институте кормов им. В. Р. Вильямса.

Создание условий солевого и осмотического стрессов. Семена замачивали в растворах солей и осмотика на 24 ч в темноте во влажной изолированной камере. Проросшие семена помещали в рулонную культуру при 24 °С, располагая между слоями стерильной скрученной фильтровальной бумаги, которую помещали в стеклянные цилиндры с растворами солей и маннита Д. 3-суточные проростки с четко выраженными семядолями и корнями переводили в условия 12 ч фотопериода, температура на свету — 20—25 °С, в темноте — 17—18 °С.

Акклимацию проростков к солевому стрессу проводили в течение 4 и 8 сут в растворах низких концентраций солей NaCl и Na₂SO₄ и осмотика маннита Д. Концентрации используемых растворов приведены в табл. 1.

Каждый эксперимент повторяли 3 раза, для каждого эксперимента брали 100 семян люцерны, из которых в разных условиях выросло разное число проростков. Среднее число анализируемых проростков приведено в разделе «результаты».

Для оценки влияния факторов солевого стресса использовали изотонические соотношения солей NaCl и Na₂SO₄, поддерживающие в растворах одинаковое осмотическое давление (2, 4, 6, 8 атм; 1 атм = 101.325 кПа). Расчет концентраций маннита проводили по формуле

$$P = CRT/m,$$

где P — давление, кПа; m — молекулярная масса маннита Д (182.2 г); RT — осмотический коэффициент (2436); C — концентрация раствора маннигола Д, г/л.

Оценка влияния акклимации к солевому стрессу на жизнеспособность растений. Чтобы исключить вероятность гибели растений в наших экспериментах, проростки, развивающиеся в течение 3 нед в присутствии NaCl, Na₂SO₄ и маннита Д (в концентрациях, обеспечивающих в растворах осмотическое давление, равное 2, 4, 6 и 8 атм), помещали в грунт и наблюдали за

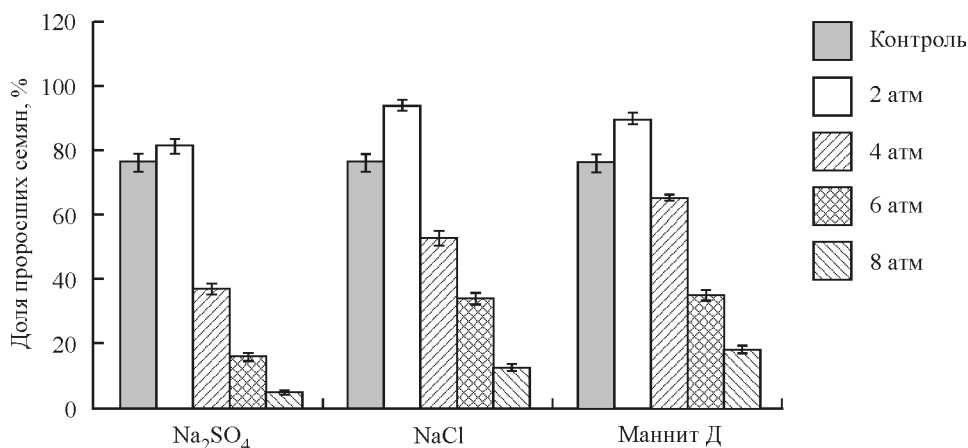


Рис. 1. Влияние солей NaCl, Na₂SO₄ и осмотика маннита Д на прорастание семян люцерны *Medicago sativa* L.

Значения осмотического давления, создаваемого растворами солей и осмотика с различными концентрациями, приведены в атмосферах (атм).

их развитием. Показателем жизнеспособности растений считалось появление первых листьев.

Оценка устойчивости к засолению по способности семян к прорастанию и длины корней. Семена проращивали в чашках Петри в присутствии различных концентраций маннита, NaCl и Na₂SO₄ по 100 штук для каждой концентрации. В контроле 100 семян проращивали без добавления солей или осмотика. Через 8 сут проводили подсчет проростков в каждой чашке Петри и измерение длины корней.

Фиксация и приготовление препаратов мацерированных клеток. Кончики корней (3–4 мм) проростков отрезали и фиксировали через 4, 6 и 8 сут в растворе 4%-ного параформальдегида (Sigma-Aldrich, США) на РНЕМ-буфере (pH 6.9; состав: 60 mM PIPES, 25 mM HEPES, 10 mM EGTA и 2 mM MgCl₂ (все компоненты Sigma-Aldrich, США)), в течение 1.5–2 ч при комнатной температуре. Фиксатор отмывали в РНЕМ-буфере. Для мацерации корни помещали в раствор, содержащий 2 % целлюлазы (Sigma-Aldrich, США) на Na-ацетатном буфере (pH 5.0), обработанные корни накапливали в РНЕМ-буфере. Затем корни переносили в каплю буфера на покровное стекло и разделяли на клетки металлической иглой. Готовые препараты высушивали в холодильнике при 4 °C в течение 24 ч.

Иммунолокализация тубулина. Препараты помещали в РНЕМ-буфер на 5 мин, затем переносили на 30 мин в раствор 0.5%-ного Тритон X-100 на РНЕМ буфере, содержащем 5 % DMSO, после чего инкубировали в 5%-ной козьей сыворотке в течение 20 мин для блокирования неспецифического связывания антител. Препараты отмывали в 10 mM Трис-буфере (pH 7.6) и инкубировали 16–18 ч при комнатной температуре с мышиными моноклональными антителами к тубулину (клон DM1α) (Sigma-Aldrich, США) в разведении 1 : 100 на 10 mM Трис-буфере (pH 7.6), содержащем 0.1 % BSA. Затем препараты последовательно отмывали в 10 mM Трис-буфере (pH 7.6) и 20 mM Трис-буфере (pH 8.2) и инкубировали с козьими антителами к IgG мыши, конъюгированными с Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, США) в разведении 1 : 400, в течение 45 мин при 37 °C. Препараты окрашивали DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) (Sigma-Aldrich, США), заключали в Mowiol 4-88 (Hoechst, Германия) и анализировали на микроскопе Axiovert 200 M (Zeiss, Германия) с эпифлуоресцентным освещением и набором

фильтров (с пиком возбуждения 450–480 нм и пиком эмиссии 515–565 нм для Alexa Fluor 488; с пиком возбуждения 365 нм и пиком эмиссии 420 нм для DAPI) и объективом Neofluar ×100/1,24. Изображения получали с помощью цифровой камеры AxioCam HRm и обрабатывали в программе Adobe Photoshop 7.0. Для каждой клетки анализировали несколько оптических сечений на уровне ядра и в области кортикальной цитоплазмы.

Трансмиссионная электронная микроскопия. У проростков после 4 сут акклимации к 87.2 mM (4 атм) Na₂SO₄ отрезали кончики корней (2–4 мм) и фиксировали в 2.5%-ном растворе глутарового альдегида (Sigma-Aldrich, США) на 0.1 M фосфатном буфере Зоренсена (pH 7.3) с сахарозой (0.15 мг/мл) в течение 2 ч при комнатной температуре. После отмывки в 0.1 M буфере Зоренсена образцы дофиксировали в 1%-ном растворе OsO₄ 1 ч при 4 °C, обезживали и заключали в смолу Эпон-812 по стандартной методике. Ультратонкие срезы докрашивали цитратом свинца по Рейнольдсу, отмывали, высушивали и изучали с использованием трансмиссионного электронного микроскопа H-300 (Hitachi, Япония).

