

УДК 581.1

РЕОРГАНИЗАЦИЯ ЦИТОСКЕЛЕТА ПРИ ДЕЙСТВИИ НА РАСТЕНИЯ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР

Л.П. Хохлова, М.В. Макарова

Аннотация

В обзоре впервые проведён анализ литературных данных и результатов собственных исследований авторов о многостороннем влиянии низких температур на основные компоненты цитоскелета растительных клеток – микротрубочки (МТ) и микрофиламенты (МФ). Детально рассматриваются имеющиеся сведения о физико-химической реорганизации цитоскелетной сети и изменении основных свойств МТ и МФ при действии на растения разных температурных режимов. Особое внимание уделяется механизмам холодостойкости цитоскелетных структур и молекулярно-генетическим основам их изменчивости. Впервые обосновывается представление о динамической нестабильности тубулинового и актинового цитоскелета как триггера температурного и гормонального сигналов при адаптации растений к низким температурам.

Введение

Исследование свойств и функций цитоскелета, являющегося важнейшей полифункциональной надмолекулярной системой, относится к перспективным направлениям клеточной физиологии. Неослабевающий интерес к цитоскелету связан с вскрываемым огромным его значением в жизнедеятельности организма [1] и способствует глубокому пониманию закономерностей пространственно-временной организации клеточного метаболизма и сохранения структурной целостности клеток. Чрезвычайно разветвленная сеть цитоскелета в виде тубулиновых микротрубочек (МТ) и актиновых микрофиламентов (МФ) играет ключевую роль в процессах роста и морфогенеза клеток, тканей и органов растений, определяя субклеточную организацию, деление, полярность, дифференцировку клеток и влияя на движение органелл, внутри- и межклеточный транспорт веществ, процессы эндо- и экзоцитоза [1–5]. Показана высокая динамичность и чувствительность цитоскелета растений к абиотическим и биотическим факторам внешней среды, в том числе и к низким температурам, изменяющим полимерное состояние МТ и МФ, состав изотипов, ориентацию, локализацию и взаимодействия с различными клеточными структурами [6–9]. Большое число генов тубулиновых и актиновых белков в клетках растений рассматривается как необходимое условие для адаптации растений к внешним условиям [10].

В последнее время все больше признается участие цитоскелета в различных сигнальных системах растительных клеток и экспрессии генов [11–17]. Получает экспериментальное подтверждение точка зрения о том, что цитоскелет можно считать одним из главных претендентов на роль триггера метаболит-

ческой адаптации, участвующего в восприятии и трансдукции внешних сигналов как внутри клеток, так и между ними [9, 14, 18, 19].

В настоящее время, благодаря широкому применению иммунохимических и микроскопических методов, многое известно о локализации белков цитоскелета в растительных клетках, их химическом и структурном состояниях, механизмах сборки и разборки элементов цитоскелета, ассоциированных с ними белках, и генах, кодирующих тубулиновые и актиновые белки [1, 9, 20, 21].

Наряду с впечатляющими достижениями в области молекулярной биологии цитоскелета, о его физиологической роли и, в частности, о механизмах вовлечения компонентов цитоскелета в адекватные ответы растительных клеток на низкие температуры имеется крайне ограниченная информация. Известно, что охлаждение и замораживание многих видов растений вызывают деполимеризацию МТ [22] и нередко их полную деструкцию, вплоть до деградации тубулиновых белков с одновременным повреждением растений от холодового стресса [23, 24]. Предполагается также, что стабильность МТ связана с холодостойкостью многих видов растений [6, 25], но существует и другое мнение [26]. Сведения о влиянии низкотемпературного закаливания растений на филаменты цитоскелета являются немногочисленными и противоречивыми [27, 28]. Из-за отсутствия системных знаний остается нерешенным вопрос об участии цитоскелета в адаптивных изменениях физиологических процессов при развитии морозостойкости растений. Проведение такого рода цитофизиологических исследований необходимо для расшифровки первичных индуцибельных механизмов термоустойчивости и разработки новых генно-инженерных подходов к повышению адаптивного потенциала и экологической пластичности растений.

1. Влияние низких температур на физико-химическую организацию и свойства основных цитоскелетных структур – МТ и МФ

Цитоскелетным структурам отводится значительное место в ответах клеток на различные воздействия внешней и внутренней среды [9, 22, 29–31]. Так, развитие неспецифического адаптационного синдрома клеточной системы – состояния, возникающего при различных альтерирующих воздействиях, в том числе и при низкой температуре, – А.Д. Браун и Т.Б. Моженок [29] связывают с коллоидными реакциями, среди которых преобладающей является полимеризация актина, влияющая на вязкость, желатинизацию и коагуляцию цитоплазмы.

В подавляющем большинстве работ, в которых исследовали влияние низких температур на цитоскелет, в основном наиболее полно изучены МТ. Известно, что МТ находятся в клетках в динамическом равновесии между растворимыми субъединицами тубулина и полимерными тубулиновыми филаментами [1, 32, 33]. Низкая температура сдвигает это равновесие в сторону деполимеризации МТ [32]. Деполимеризующее действие низких температур на МТ сопровождается их разборкой, что установлено как для водорослей, так и для многих видов высших растений, включая рожь [27], шпинат [22], морковь [24], кукурузу [26, 34], табак [21], озимую пшеницу [35] и др. Восприимчивость МТ к низким температурам и их холодовая стабильность неодинакова у разных видов растений. Показано, например, что в клетках кончиков корней *Azalla* деполимеризация МТ происходила через 15 мин. при 0°C [36], в клетках семядо-

лей томата – через 8 ч при 5°C [37], в семядолях хлопчатника – через 3 дня при 4°C [23], однако в клетках кончиков корней ржи МТ сохраняли полные сообщества через 2 дня при 4°C [38].