Результаты

В ходе исследования была проведена оценка устойчивости семян к действию осмотика и солей путем сравнения числа семян, проросших в обычных условиях и в присутствии различных концентраций маннита Д, NaCl и Na₂SO₄.

На рис. 1 представлена гистограмма, отражающая влияние NaCl, Na₂SO₄ и маннита Д на прорастание семян люцерны. Как показано на рис. 1, при концентрации реагентов, соответствующих значению осмотического давления 2 атм, наблюдается стимуляция прорастания. Если в контроле проросло 76.2 % семян (среднее значение по 3 опытам) от 100 исходных, то в присутствии маннита Д — 90 %, NaCl — 94, Na₂SO₄ — 81.4 %. Полученные данные указывают на позитивное влияние низкого осмотического давления на процесс прорастания. При увеличении концентрации реагентов до величин, соответствующих осмотическому давлению 4 атм, показатели всхожести уменьшаются до 65 % (в среднем 65 проростков) в присутствии маннита Д, до 52.8 % (в среднем 53 пророст-

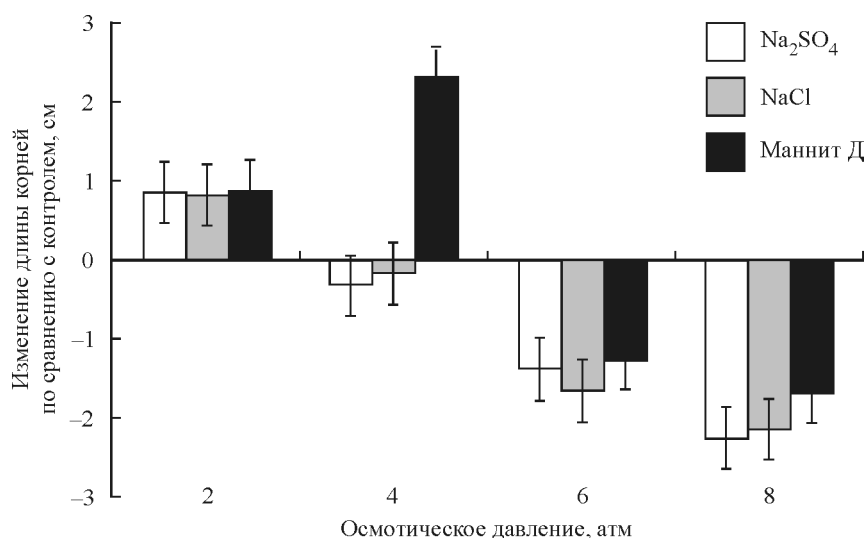


Рис. 2. Изменение длины корней проростков *Medicago sativa* L. на фоне действия NaCl, Na₂SO₄ и маннита Д.

По вертикали: разница между средними значениями длин корней проростков, подвергавшихся действию солей и маннита Д, и контрольных проростков (принятых за нулевую точку отсчета); по горизонтали: осмотическое давление.

ка) при действии NaCl и до 37 % (в среднем 37 проростков) при действии Na₂SO₄. Дальнейшее повышение концентрации приводит к уменьшению числа проросших семян, при этом наибольшим ингибирующим действием обладает Na₂SO₄. Так, при концентрации реагентов, соответствующей осмотическому давлению 6 и 8 атм, число проростков уменьшается в среднем до 35 и 18 при действии маннита Д, до 34 и 12 при действии NaCl и до 16 и 4 при действии Na₂SO₄.

Мы провели измерение длины корешков 4-суточных проростков, находящихся в обычных условиях и в присутствии различных концентраций маннита Д, NaCl и Na₂SO₄, соответствующих осмотическому давлению 2, 4, 6, 8 атм. На рис. 2 приведена гистограмма, отражающая изменения длины корней проростков по сравнению с длиной корней контрольных растений. Полученные данные указывают на то, что соли и маннит Д в концентрациях, соответствующих осмотическому давлению 2 атм, стимулируют рост корней. Незначительное угнетение роста корней наблюдается при действии NaCl и Na₂SO₄ в концентрациях, соответствующих осмотическому давлению 4 атм, в то же время действие раствора маннита Д с тем же осмотическим давлением (4 атм) вызывало стимуляцию роста корней. Уменьшение длины корней по сравнению с контролем происходит при действии всех использованных веществ в концентрациях, создающих осмотическое давление 6 и 8 атм. Наибольшим ингибирующим действием обладает Na₂SO₄ в концентрации, соответствующей осмотическому давлению 8 атм.

Было замечено, что при акклимации к осмотику и солям изменялась морфология корней. На рис. 3 представлены проростки люцерны после 4 и 8 сут роста в нормальных условиях и после акклимации к действию маннита Д, NaCl и Na₂SO₄. Как показано на рис. 3, а, контрольные проростки имели прямые корни и вытянутый гипокотиль. После 4 сут акклимации к манниту Д в концентрации, соответствующей осмотическому давлению 4 атм, наблюдали изменения в морфологии проростков: у одних растений корни имели спиральную форму и короткий гипокотиль, в то время как у других гипокотиль был вытянутый и извитой (рис. 3, б). После 4 сут акклимации к

Na₂SO₄ в концентрации, соответствующей 4 атм, проростки имели спиральевидные корни и гипокотили (рис. 3, в), однако даже через 8 сут встречались растения с прямыми корнями и гипокотильями (рис. 3, з). После 8 сут акклимации к NaCl в концентрации, соответствующей осмотическому давлению 4 атм, корни проростков имели спиральную форму и утолщенный гипокотиль (рис. 3, д). При акклимации в течение 8 сут к манниту Д (рис. 3, е) и Na₂SO₄ (рис. 3, ж, з) в концентрациях, соответствующих осмотическому давлению 6 и 8 атм, у проростков наблюдали значительное угнетение роста корней и гипокотилей.

Как известно, нарушения роста и развития корней могут быть связаны с изменениями организации микротрубочек в клетках (Barlow, Baluska, 2000). Мы провели изучение организации системы микротрубочек в клетках из зоны деления и зоны растяжения корней в ходе акклимации к осмотическому и солевому стрессам.

Контроль. В цитоплазме интерфазных клеток (рис. 4, а, б) микротрубочки располагаются в кортикальной зоне цитоплазмы и сгруппированы в пучки, параллельные друг другу и перпендикулярные длинной оси клетки.

Маннит Д, акклимация в течение 4 сут. В ходе акклимации проростков к 82.8 мМ манниту (2 атм) в клетках наблюдается реорганизация сети микротрубочек, кортикальных пучков выявляется значительно меньше, чем в клетках контрольных проростков, эти пучки не параллельны друг другу и образуют своеобразные «метелки», лежащие отдельно друг от друга (рис. 4, в, з). После акклимации к 166.2 мМ манниту (4 атм) во всех клетках присутствуют более плотные по сравнению с контролем кортикальные пучки микротрубочек, которые формируют прореженную сеть. В некоторых клетках пучки расположены как вдоль, так и поперек клетки или формируют структуры, подобные «вееру» (рис. 4, д). После акклимации к 249.7 мМ манниту (6 атм) в клетках также выявляются прореженные и более плотные, чем в контроле, кортикальные пучки микротрубочек. В некоторых клетках кортикальные пучки состоят из чередующихся плотных и рыхлых участков, а некоторые пучки

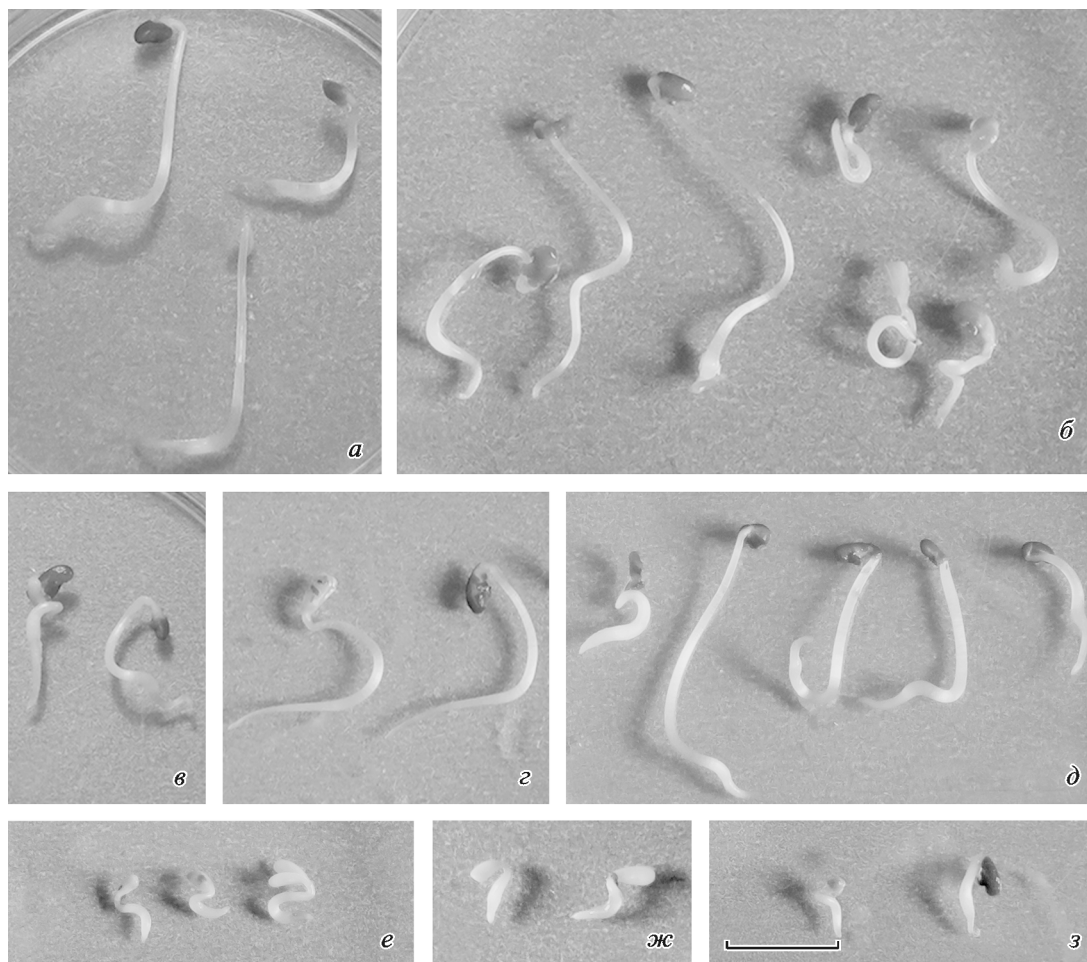


Рис. 3. Морфология проростков *Medicago sativa* L. в контрольных условиях (а) и после акклимации к различным концентрациям маннита Д, NaCl и Na₂SO₄ (б—з).

б — маннит Д, 4 сут, 4 атм; в — Na₂SO₄, 4 сут, 4 атм; г — Na₂SO₄, 8 сут, 4 атм; д — NaCl, 8 сут, 4 атм; е — маннит Д, 8 сут, 6 атм; ж — Na₂SO₄, 8 сут, 6 атм; з — Na₂SO₄, 8 сут, 8 атм. Масштабный отрезок — 1 см.

фрагментированы и выявляются в виде дискретных флуоресцирующих участков (рис. 4, е).

Маннит Д, акклимация в течение 8 сут. После акклимации проростков в присутствии 249.7 мМ маннита (6 атм) часто выявляли клетки, у которых плотные пучки кортикальных микротрубочек располагаются под углом к ее длинной оси (рис. 4, ж). После повышения концентрации маннита до 330 мМ (8 атм) среди клеток встречаются такие, у которых редкие и плотные кортикальные пучки расположены под углом к оси клетки (рис. 4, з). Кроме этого, часто встречали клетки с неоднородными по плотности пучками (рис. 4, и, к), в некоторых клетках такие пучки формируют прореженную сеть (рис. 4, л).

Хлорид натрия, акклимация в течение 4 сут. После акклимации проростков к 47.8 мМ NaCl (2 атм) в клетках наблюдали дезорганизацию кортикальных пучков микротрубочек (рис. 5, а—г), нарушается их параллельное расположение, пучков становится меньше, чем в клетках контрольных проростков. В некоторых клетках пучки, подобные «метелкам», образуют центры конвергенции микротрубочек (рис. 5, а, в). Иногда тонкие пучки микротрубочек в составе «метелок» кортикальных пучков состоят из чередующихся плотных и рыхлых участков (рис. 5, б). Кроме этого, встречаются клетки, в которых выявляли плотные пучки, формирующие проре-

женную сеть (рис. 5, г). После акклимации проростков к 99.1 мМ NaCl (4 атм) выявляли клетки с плотными кортикальными пучками, которые не имеют упорядоченного параллельного расположения и хаотически переплетаются (рис. 5, д). После акклимации проростков к 145.2 мМ NaCl (6 атм) встречаются клетки с плотными кортикальными пучками, которые формируют прореженную кортикальную сеть (рис. 5, е).

Хлорид натрия, акклимация в течение 8 сут. При акклимации к 99.1 мМ NaCl (4 атм) выявляли клетки с центрами конвергенции микротрубочек в периферической цитоплазме и около ядра и неоднородными по плотности или фрагментированными, хаотически переплетающимися пучками микротрубочек (рис. 5, ж, з). При акклимации к 145.2 мМ NaCl (6 атм) выявляли клетки с прореженной кортикальной сетью и неоднородными по плотности пучками (рис. 5, и), редко расположенными плотными пучками (рис. 5, л), хаотически расположенными фрагментированными или неоднородными по плотности пучками (рис. 5, к), параллельно расположенными пучками, имеющими неоднородные по плотности участки (рис. 5, м). При акклимации проростков к 191.4 мМ NaCl (8 атм) в клетках выявляли плотные, редко расположенные, фрагментированные и неоднородные по плотности пучки, сходные с представленными на рис 5, к, л.