С точки зрения влияния низких температур на прохождение клеточного цикла определенный интерес вызывает тот факт, что холодовая обработка вызывает усиление синхронизации культивируемых клеток, например моркови, на ранней стационарной фазе, при этом замедляется рост и переход клеток от стадии G к S и от G к митозу [24]. Более того, на ранних стадиях клеточного цикла устойчивость к охлаждению у МТ разная: выше – у МТ митотического веретена и фрагмопласта, ниже – у кортикальных тубулиновых структур интерфазных клеток [39]. Имеют место и возрастные изменения холодовой стабильности МТ. Более молодые ткани обычно содержат более чувствительные к низким температурам МТ и наоборот [39]. Так, на корнях кукурузы было показано, что МТ закончивших растяжение клеток были наименее чувствительны к раннему периоду холодовой обработки (6–24 ч), но на более поздних стадиях (5–7 сут.) деполимеризовались. В то время как МТ корневого чехлика, периферии, покоящегося центра и клеток дистальной части корня, предшествующей меристеме, были более устойчивы к длительному периоду охлаждения за счет реполимеризации на более ранних этапах [34].

Существует не только видовая, органная и тканевая разнокачественность МТ по способности деполимеризоваться при низких температурах [25, 28, 34], но даже в пределах одной и той же клетки эта способность у разных МТ выражена неодинаково [27, 40]. Например, кортикальные МТ являются более холодоустойчивыми в отличие от цитоплазматических [34, 41]. Различия в холодовой стабильности МТ в пределах одной клетки можно объяснить, по-видимому, существованием разных механизмов деполимеризации. Например, прямым следствием деполимеризации МТ может быть сама низкая температура [42]. В то же время низкая температура может быть причиной других цитоплазматических изменений, которые могут дестабилизировать МТ, таких как дегидратация [43], нарушение связей с плазматической мембраной [44], переохлаждение [22] и увеличение концентрации свободного кальция в цитоплазме [45, 46].

Существует предположение о том, что увеличение содержания в цитоплазме свободного Ca^{2+} является непосредственной причиной разборки МТ под влиянием низких температур [47–49]. При этом в условиях охлаждения источником кальция могут быть эндоплазматический ретикулум, вакуоли и митохондрии [22]. МТ очень чувствительны даже к микромолярным концентрациям этого иона. Их полимерное и структурное состояния, разборка и сборка, фрагментация, связывание в пучки, взаимодействия с мембранами, органеллами и другими структурами полностью регулируются ионами Ca^{2+} в комплексе с кальмодулином [50]. Эта регуляция может осуществляться посредством изменения активности и конформации ассоциированных с МТ белков путем их фосфорилирования – дефосфорилирования. Причиной изменения концентрации Ca^{2+} в цитозоле могут стать также процессы дегидратации клеток при охлаждении. Так, Bartolo и Carter [22] наблюдали дестабилизацию МТ при обезвоживании клеток. Известно, что эффекты низкой температуры и дегидратации на статус МТ являются резко аддитивными, но не полностью тождественными.

Pihakaski-Maunsbach и Puhakainen [28] показали, что МТ в закаленных к холоду листьях озимой ржи повреждались больше при замораживании растений, чем при их дегидратации по силе, соответствующей этому замораживанию. В связи с этим предположили о существовании различных механизмов изменения структуры МТ, индуцируемых этими двумя факторами.

В последнее время большое внимание уделяется участию в регуляции динамического состояния цитоскелетных структур процессов фосфорилирования – дефосфорилирования связанных с ними белков [51]. Так, ингибиторы белковых киназ повышают стабильность МТ суспензионных клеток табака к холоду [39]. По мнению автора, баланс между фосфорилированием и дефосфорилированием белков, взаимодействующих с МТ, зависит в клетках от действия киназ и фосфатаз и является регуляторным механизмом, контролирующим низкотемпературную стабильность МТ. В экспериментах *in vitro* с растительными экстрактами Монгоу с сотр. [52] обнаружили существенное усиление фосфорилирования белка с приблизительной молекулярной массой 58 кДа при снижении температуры реакционной смеси ниже 12°C. Кроме того, в клетках листьев холодочувствительных растений риса также выявлена индукция фосфорилирования белка с М.м. = 60 кДа под влиянием холодового стресса [53].

В работах [54, 55] установлено, что обработка растений озимой пшеницы стрессовым фитогормоном – абсцизовой кислотой (АБК) – вызывала уменьшение в клетках корней содержания цитоскелетных и фосфорилированных белков с М.м. = 60 кДа, способствуя снижению массы МТ и появлению менее разветвленной сети тубулинового цитоскелета. В отличие от АБК, закаливание растений к холоду не изменяло содержание тубулиновых и актиновых белков в клетках растений морозоустойчивых сортов пшеницы, однако сильно увеличивало уровень фосфорилирования белков с М.м. = 60 кДа в тканях маломорозоустойчивого сорта. Заключение, что закаливание к холоду в клетках неустойчивого сорта вызывает нарушение баланса между фосфорилированием и дефосфорилированием белков. Чрезмерное фосфорилирование МТ-ассоциированных белков (гиперфосфорилирование) предотвращает их взаимодействие с МТ [56], что может вызывать прекращение регулирования сборки – разборки МТ-скелета и, тем самым, значительное нарушение субклеточной организации у растений восприимчивых к морозу сортов. Baskin и Wilson [51] также полагают, что фосфорилирование – дефосфорилирование белков является одной либо несколькими ступенями в организации кортикальных построений МТ.

В литературе нет единого мнения о значении процессов стабилизации – дестабилизации МТ при развитии адаптации растений к холоду. Во многих работах отражена мысль о том, что разборка МТ неблагоприятна для развития закаливания к холоду, а возрастание стабильности МТ, наоборот, способствует этому. Rikin с сотр. [23] предположили, что деполимеризация МТ – основная причина гибели растений хлопчатника от низких температур. Jian с сотр. [25] показали, что МТ меньше деполимеризуются под действием низких температур у более холодостойких растений (пшеница), а у теплолюбивых (томаты, огурцы) – больше. Это говорит о том, что более холодостойкие растения обладают более стабильными МТ. В работе Pihakaski-Maunsbach и Puhakainen [28] сообщается о том, что более половины клеток листьев закаленных растений

ржи после замораживания при -10°C сохраняли полимеризованные МТ, тогда как в неадаптированных к холоду клетках тубулиновые структуры полностью деполимеризовались.