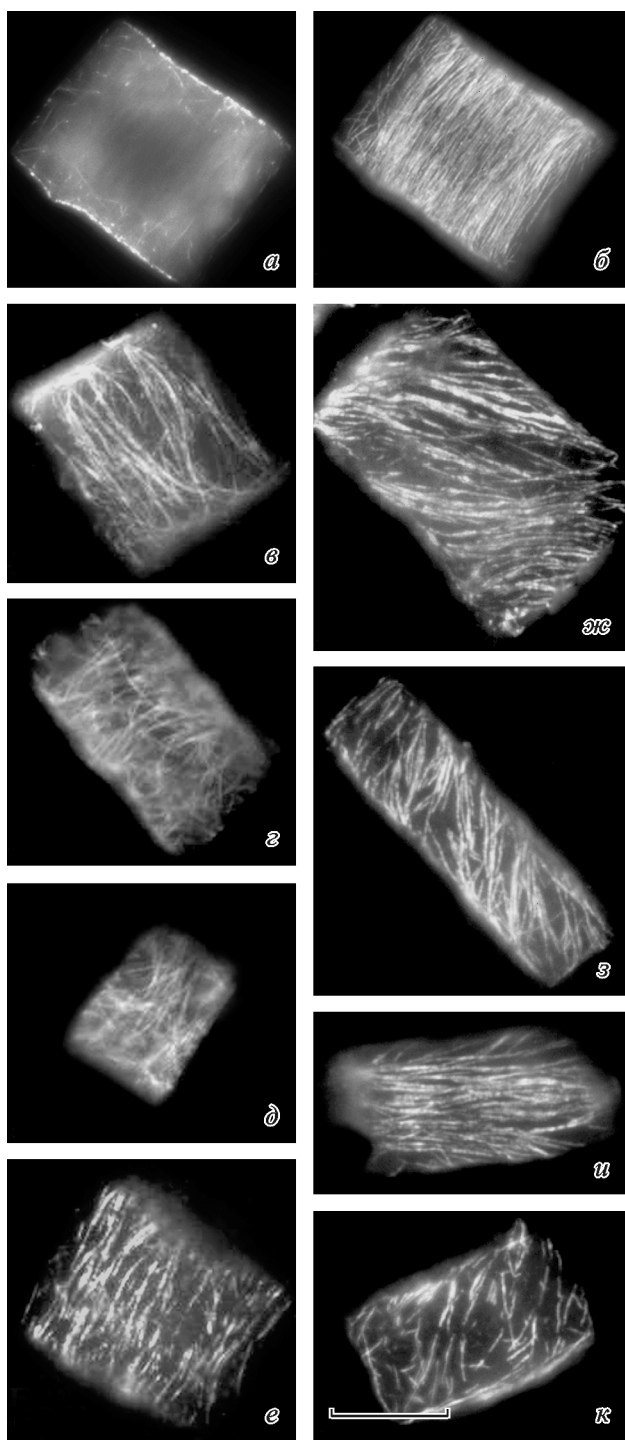


Рис. 4. Иммуноцитохимическое окрашивание с помощью антител к тубулину клеток корня проростков люцерны *Medicago sativa* L. в контроле и после акклимации к манниту Д.

a, б — контрольные клетки, в кортикальной цитоплазме выявляются параллельные друг другу пучки микротрубочек. *в—е* — тубулиновый цитоскелет после 4 сут акклимации к манниту Д: *в, г* — акклимация к 2 атм, показаны клетки с хаотическим расположением кортикальных пучков; *д* — акклимация к 4 атм, показана клетка с плотными пучками, формирующими хаотическую прореженную сеть; *е* — акклимация к 6 атм, показана клетка с неоднородными по плотности и фрагментированными пучками. *ж—к* — тубулиновый цитоскелет после 8 сут акклимации к манниту Д: *ж* — акклимация к 6 атм, клетка с диагональным расположением пучков; *з—к* — акклимация к 8 атм, показаны клетки с диагональным расположением пучков (*з*) и с неоднородными по плотности пучками (*и, к*). Масштабный отрезок — 10 мкм.

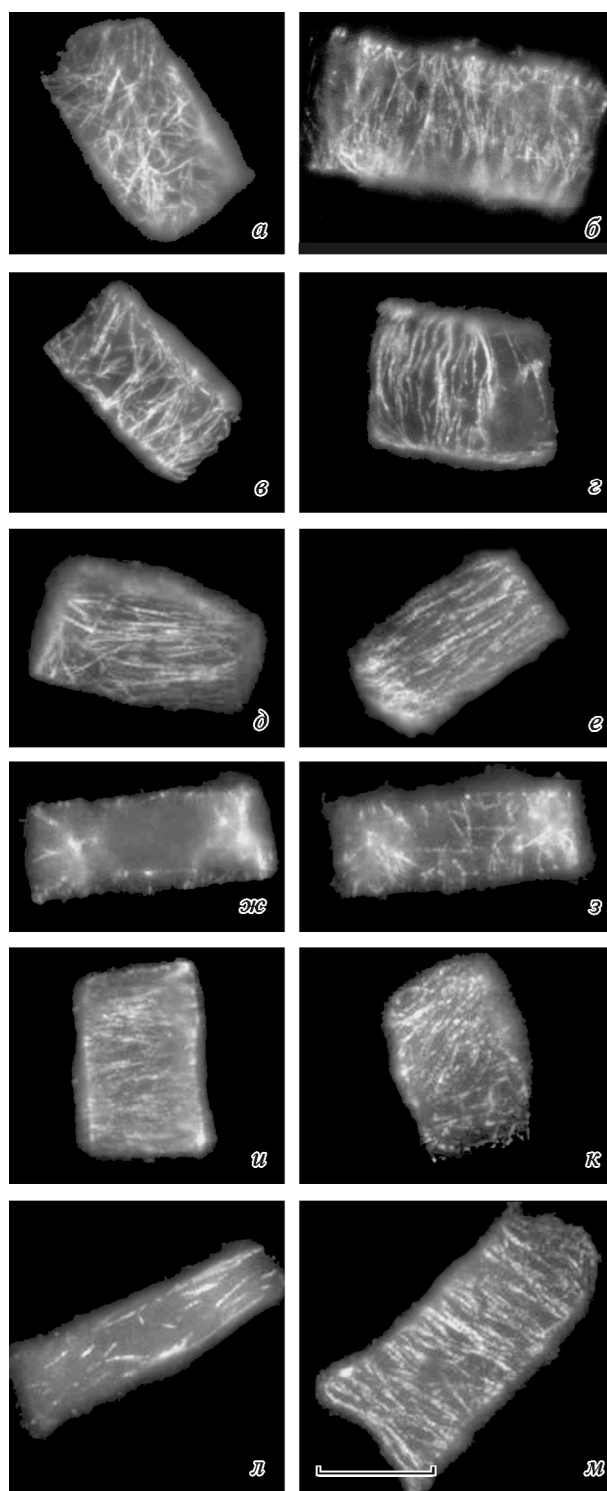


Рис. 5. Иммуноцитохимическое окрашивание с помощью антител к тубулину клеток корня проростков люцерны *Medicago sativa* L. после акклимации к NaCl.

a—e — тубулиновый цитоскелет после 4 сут акклимации к 2 атм (*a—г*), 4 атм (*д*) и 6 атм (*е*): показаны разные варианты изменения организации кортикальных пучков — хаотизация сети (*a*), неоднородные по плотности пучки (*б*), центры конвергенции микротрубочек (*в*), прореживание кортикальной сети (*г, д*), плотные пучки (*г—е*). *ж, з* — тубулиновый цитоскелет после 8 сут акклимации к 4 атм, одна и та же клетка в разных фокальных плоскостях, видны центры конвергенции микротрубочек. *и—м* — тубулиновый цитоскелет после 8 сут акклимации к 6 атм, показаны клетки с прореженными (*и*), переплетающимися (*к*), утолщенными и прореженными (*л*) и неоднородными и фрагментированными (*м*) пучками. Масштабный отрезок — 10 мкм.

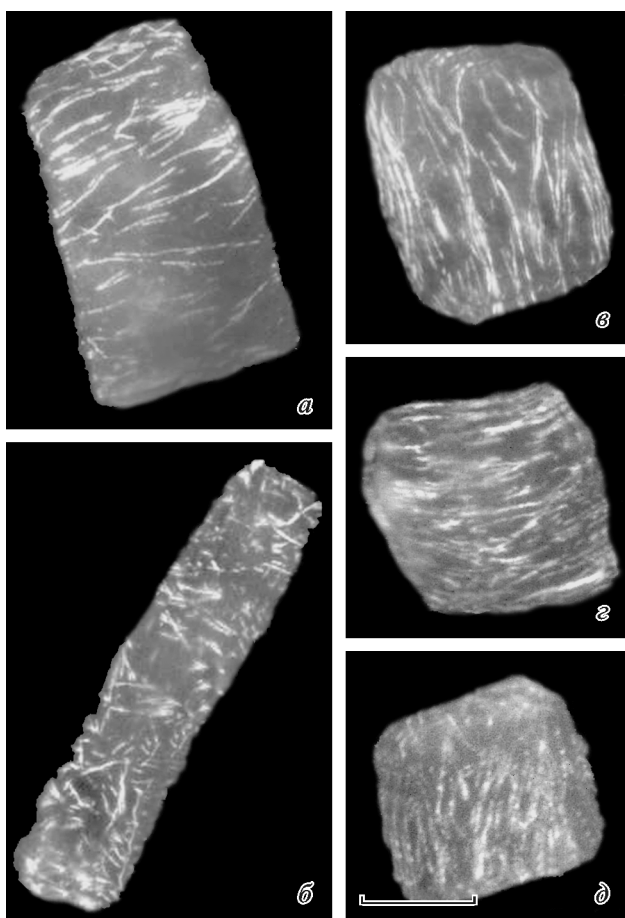


Рис. 6. Иммуноцитохимическое окрашивание с помощью антител к тубулину клеток корня проростков люцерны *Medicago sativa* L. после 4 сут акклимации к Na_2SO_4 .

a—e — тубулиновый цитоскелет после акклимации к 4 атм: *a* — клетка с плотными и редкими пучками и центром конвергенции из длинных микротрубочек; *b* — клетка с короткими пучками, образующими центры конвергенции микротрубочек; *в* — клетка с неоднородными по плотности пучками, формирующими рыхлую сеть. *з, д* — акклимация к 6 атм, показаны клетки с хаотической сетью и фрагментированными пучками. Масштабный отрезок — 10 мкм.

Сульфат натрия, акклимация в течение 4 сут. После акклимации проростков к 87.2 мМ Na_2SO_4 (4 атм) выявляли клетки с редкими и плотными кортикальными пучками, которые могут быть фрагментированными, формировать центры конвергенции из длинных (рис. 6, *a*) или коротких (рис. 6, *б*) микротрубочек, клетки с пучками неоднородной плотности, формирующими рыхлую сеть (рис. 6, *в*). При акклимации к 131.7 мМ Na_2SO_4 (6 атм) в клетках в основном присутствуют хаотически расположенные, неоднородные по плотности и фрагментированные кортикальные пучки (рис. 6, *з, д*).

Сульфат натрия, акклимация в течение 8 сут. После акклимации к 44.4 мМ Na_2SO_4 (2 атм) в клетках выявляли небольшое по сравнению с контролем число коротких и неупорядоченно расположенных кортикальных пучков (рис. 7, *a*). При акклимации проростков к 87.2 мМ Na_2SO_4 (4 атм) в корнях присутствуют клетки с пучками микротрубочек, формирующими центры конвергенции на периферии клеток (рис. 7, *б*) или по всей цитоплазме (рис. 7, *в—д*). Также выявляли клетки с фрагментированными пучками, которые формируют прореженную и неупорядоченную сеть (рис. 7, *е*). Акклимация

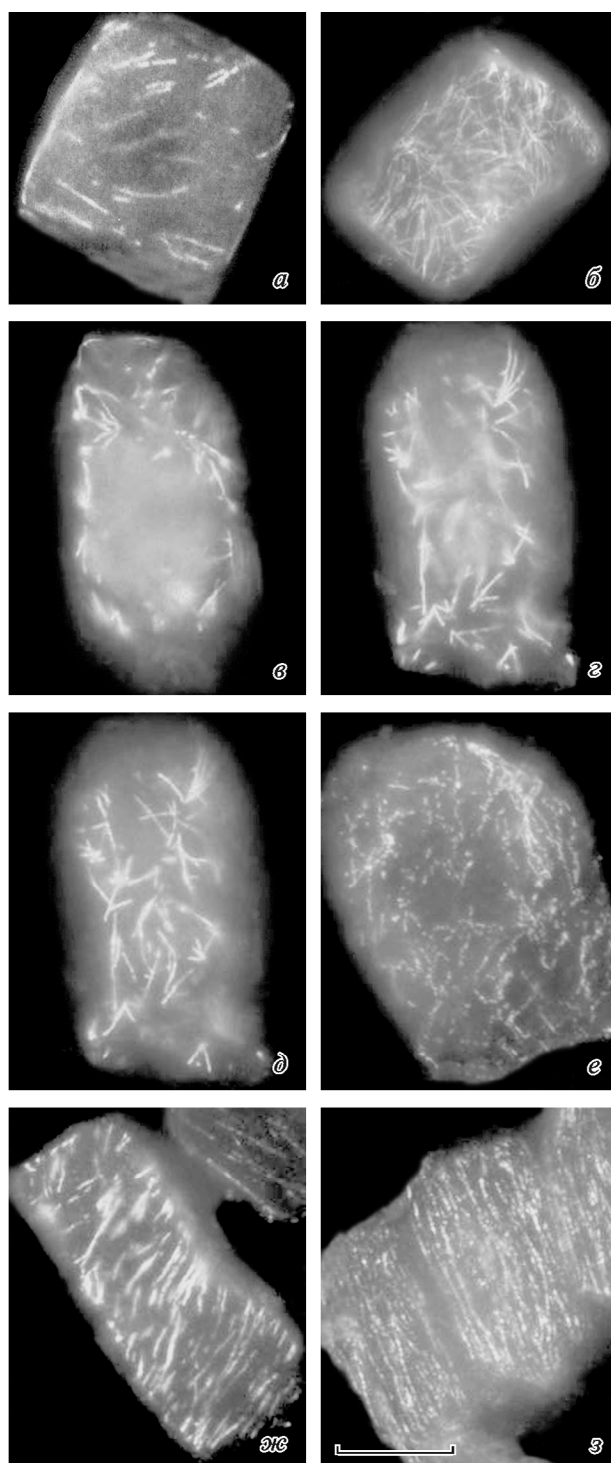


Рис. 7. Иммуноцитохимическое окрашивание с помощью антител к тубулину клеток корня проростков люцерны *Medicago sativa* L. после 8 сут акклимации к Na_2SO_4 .

a — акклимация к 2 атм, показана клетка с редкими и неупорядоченно расположенными кортикальными пучками. *б—е* — акклимация к 4 атм: *б* — клетка с переплетающимися пучками в кортикальной цитоплазме; *в—д* — разные фокальные плоскости одной и той же клетки, на которых видно расположение множества центров конвергенции микротрубочек. *ж, з* — акклимация к 6 атм, показаны клетки с плотными и фрагментированными пучками. Масштабный отрезок — 10 мкм.