В работе [27] не было обнаружено различий по индексу полимеризации у незакаленных и закалённых клеток кончиков корней ржи. Bartolo и Carter [22] наблюдали слабые различия в холодовой стабильности кортикальных МТ в закаленных и незакаленных клетках листьев шпината после их замораживания и через 1 ч после оттаивания. Однако существенные различия проявились спустя 20 ч после оттаивания: МТ в закалённых клетках быстрее реполимеризовались в отличие от незакаленных клеток. В связи с этим авторы предложили использовать статус полимеризации МТ в качестве независимой оценки повреждения растений при замораживании.

Согласно другой точке зрения, разборка МТ – положительное явление при адаптации растений к холоду. Chu с сотр. [26] доказали, что деполимеризация кортикальных МТ не является непосредственным источником повреждения кукурузы низкими температурами. Более того, в работе Кегг и Carter [27] отмечается, что стабилизация МТ таксолом увеличивает степень морозного повреждения клеток кончиков корней ржи. Установив обратную зависимость между морозоустойчивостью растений и стабильностью МТ к холоду, авторы заключили, что некоторая степень деполимеризации МТ необходима для максимального развития низкотемпературной устойчивости растений.

Значительно меньше работ посвящено исследованию ответов на охлаждение других цитоскелетных структур – МФ. Накапливаются данные о большей холодоустойчивости МФ по сравнению с МТ. Необходимо отметить, что у некоторых холодочувствительных растений низкая температура вызывала замедление циклоза в клетках, по-видимому, вследствие разрушения МФ, так как было показано, что такой же эффект у этих растений вызывал деполимеризующий актиновые структуры препарат – цитохалазин Б [45]. Показано, что МФ эпидермальных клеток чешуи лука выдерживали холодовой стресс от 0°C до 4°C в течение часа без изменения своей структуры, а МТ почти полностью деполимеризовались [57]. Aström с сотр. [6], используя специфические антитела к актину и фаллоидин, меченный радиоидом, установили, что МФ в пыльцевых трубках табака оставались полимеризованными после двухчасовой обработки при 4°C , в то время как МТ в этих условиях полностью разрушались. Л.П. Хохловой с сотр. [58] также были получены данные о свойственной МТ более высокой холодолабильности по сравнению с МФ. На это указывает тот факт, что водоудерживающая способность (ВС) замороженных клеток озимой пшеницы под влиянием колхицина, разрушающего МТ, уменьшалась больше, чем под действием цитохалазина Б, вызывающего деструкцию МФ.

В наших работах [19, 35, 59] было проведено иммуноцитохимическое исследование основных физико-химических параметров (содержания, ориентации, структуры и стабильности) тубулинового и актинового цитоскелета. Обнаружено, что закаливание растений к холоду (3°C , 7 сут.) и обработка их экзогенной АБК (30 мкМ, 3 сут.), увеличивая стабильность МТ (способность сохранять своё полимерное состояние после деструкции оризалином), по-разному изменяли структурную организацию тубулиновых и актиновых компонентов

в клетках зоны дифференцировки корней озимой пшеницы. Закаливание растений к холоду, усиливая пространственную агрегацию МТ между собой, приводило к образованию плотной сети тубулинового цитоскелета из толстых пучков МТ, а АБК вызывала уменьшение содержания тубулиновых структур (белков и МТ), появление менее разветвленной сети слабо флуоресцирующих МТ и деполимеризацию МФ (рис. 1, 2). Был сделан вывод о том, что в клетках зоны дифференцировки, более всего ответственной за развитие морозоустойчивости корней, реализация стабилизирующих эффектов закаливания и АБК на цитоскелет осуществляется разными путями.

На основании экспериментальных данных, свидетельствующих о вызываемом АБК снижении массы тубулиновых компонентов (белков и МТ), но повышении их стабильности, а также о деструкции МФ, О.В. Олиневич [60] было выдвинуто представление о том, что в основе действия АБК как индуктора морозоустойчивости растений лежит компенсаторный механизм. Этот механизм может обуславливаться изменением состава популяций МТ в направлении увеличения стабильных, но функционально менее активных их сообществ, что является необходимым условием для замедления процессов роста и водного обмена АБК-обработанных растений. По-видимому, аналогичные изменения цитоскелета и физиологических процессов происходят в клетках также на начальных этапах адаптации растений к действию холода. Ввиду того, что эффекты АБК устранялись низкими температурами, на завершающих этапах холодого закаливания непосредственное отношение к частичному восстановлению ростовых и адаптивных процессов в новых условиях могут иметь место противоположные изменения цитоскелета, а именно, увеличение содержания менее стабильных, высоколабильных МТ и усиление статуса полимеризации МФ. По-видимому, фазное изменение стабильности МТ и усиление актин-микротрубочковых взаимодействий [35], коррелирующее с морозоустойчивостью растений [61], указывают на зависимость процессов низкотемпературной адаптации от стабильности всей цитоскелетной сети.

2. Механизмы холодостабильности МТ и МФ

Усиление структурной стабильности МТ в закаленных клетках может быть связано с появлением новых более холодостойких популяций МТ в результате синтеза *de novo* [40, 62]. В то же время охлаждение растений нередко вызывает селективную деполимеризацию одной части нестабильных МТ, в то время как другая, обычно менее многочисленная, но более стабильная их часть остается в клетках интактной [27, 62]. Эти наблюдения свидетельствуют об изначальном присутствии в клетках растений холодостабильных сообществ МТ.