к 131.7 мМ Na_2SO_4 (6 атм) сопровождается формированием более крупных и плотных фрагментированных пучков (рис. 7, *ж, з*), которые часто расположены под углом к

Таблица 2

Основные типы морфологических изменений систем микротрубочек после акклимации проростков к действию солей и маннита Д

Изменения в системах микротрубочек	Маннит Д				NaCl				Na ₂ SO ₄			
	Осмотическое давление, атм											
Уменьшение числа пучков	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Изменение толщины пучков	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Нарушение латеральной ассоциации МТ в пучке	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+
Перепутанные тонкие пучки	+	+	+	-								
Перепутанные толстые (плотные) пучки	+	-	+	-	+	-	-	-				
Неодинаковая плотность участков в составе пучков	+	-	+	+	+	-	-	-				
Фрагментация пучков на протяженные участки	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+
Фрагментация пучков на точечные участки					-	-	+	+	-	-	+	+
Изменение ориентации пучков	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+
Формирование ЦКМТ из тонких пучков					+	-	-	-	+	-	-	-
Формирование ЦКМТ из толстых пучков					+	-	-	-	-	-	+	-

Примечание. «+» — наличие соответствующих изменений в системе микротрубочек, «-» — отсутствие изменений; пустые ячейки указывают на отсутствие указанных изменений при любых концентрациях реагентов.

длинной оси клетки (рис. 7, ж). При акклимации проростков к 176.1 мМ Na₂SO₄ (8 атм) наблюдали изменения тубулинового цитоскелета, сходные с теми, которые показаны на рис. 7, ж, з.

Классификация изменений структуры системы кортикальных микротрубочек, формирующихся в ходе акклимации к действию солей и осмотику, приведена в табл. 2.

При акклимации проростков к действию различных концентраций Na₂SO₄ выявляли клетки, содержащие короткие и плотные кортикальные пучки микротрубочек. Как известно, увеличение плотности пучков может быть связано с формированием атипичных тубулиновых полимеров — тубулиновых паракристаллов, которые выявляются с помощью антител к тубулину, но по ультраструктуре отличаются от микротрубочек (Livanos et al., 2014). Поэтому мы провели анализ ультраструктуры клеток с реорганизованной системой тубулинового цитоскелета после действия Na₂SO₄.

Электронная микроскопия, акклимация к 87.2 мМ Na₂SO₄ (4 атм). Анализ ультраструктуры клеток после 4 сут акклимации показал, что вблизи клеточной стенки присутствуют многочисленные кортикальные микротрубочки, расположенные как перпендикулярно клеточной стенке (рис. 8, а), так и хаотически, при этом микротрубочки ориентированы под углом или параллельно клеточной стенке (рис. 8, б). Кроме этого, в цитоплазме обнаружены структуры, сформированные несколькими микротрубочками, сходящимися в общую зону (рис. 8, в, стрелки), которые, по всей видимости, представляют собой центры конвергенции микротрубочек, описанные нами ранее с помощью световой микроскопии. Таким образом, при действии соли сохраняется структура микротрубочек, однако наблюдаются признаки реорганизации их сети, выявляемые на светооптическом уровне.

Обсуждение

Осмотический и солевой стрессы сопровождаются возрастанием концентраций ионов в клетках развивающихся проростков, что может вызвать изменение кон-

формации различных биополимеров, привести к необратимым повреждениям клеток и гибели всего растения. Чтобы показать, что вышеописанные изменения системы микротрубочек, выявленные в клетках корня в условиях акклимации к солям и манниту Д, не приводят к гибели растений, проростки на 8-е сут высаживали в грунт и наблюдали за их развитием в течение 3 нед. Наблюдения показали, что развивающиеся растения по морфофункциональным параметрам (размер и число листьев) не отличались от контрольных образцов. Эти данные свидетельствуют о том, что перестройка сети микротрубочек в ходе продолжительной акклимации растений к солевому и осмотическому стрессам не является необратимым повреждением.

Мы провели иммуноцитохимическое выявление систем микротрубочек интерфазных клеток, выделенных из зоны деления и зоны растяжения корня, в условиях акклимации проростков *Medicago sativa* к действию осмотика маннита и солей — хлорида и сульфата натрия. Полученные результаты подтверждают данные ранних работ, в которых показано, что при действии солевого стресса (хлорид натрия) кортикальные пучки микротрубочек в клетках растений теряют упорядоченное расположение и (или) переориентируются в цитоплазме клетки (Blancaflor, Hasenstein, 1995; Dhonukshe et al., 2003).

Следует отметить, что данные о структуре сети микротрубочек клеток, прошедших акклимацию к действию сульфата натрия, полученные с помощью электронной микроскопии, подтверждают присутствие в клетках именно микротрубочек, однако мы не можем исключить, что в клетках присутствуют и другие тубулиновые полимеры, выявляемые при действии стрессовых воздействий в клетках растений.

Мы выявили несколько морфологических типов тубулинового цитоскелета, сформированных в ходе акклимации к солевому и осмотическому стрессам.

1. Клетки с прореженными по сравнению с контролем, но плотными пучками микротрубочек. Мы показали, что уменьшение числа пучков микротрубочек зависит как от концентрации, так и от продолжительности действия реагентов. Увеличение плотности пучков и уменьшение их числа могут отражать изменение состояния тубу-

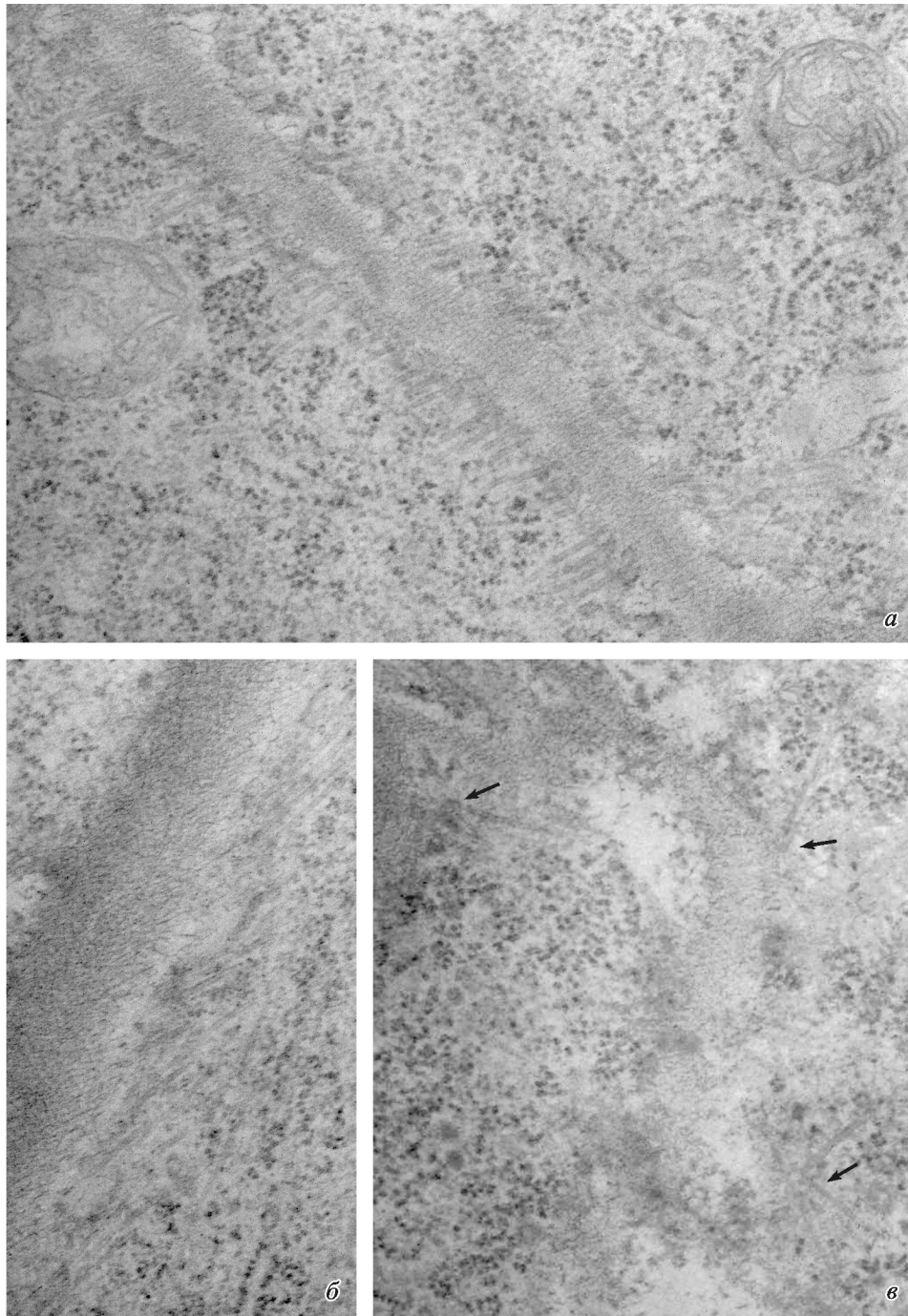


Рис. 8. Ультраструктура клеток корня *Medicago sativa* L. после 4 сут акклимации к 4 атм Na_2SO_4 .

a — упорядоченное расположение микротрубочек в кортикальных областях соседних клеток корня проростка; *б* — хаотическое расположение микротрубочек как вдоль, так и под углом к клеточной стенке; *в* — центры конвергенции микротрубочек в двух соседних клетках корня (стрелки). Увел. 20 000 \times .

линового цитоскелета. Возможно, некоторые плотные пучки сформированы не микротрубочками, а атипичными тубулиновыми полимерами — паракристаллами или макротрубочками (Livanos et al., 2014). Так, например, тубулиновые макротрубочки в клетках пшеницы *Triticum turgidum* были выявлены после действия маннита Д (Komis et al., 2002). Для доказательства этого предположения требуется дополнительное изучение ультраструктуры клеток после акклимации в присутствии маннита Д, хлорида и сульфата натрия. Причинами прореживания сети микротрубочек может быть разборка микротрубочек. Не-

которые авторы высказывают предположение (Livanos et al., 2014), что АФК прямо или косвенно влияют на полимеризацию тубулина, например изменяя концентрацию кальция или доступность свободных гетеродимеров тубулина. Разборка микротрубочек может активироваться за счет ослабления связывания с MAP65. Так, например, фосфорилирование MAP65-1 (который способствует образованию пучков микротрубочек) ведет к его диссоциации от микротрубочек и способствует их разборке, а сам MAP65-1 является субстратом для ряда АФК-активируемых MAPK (Smertenko et al., 2006). Следует отметить,

что MAP65-1 и MAP65-6 способствуют организации устойчивых толстых пучков микротрубочек во время солевого стресса, которые выглядят как перепутанная сеть (Mao et al., 2005).

2. Клетки, в которых кортикальные пучки микротрубочек расположены диагонально по отношению к продольным осям. Переориентация пучков особенно выражена в клетках после акклимации к манниту Д в концентрациях 250 (6 атм) и 333 (8 атм) мМ и к NaCl в концентрации 99 мМ (4 атм), когда мы наблюдаем у проростков правозакрученные корни. Эти изменения сильнее выражены в клетках при акклимации к действию хлорида натрия и маннита. Изменение положения кортикальных пучков может быть результатом замедления или остановки пролиферации клеток корня растения в ответ на стресс (Hashimoto, Kato, 2006) или происходить при дисбалансе ионов натрия, что показано для клеток *A. thaliana* (Shoji et al., 2006; Wang et al., 2007, 2011).

3. Клетки, у которых нарушены латеральные связи между микротрубочками в составе пучков. Изменения структуры пучков часто встречаются в клетках при действии маннита и хлористого натрия. Возможно, в условиях стресса такая структура пучков является результатом нарушения связи микротрубочек с белками MAP65-1, 4, 5 и 8, которые в норме формируют кортикальные пучки (Zhang et al., 2012). Белкам семейства MAP65 приписывают важную роль в регуляции динамики и организации микротрубочек у растений. Активатором MAP65 также является фосфатидная кислота: во время солевого стресса фосфатидная кислота связывается с MAP65 и усиливает полимеризацию тубулина и способность MAP65 вызывать образование пучков микротрубочек (Zhang et al., 2012).

4. Клетки, у которых в кортикальной цитоплазме и около ядра выявляются центры конвергенции микротрубочек. Присутствие таких структур описывали ранее в клетках растений после действия агентов, вызывающих деполимеризацию микротрубочек (Cleary, Hardham, 1988), а также наблюдали в выделенных клетках эндосперма *Scadoxus* in vitro (Smirnova, Bajer, 1994). Центры конвергенции микротрубочек мы наблюдали при действии низкой температуры (0 °C) на проростки пшеницы (Лазарева и др., 2008). Возможно, эти структуры являются новыми сайтами нуклеации и роста микротрубочек в клетках при действии стрессов.

5. Клетки с кортикальными пучками, сформированными чередующимися плотными и рыхлыми участками, выявлены нами при акклимации к действию хлорида натрия и маннита. Такая структура пучков, возможно, формируется в результате акклимации клетки к стрессу или является начальным этапом изменения пучков перед их фрагментацией.

6. Клетки корня с фрагментированными кортикальными пучками микротрубочек. Фрагментация пучков микротрубочек может быть результатом повышения уровня АФК в клетке, что подтверждено in vitro на клетках *Arabidopsis* (Xu et al., 2006). Возможно, фрагментация микротрубочек связана с активацией белка катанина, разрезающего микротрубочки. Показано, что у растений катанин привлекается при ответе цитоскелета на различные виды стрессов через АФК-опосредованные сигнальные каскады (Landrein, Namant, 2013; Lindeboom et al., 2013). Однако нельзя исключить и другие механизмы, ведущие к появлению неоднородных по плотности или фрагментированных пучков, в том числе стабилизация (дестаби-

лизация) микротрубочек при абиотических стрессах (Eleftheriou et al., 2013), включение в состав микротрубочек посттрансляционно модифицированных форм тубулинов (Cai, 2010).

Обобщая полученные данные, можно заключить, что прореживание сети и утолщение пучков происходят при всех типах стрессов — осмотическом и солевом. Хаотическая ориентация как тонких, так и утолщенных пучков, наблюдается при действии осмотика, но не при действии солей. Фрагментация пучков, наоборот, происходит при действии солей и проявляется только при высокой концентрации осмотика. Формирование центров конвергенции микротрубочек чаще встречается в клетках при длительном действии сульфата натрия, реже хлорида натрия и не наблюдается при действии маннита Д.

Полученные данные показывают, что в отличие от клеток *Arabidopsis* в клетках корня люцерны при солевом и осмотическом стрессах сеть кортикальных микротрубочек перестраивается. Эта реорганизация происходит не только в ответ на действие ионов, как показано другими авторами (Wang et al., 2007), но и при изменении осмотического давления. Следовательно, запускать сигнальные пути и молекулярные механизмы, приводящие к реорганизации системы микротрубочек, могут не только катионы натрия, как показано ранее (Wang et al., 2007), но и анионы хлора и сульфата. Наши исследования показали, что для осмотического и солевого стрессов существуют разные механизмы воздействия на систему микротрубочек, при этом реорганизация микротрубочек в ответ на стресс зависит от катионов и анионов, которые в составе соли могут оказывать взаимно дополняющий (аддитивный) эффект.