Одной из первых работ, в которых сообщается о возможности появления в растительных клетках после охлаждения и последующего отогрева новых форм МТ, является работа Hogetsu [40], выполненная на клетках водоросли *Closterium ehrenbergii Meneghini*. После отогрева через 5 мин. в клетках появлялись звездообразные МТ с другой ориентацией и более устойчивые к холоду. После замораживания кончиков корней ржи при -3°C в клетках число МТ уменьшалось, но оставшиеся МТ были короче, чем МТ в незамороженных контрольных

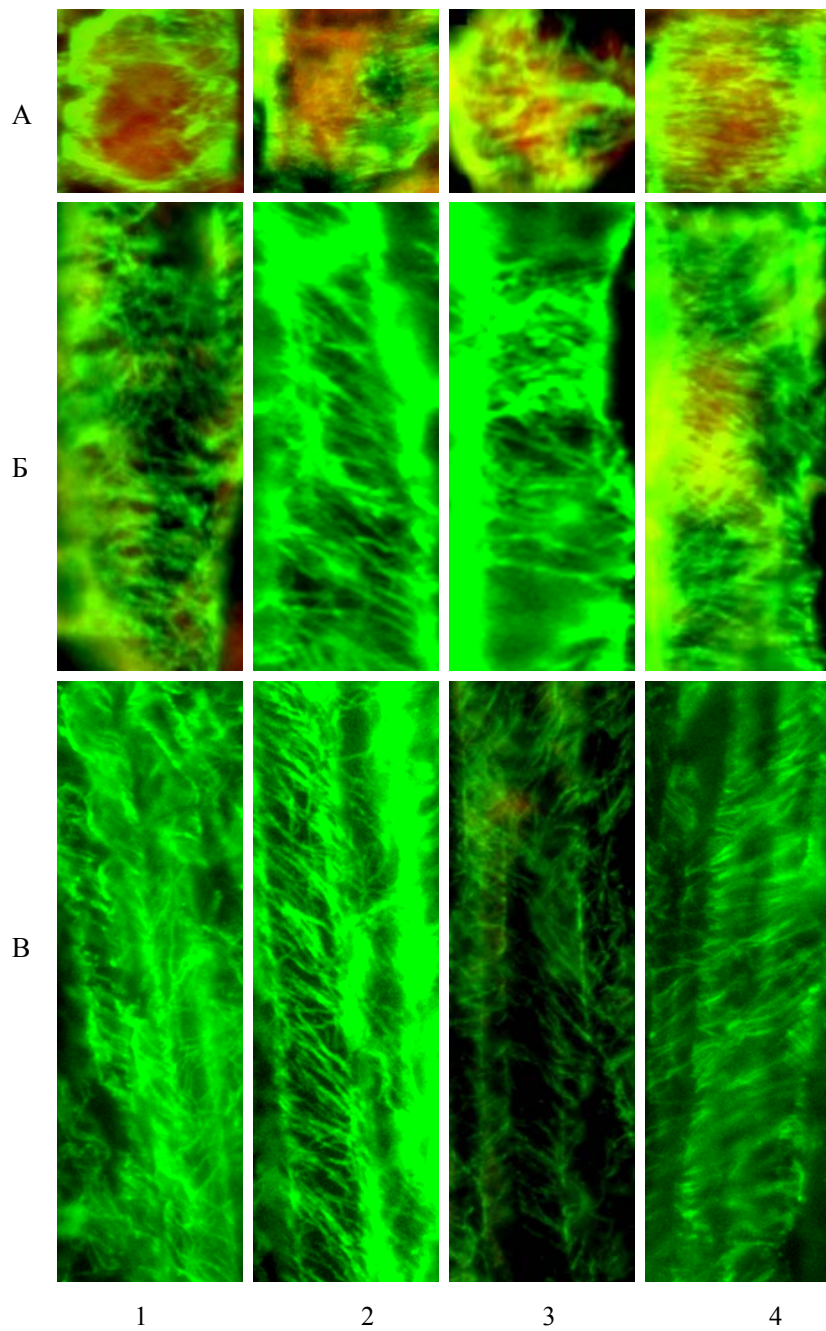


Рис. 1. Иммуноцитохимическая визуализация тубулинового цитоскелета в клетках зон меристемы (А), растяжения (Б) и дифференциации (В) корней Мироновской 808 при закаливании растений к холоду (3°C, 7 сут.) и действию АБК (30 мкМ, 3 сут.): 1 – без закаливания, 2 – закаливание, 3 – АБК без закаливания, 4 – АБК с закаливанием

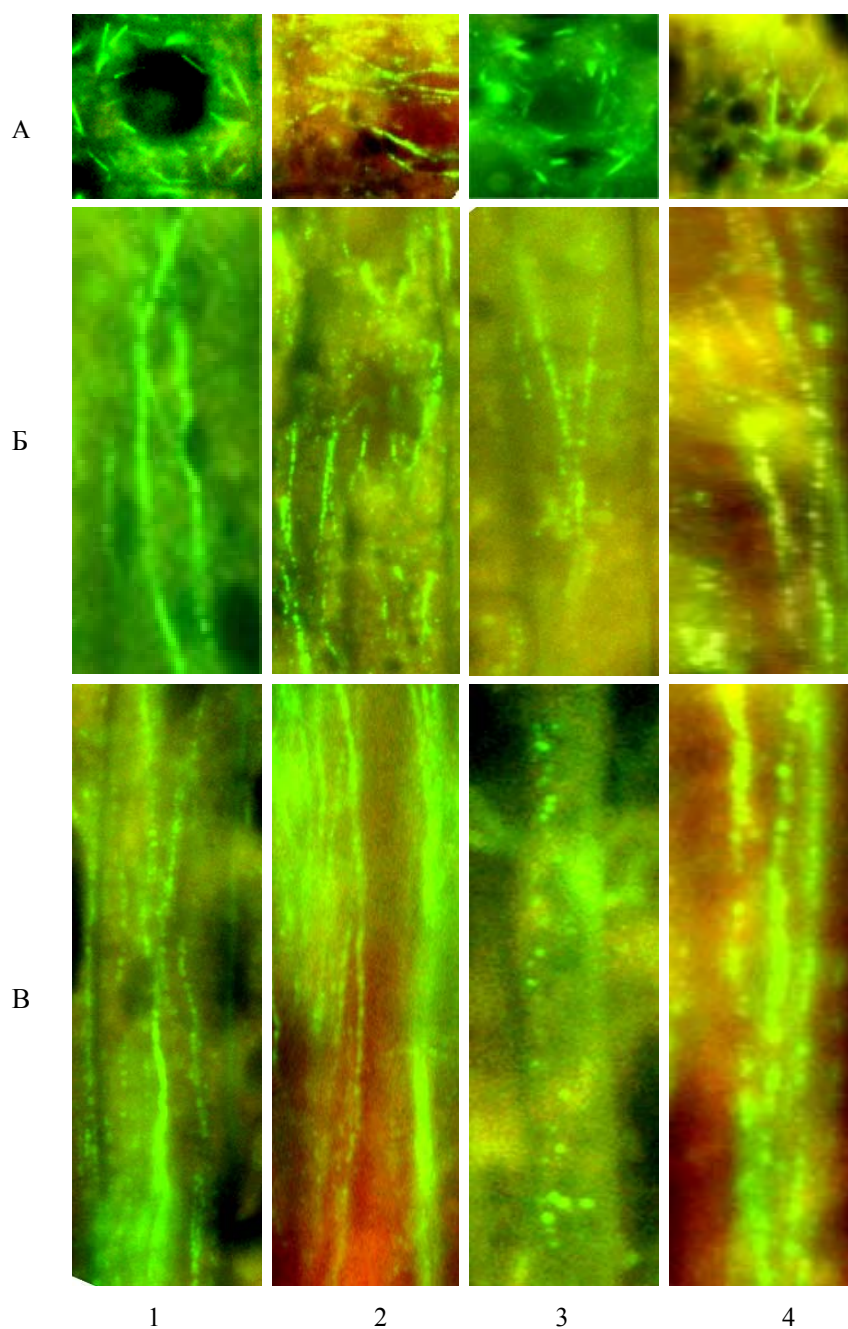


Рис. 2. Иммуноцитохимическая визуализация актинового цитоскелета в клетках зон меристемы (А), растяжения (Б) и дифференциации (В) корней Мироновской 808 при закаливании растений к холоду (3°C, 7 сут.) и действии АБК (30 мкМ, 3 сут.): 1 – без закаливания, 2 – закаливание, 3 – АБК без закаливания, 4 – АБК с закаливанием

клетках [27]. Позднее Mizuta с сотр. [62] также продемонстрировали сборку кортикальных стабильных МТ в клетках другой водоросли в течение их обработки холодом. В работе [63] авторы предположили, что наблюдаемое в опытах уменьшение чувствительности водоудерживающей способности (ВС) закалённых клеток корней пшеницы к ингибитору полимеризации МТ – оризалину – является следствием повышения структурной стабильности тубулинового цитоскелета, которое могло произойти в результате изменения соотношения между холодолабильными и холодостабильными МТ в сторону накопления последних или/и вследствие появления новых, более холодостойких популяций МТ. Следовательно, можно заключить, что в клетках должны существовать механизмы, контролирующие холодоустойчивость МТ посредством смены их сообществ в ответ на низкую температуру.

Наряду со сменой популяций цитоскелетных структур и возникновением более устойчивых их форм, другой причиной повышения структурной стабильности МТ и МФ в закалённых клетках могут быть взаимодействия с вновь образуемыми цитоплазматическими белками, синтез которых у озимой пшеницы происходит начиная с первых суток закалывания при 3°C [64]. Белки, связанные с МТ и МФ, оказывают многообразное влияние на их свойства, в том числе и на устойчивость к холоду [10]. Тот факт, что МТ клеток табака, собранные *in vitro*, являются холодолабильными, а находящиеся в тех же клетках – холодоустойчивыми [65], свидетельствует о присутствии в клетках особых защитных веществ, прежде всего белков цитозоля.

Одним из следующих аспектов холодостабильности МТ являются ассоциированные с ними белки (MAPs), которые были детально исследованы в клетках животных. По-видимому, такие белки должны существовать и в клетках растений. Растительные МТ, собранные *in vitro*, нередко проявляют высокую чувствительность к холоду, в то время как в интактных растительных клетках (*in situ*) обнаруживают устойчивость. Например, как следует из работ Akashi с сотр. [65], кортикальные МТ в клетках табака были холодоустойчивы, в то время как МТ этих же клеток, собранные *in vitro*, легко деполимеризовались при охлаждении. Это говорит о том, что в клетках растений по аналогии с животными неустойчивые тубулиновые структуры должны быть защищены особыми белками и другими защитными веществами. Так, Cyr и Palevitz [66] получили из клеток моркови протеины, которые вызывали сборку МТ, образование пучков *in vitro* и, тем самым, повышали их холодостойкость.

В целом же растительные MAPs являются мало исследованными в отношении их идентификации, изучения свойств и определения их генов [9, 10, 67]. Только два растительных МТ-ассоциированных белка клонированы до сих пор, которые являются факторами, необходимыми для трансляции белков [68]. Их относят к связывающим или закалывающим MAPs, но их функция *in vitro* пока не совсем понятна. Chang и Sonobe [69] выделили из таксол-стабилизированных МТ протопластов табака ассоциированный белок с М.м. = 65 кДа, который образует перекрестные мостики между отдельными МТ. К настоящему времени показано, что эти белки в клетках моркови присутствуют в четырёх изоформах с разным молекулярным весом (60–68 кДа), принадлежащих, однако, к одному антигенному семейству [70]. Кроме белков с 65 кДа, присутствие кото-

рых было обнаружено у всех основных построений МТ, выделен ассоциированный с МТ белок с М.м. = 120 кДа. Характерное распределение этого белка в области клеточной и ядерной мембран может свидетельствовать о его участии в связывании МТ с этими клеточными компонентами.

В растениях также идентифицированы актин-связывающие белки (ABPs) [71, 72]. Баланс между актиновыми мономерами и филаментами контролируется актин-деполимеризующим фактором ADF [72], кофилином [73], профилином [74]. Было показано, что ADF является внутренним кальций-зависимым киназным каскадом [75]. В настоящее время идентифицированы четыре растительных актин-связывающих белка на генном уровне, включая миозин, профилин, ADF и фимбрин [12, 76]. Большим достижением являются работы М.В. Туркиной с сотр. [77], которые из флоэмы борщевика и каллуса пшеницы выделили термостабильные актинсвязывающие белки, близкие по свойствам к тропомиозину и кальдесмону. Как известно, в животных клетках эти Ca^{2+} -зависимые белки регулируют взаимодействие актина и миозина с Ca^{2+} , то есть являются регуляторными белками актомиозиновой системы животных клеток.