Список литературы

- Лазарева Е. М., Ченцов Ю. С., Смирнова Е. А. 2008. Влияние низкой температуры на системы микротрубочек в клетках корневой меристемы ярового и озимого сортов пшеницы *Triticum aestivum* L. Цитология. 50 (7) : 597—612. (Lazareva E., Chentsov Y., Smirnova E. 2008. The effect of low temperature on the microtubules in root meristem cells of spring and winter cultivars of wheat *Triticum aestivum* L. Cell Tissue Biol. 2 (4) : 436—450.)
- Barlow P., Baluska F. 2000. Cytoskeletal perspectives on root growth and morphogenesis. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 51 : 289—322.
- Blancaflor E. B., Hasenstein K. H. 1995. Growth and microtubule orientation of *Zea mays* zoots subjected to osmotic stress. Int. J. Plant Sci. 156 : 774—783.
- Cai G. 2010. Assembly and disassembly of plant microtubules: tubulin modifications and binding to MAPs. J. Exp. Bot. 61 : 623—626.
- Cleary A. L., Hardham A. R. 1988. Depolymerization of microtubule arrays in root tips by oryzalin and their recovery with modified nucleation attern. Can. J. Bot. 66 : 2353—2366.
- Dhonukshe P., Laxalt A. M., Goethart J., Gadella T. W. J., Munnik T. 2003. Phospholipase D activation correlates with microtubule reorganization in living plant cell. Plant Cell. 15 : 2666—2669.
- Dinneny J. R., Long T. A., Wang J. Y., Jung J. W., Mace D., Pointer S., Barron C., Brady S. M., Schiefelbein J., Benfey P. N. 2008. Cell identity mediates the response of *Arabidopsis* roots to abiotic stress. Sci. Signaling. 320 : 942.
- Eleftheriou E. P., Adamakis I.-D. S., Fatsiou M., Panteris E. 2013. Hexavalent chromium disrupts mitosis by stabilizing microtubules in *Lens culinaris* root tip cells. Physiol. Plant. 147 : 169—180.

- Hashimoto T., Kato T. 2006. Cortical control of plant microtubules. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9 : 5—11.
- Ji H., Pardo J. M., Batelli G., Van Oosten M. J., Bressan R. A., Li X. 2013. The Salt Overly Sensitive (SOS) pathway: established and emerging roles. *Mol. Plant.* 6 : 275—286.
- Julkowska M., Testerink C. 2015. Turning plant signaling and growth to survive salt. *Trends Plant Sci.* 20 : 586—594.
- Komis G., Apostolagos P., Galatis B. 2002. Hyperosmotic stress induces formation of tubulin microtubules in root-tip cells of *Triticum turgidum*: their probable involvement in protoplast volume control. *Plant Cell Physiol.* 8 : 911—922.
- Landrein B., Hamant O. 2013. How mechanical stress controls microtubule behavior and morphogenesis in plants: history, experiments and revisited theories. *Plant J.* 75 : 324—338.
- Lindeboom J. J., Nakamura M., Hibbel A., Shundyak K., Gutierrez R., Ketelaar T., Emons A. M., Mulder B. M., Kirik V., Ehrhardt D. W. 2013. A mechanism for reorientation of cortical microtubule arrays driven by microtubule severing. *Science.* 342 : 1245533.
- Livanos P., Galatis B., Apostolagos P. 2014. The interplay between ROS and tubulin cytoskeleton in plants. *Plant Signal. Behav.* 9 : e28069—e28069-5.
- Mao T., Jin L., Li H., Liu B., Yuan M. 2005. Two microtubule-associated proteins of the *Arabidopsis* MAP65 family function differently on microtubules. *Plant Physiol.* 138 : 654—662.
- Munns R., Tester M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59 : 651—681.
- Shi H., Quintero F. J., Pardo J. M., Zhu J. K. 2002. The putative plasmamembrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 controls longdistance Na⁺ transport in plants. *Plant Cell.* 14 : 465—477.
- Shoji T., Susuki K., Abe T., Kaneko Y., Shi H., Zhu J. et al. 2006. Salt stress affects cortical microtubule organization and helical growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 47 : 1158—1168.
- Smertenko A. P., Chang H.-Y., Sonobe S., Fenyk S. I., Weingartner M., Bogre L., Hussey P. J. 2006. Control of the AtMAP65-1 interaction with microtubules through the cell cycle. *J. Cell Sci.* 119 : 3227—3237.
- Smirnova E., Bajer A. 1994. Microtubule converging centers and reorganization of the interphase cytoskeleton and the mitotic spindle in higher plant *Haemanthus*. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 27 : 219—233.
- Tester M., Davenport R. 2003. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Ann. Bot.* 91 : 503—527.
- Wang C., Li J., Yuan M. 2007. Salt tolerance requires cortical microtubule reorganization in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 48 : 1534—1547.
- Wang C., Zhang L. J., Huang R. D. 2011. Cytoskeleton and plant salt stress tolerance. *Plant Signal Behav.* 6 : 29—31.
- Xu C., Liu C., Guo H., Li Z., Jiang D., Jian M. 2006. Photosensitive breakage of fluorescence-labeled microtubules and its mechanism. *Acta Physica Sinica.* 55 : 206—210.
- Yuzyuk T., Foehr M., Amberg D. C. 2002. The MEK kinase Ssk2p promotes actin cytoskeleton recovery after osmotic stress. *Mol. Biol. Cell.* 13 : 2869—2880.
- Zhang Q., Lin F., Mao T., Nie J., Yan M., Yuan M., Zhang W. 2012. Phosphatidic acid regulates microtubule organization by interacting with MAP65-1 in response to salt stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 24 : 4555—4576.

Поступила 4 V 2016

REORGANIZATION OF INTERPHASE MICROTUBULES IN ROOT CELLS OF *MEDICAGO SATIVA* L.
DURING ACCLIMATION TO OSMOTIC AND SALT STRESS CONDITION

E. M. Lazareva,^{1,2,*} E. N. Baranova,² E. A. Smirnova^{1,2}

¹ Biology Faculty M. V. Lomonosov Moscow State University, Department of Cell Biology and Histology,
Moscow, 119234,

and ² All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, 127550,

* e-mail: lazareva-e@yandex.ru

We have investigated the organization of microtubule system in interphase cells of *Medicago sativa* L. roots during acclimation to salt and osmotic stress at different concentrations of NaCl, Na₂SO₄ and mannitol. We have identified several morphological changes in tubulin cytoskeleton that appear during the acclimation to salt and osmotic stress in the cells of different root tissues: 1) decreased density of cortical microtubule network, 2) random orientation of cortical microtubule bundles, 3) non-uniform density of the bundles, 4) thickening of the bundles, 5) fragmentation of the bundles, 6) formation of centers of converging microtubule. Reduced density of the microtubule network and thickening of the bundles was detected during osmotic and salt stress, yet random orientation of cortical microtubules was observed under osmotic stress and not found during salt stress. Fragmentation of microtubule bundles was apparent during salt stress and less evident at high concentration of mannitol. Formation of centers of converging microtubule was common under prolonged action of sodium sulfate, less common under sodium chloride and not found after mannitol treatment. Our data show that cortical microtubules in alfalfa root cells rearrange not only in response to different ions, but also to osmotic pressure. Thus, the signaling pathways and molecular mechanisms inducing reorganization of the microtubule system may be triggered not only by sodium cations but also by sulfate and chloride anion at the concentrations that do not cause irreversible cell damage. Our study show that the osmotic and salt stress differently affect the cortical microtubules, and their reorganization in response to stress depends on the salt cations as well as anions might also show additional effect under salt stress.

Key words: *Medicago sativa*, microtubules, tubulin, acclimation, salt stress, osmotic stress.