В настоящее время уделяется большое внимание взаимодействиям мембран с компонентами цитоскелета. Электронно-микроскопически выявлены многочисленные перекрестные связи между кортикальным цитоскелетом и плазмалеммой [78]. По мнению Pearce и Willison [79], структурные перестройки цитоскелета модифицируют проницаемость мембран через изменение подвижности мембранных белков и их способности к агрегации. Действительно, в работе Dugas с сотр. [80] деполимеризация МТ увеличивала боковую диффузию мембранных липидов и белков в протопластах кукурузы. Допускается возможность при низких температурах освобождения внутримембранных частиц (ВМЧ), состоящих из белков, от связей с цитоматриксом, при этом эти частицы могут агрегировать или даже втягиваться в цитоскелет. Появившиеся на мембране свободные от ВМЧ участки, состоящие в основном из липидного слоя, становятся более подвижными и проницаемыми [79].

Существуют как структурные, так и функциональные доказательства взаимодействий МТ с плазматической мембраной в растительных клетках [81] и того, что эти взаимодействия увеличивают стабильность МТ к холоду. Akashi и Shibaoka [82] описали трансмембранные белки в клетках табака, ответственные за ассоциацию МТ с плазмалеммой. Энзиматическое разрушение этих белков приводило к освобождению МТ от плазматической мембраны и делало тубулиновые структуры более чувствительными к индуцированной холодом деполимеризации. Стабилизирующий эффект плазматических мембран на МТ в клетках подтверждается также наблюдением того, что эндоплазматические тубулины, у которых отсутствуют связи с плазмалеммой, под действием низкотемпературной обработки деполимеризуются быстрее, чем кортикальные в клетках корней кукурузы [34]. Дополнительно к взаимодействиям МТ – плазмалемма устойчивость кортикальных МТ к холоду в клетках, локализованных достаточно далеко от меристем, может определяться специфическими свойствами вторично-утолщенных клеточных стенок. Akashi с сотр. [65] показали, что веществом, стабилизирующим МТ, может быть экстенсин – природный поликатионный белок клеточных стенок, содержащий до 13% лизина. Экстен-

син – важный компонент клеточной стенки и очень широко представлен в растительном мире. По-видимому, этот экстрацеллюлярный компонент клеточной стенки делает МТ холодоустойчивыми через взаимодействие с белками плазматических мембран. Следует отметить, что в настоящее время образованию континуума «цитоскелет – плазматическая мембрана – клеточная стенка» уделяется большое внимание с точки зрения формирования адекватных ответов растительных клеток на различные сигналы [83]. В другой работе [6] сохранению МТ в замороженных протопластах также способствовал экстенсин клеточных стенок. Кроме того, образование в пыльцевых трубках табака более стабильных к холоду МТ происходило благодаря их прикреплению к ядерной и цитоплазматической мембранам [6] и предположительно в результате трансляционных модификаций α -тубулина, связанных с его ацетилированием [84].

Bartolo и Carter [22] установили, что клетки, обработанные таксомом и затем замороженные, приобретали неправильный контур, и наблюдалось значительное уплотнение стабилизированных и вместе с тем необычных по морфологии МТ, находящихся около плазмалеммы. По мнению авторов, таксол вызывает образование высокополимеризованных МТ, что приводит к нарушению обычных связей между МТ и плазмалеммой, и именно это блокирует адекватные ответы таксол-обработанных клеток на замораживание, то есть повышение их устойчивости к низким температурам.

Lloyd с соавт. [20] высказали мнение, что стабильность кортикальных МТ возрастает вследствие их взаимодействия с трансмембранными белками, внешние области которых поперечно связаны с компонентами клеточных стенок.

В литературе существует мнение, что важную роль в поддержании устойчивости цитоскелета к низким температурам играют взаимодействия между МТ и МФ [7]. Так, замораживание растений при -5°C приводило к деполимеризации обеих цитоскелетных структур (МТ и МФ), но все же МФ повреждались в меньшей степени. Авторы показали, что применение таксола – вещества, стабилизирующего тубулиновые МТ, – увеличивало также стабильность актиновых МФ к холоду [7]. Однако в клетках водоросли *Nitella* отмечено значительное удлинение тубулиновых структур (свидетельствующее об увеличении статуса полимеризации МТ) после остановки движения цитоплазмы под действием цитохалазина Б – препарата, способствующего деструкции актиновых компонентов цитоскелета [85]. В противоположность этому показано, что если в клетках водоросли *Nitella* предварительно разрушить МТ, то для деполимеризации МФ можно использовать более низкую концентрацию цитохалазина Б. Было сделано предположение, что либо сам тубулин, либо МТ-ассоциированные белки высвобождаются после деградации МТ и взаимодействуют с актиновым цитоскелетом, повышая его чувствительность к ингибиторам [86].

Mizuno [39] в своей работе показал, что стабильные к холоду МТ в клеточных экстрактах табака находятся во взаимодействии с актиновыми филаментами вдоль всей своей длины. Этот автор не обнаружил значительных различий по электрофоретической подвижности тубулинов из холодостойких и холодолабильных МТ и указал, таким образом, на значение микрофиламентных структур и других MAPs в низкотемпературной стабильности МТ. Он предположил, что потеря этого свойства МТ связана с отделением от их поверхности

филаментных белков. Возрастание стабильности МТ к холоду, по мнению Mizuno [39], может основываться на увеличении синтеза филаментных структур и на способности этих факторов ассоциироваться с поверхностью МТ.

В клетках корневых волосков *Hydrocharis* выявлено влияние МТ на пространственную организацию кортикальных МФ [87], а в клетках эпикотилей бобов и в суспензионной культуре клеток табака, напротив, показано участие МФ в определении ориентации и структуры МТ [88]. Наконец, Collings с сотр. [21] удалось представить доказательства непосредственного взаимодействия актина с плазматической мембраной и кортикальными МТ в протопластах табака.

3. Молекулярно-генетические основы модификации цитоскелета

Torres и Delgado [41], обнаружив различную устойчивость кортикальных и цитоплазматических МТ к холоду, предположили, что тубулины этих МТ кодируются различными генами, что может сказаться на составе изоформ. В работе Kerr и Carter [38] было показано изменение состава изоформ тубулина в растительных клетках под влиянием закалывания и холодового стресса. Авторы обнаружили шесть изоформ α -тубулина и семь изоформ β -тубулина в экстрактах незакаленных и закаленных к холоду кончиков корней ржи. При закаливании уменьшалось содержание минорной β -тубулиновой изоформы и возникали другие изоформы β -тубулина с более кислым рН. В другой работе Okamura с сотр. [24] определяли содержание тубулина в экстрактах клеток моркови (по колхицинсвязывающей активности, которая соответствует ингибированию полимеризации МТ). В результате длительного охлаждения (4°C , 5 дней) восстановление колхицинсвязывающей активности происходило медленно, и многие клетки при этом погибали. После электрофореза растворимых и кислых белков (куда входят тубулины) авторы обнаружили, что холодовая обработка (4 дня во льду) приводила к исчезновению тубулиновых субъединиц. Следовательно, исчезновение колхицинсвязывающей активности (уменьшение общего пула тубулинов) происходило параллельно с деградацией тубулиновых субъединиц при охлаждении. При этом сильнее всего под влиянием холодового стресса деградировала одна из изоформ α -тубулина – bII-изоформа.

Chu с сотр. [7] изучали экспрессию β -тубулинового гена (TUB8) в листьях *Arabidopsis thaliana* в ответ на низкотемпературную экспозицию (4°C). Авторы с использованием химерного β -тубулинового гена, включённого в геном растений арабидопсиса, убедительно доказали, что обнаруженное уменьшение содержания транскриптов TUB8 в ответ на низкую температуру регулируется на уровне транскрипции, то есть является результатом снижения экспрессии β -тубулинового гена. Как сообщили Volkos с соавт. [89], карбоксильное окончание β -тубулина является решающим элементом регуляторной области тубулина растений и может вовлекаться в модуляцию микротрубочковой стабильности в течение ответа растений на охлаждение и Ca^{2+} . Удаление небольшого участка карбоксильного окончания β -тубулина (около 15 аминокислот) значительно повышает устойчивость МТ к деполимеризации под действием низких температур. Было обнаружено также, что некоторые транскрипты β -тубулинового гена, регулируемые факторами окружающей среды, отвечали за синтез β -

тубулинов с укороченными карбоксильными окончаниями. Эти наблюдения навели авторов на мысль, что одним из ранних ответов клеток на низкую температуру может быть изменение β -тубулиновых изоформ, например, образование β -тубулинов с укороченными карбоксильными окончаниями, преимущественно накапливающихся в клетке и способствующих возникновению МТ с повышенной стабильностью к холоду.

Ouellet с сотр. [90] показали, что уровень экспрессии гена TaADF (ответственного за синтез актин-деполимеризующего фактора) пшеницы (*Triticum aestivum*) коррелирует со способностью растений переносить замораживание. Анализ аминокислотной последовательности показал, что этот ген кодирует белок, гомологичный членам семейства актин-деполимеризующий фактор (ADF)/кофилин. Согласно данным вестерн-блот анализа TaADF экспрессируется только в закаленных к холоду видах *Gramineae*, и что уровень аккумуляции ADF намного выше у более выносливых сортов пшеницы. Обнаружено, что эта аккумуляция регулируется фактором(ами), кодируемыми геном(ами), расположенными на хромосоме 5A, которая ассоциируется с выносливостью к холоду. На основе полученных данных авторы заключили, что этот белок требуется для цитоскелетных перестроек, которые происходят при действии низких температур и которые увеличивают выносливость растений к замораживанию.

Причиной возникновения МТ с высокой устойчивостью к низким температурам могут быть также посттрансляционные изменения тубулиновых белков. Такие модификации были обнаружены сначала для тубулинов животных клеток – фосфорилирование, глутаминирование β -тубулинов, ацетилирование и детирозинирование α -тубулина [91]. Обычно стабильные МТ ацетилированы и детирозинированы, а лабильные – тирозинированы. Стабилизирующий МТ препарат – таксол – способствует ацетилированию α -тубулина. Для растительных клеток впервые довольно обстоятельная информация такого рода получена в работе Aström [84] при изучении МТ растущих пыльцевых трубок табака. Автор высказала предположение, что ацетилированные участки α -тубулина обеспечивают прикрепление МТ к клеточной и ядерной мембранам, а также способствуют взаимодействию МТ друг с другом. По мнению автора, аккумуляция тубулина в примембранных слоях, особенно вблизи ядерной мембраны, может служить в качестве «затравок» для реполимеризации МТ при восстановлении от холода.

Abdrakhamanova с сотр. [18] исследовали состав трех изоформ α -тубулина (TUBA1, TUBA2 и TUBA3) у контрастных по морозоустойчивости сортов озимой пшеницы в процессе закаливания. Сравнительный анализ состава изученных изоформ с динамикой МТ позволил сделать заключение о том, что появление в клетках морозоустойчивых сортов на поздних этапах закаливания холодоустойчивых МТ сопровождается заметным уменьшением в их составе изоформы TUBA2. Другой важной молекулярной характеристикой динамичности МТ является содержание тирозинированного α -тубулина (маркер динамичных МТ), количество которого, как показали авторы [18], в процессе закаливания одинаково увеличивалось в корнях всех трех сортов пшеницы независимо от их морозоустойчивости, но до закалки обнаружена прямая зависимость между его количеством, способностью МТ к разборке и морозоустойчивостью сорта.

В связи с полученными результатами сделан вывод, что состав изоформ α -тубулина и содержание его тирозинированной формы можно использовать в качестве чувствительных молекулярных критериев холодостойкости МТ и морозостойкости разных сортов озимой пшеницы.

Как уже отмечалось выше, в регулировании стабильного состояния МФ принимают участие актин-связывающие белки. Danyluk с сопр. [92] идентифицировали и охарактеризовали ген (*WcoG 719*), регулируемый низкими температурами и кодирующий актинсвязывающие белки. Транскрипты этого гена сначала быстро аккумулировались, но затем их количество постепенно снижалось в течение холодого закаливания в клетках разных сортов пшеницы. Устойчивые к холоду сорта к концу низкотемпературной адаптации обладали более высоким уровнем мРНК гена *WcoG 719* по сравнению с неустойчивыми. Когда растения переносили в теплые условия, количество транскриптов снижалось до уровня контроля. Авторы показали, что накопление мРНК гена *WcoG 719* под действием низких температур возможно только у относительно криорезистентных видов растений. Предположили, что экспрессия этого гена связана с развитием морозостойкого состояния растений. Белки, кодируемые геном *WcoG 719*, по своей природе оказались очень сходными с белками кофилинового семейства, которые, как известно, являются необходимыми для выживания клеток и могут быть применены для их защиты от стресса [93]. Функции кофилинов, по-видимому, консервативны у всех эукариот от дрожжей до млекопитающих, включая, возможно, высшие растения. Высокий уровень индукции гена *WcoG 719* на ранних стадиях закаливания к холоду наводит на мысль о существовании у эукариот сходных защитных механизмов от низкотемпературного стресса. Повышенная аккумуляция актин-связывающих белков у резистентных к холоду видов растений может иметь отношение к их способности модулировать структуру актина, необходимую для развития высокой устойчивости к морозу.

4. Динамическая нестабильность цитоскелетных структур как триггер температурного и гормонального сигналов при низкотемпературной адаптации растений

В последнее время все более признанным является представление, согласно которому участие цитоскелета в функционировании различных сигнальных систем клеток обуславливается динамической нестабильностью, то есть способностью к быстрой реорганизации его основных структурных компонентов – тубулиновых МТ, актиновых МФ и ассоциированных с ними белков [9, 11, 12, 14]. Эта нестабильность или лабильность проявляется в том, что при действии на растения абиотических и биотических факторов (свет, гравитация, фитогормоны, патогены) МТ и МФ постоянно находятся в состоянии сборки или разборки, изменяя свое структурное и полимерное состояние. В ряде работ показано, что такого рода изменения имеют непосредственное отношение к процессам клеточного роста, морфогенеза и, в конечном итоге, к адекватным ответам растений на изменяющиеся условия среды [2, 5–10, 17].

Ввиду высокой динамичности цитоскелет (и особенно МТ как наиболее чувствительные компоненты цитоматрикса) может быть одной из первичных

«мишеней» действия низких температур и АБК как индукторов морозоустойчивости растений. Поэтому вопрос о цитоскелетзависимой природе триггера низкотемпературной адаптации растений актуален, но мало исследован.

В работах [19, 59] была обнаружена более высокая устойчивость МТ корней неустойчивого сорта озимой пшеницы к деполимеризующему действию оризалина до закалки (23°C) по сравнению с устойчивыми сортами, однако после холодового закаливания (3°C, 7 сут.) эта сортовая специфика ответов МТ менялась на противоположную, так как в клетках морозоустойчивых сортов происходило увеличение стабильности МТ. Таким образом, чем более морозоустойчивым является сорт озимой пшеницы, тем в большей степени происходила деполимеризация МТ в дифференцирующихся клетках незакалённых корней под действием оризалина. По мнению авторов, высокая лабильность и динамическая нестабильность МТ до закаливания могут предопределять развитие высокого уровня устойчивости растений к низким температурам, в то время как повышенная сопротивляемость тубулиновых структур к деполимеризующему действию ингибитора, по-видимому, является причиной формирования в дальнейшем низкой морозоустойчивости растений. На основании полученных данных авторами была выдвинута гипотеза фазового изменения стабильности МТ и МФ в процессе низкотемпературной адаптации растений.

Более детальные эксперименты [18] подтвердили эту концепцию фазового изменения стабильности цитоскелета. Динамическую нестабильность МТ авторы характеризовали их способностью разбираться на фрагменты (в ответ на холодовой шок при -7°C, 2 ч) и вновь собираться в пучки до закаливания и в ходе закаливания через 12 ч, 1 и 2 сут. На первый взгляд были получены парадоксальные данные, свидетельствующие о том, что до закаливания и на ранних этапах закаливания (через 12 ч) более лабильными и динамичными (сильнее разрушались) были МТ выносливых к морозу сортов пшеницы, а более стабильными (меньше разрушались) были МТ чувствительного к морозу сорта. Однако с увеличением продолжительности закалки, начиная с первых суток, ситуация менялась на противоположную, то есть парадокс исчезал: в клетках морозоустойчивых сортов МТ приобретали высокую холодостабильность, а в закаленных клетках неустойчивого сорта холодостойкость МТ снижалась. Следовательно, на более поздних этапах закаливания все становилось логичным: между холодостабильностью МТ и уровнем морозоустойчивости сорта имела место прямая зависимость, в то время как до закаливания и в начале закаливания эта зависимость была обратной. Наблюдаемая в клетках корней морозоустойчивых сортов кратковременная частичная разборка МТ на ранних этапах закаливания, свидетельствующая об их высокой лабильности, предшествует появлению на поздних этапах закаливания холодостойких сообществ МТ, в то время как в клетках морозочувствительного сорта такой начальной деструкции МТ не происходит, то есть изначально они являются менее лабильными и более стабильными, однако, при дальнейшем закаливании их холодостойкость снижалась. При этом высокий уровень динамической нестабильности МТ у морозоустойчивых сортов пшеницы (быстрее разбирались и быстрее собирались) коррелировал как с более ускоренным восстановлением роста корней, так и с развитием высокого уровня морозоустойчивости в ходе низкотемператур-

ной адаптации, чего не наблюдалось у неустойчивого к морозу сорта. В связи с этим можно считать, что способность растений к эффективному закаливанию определяется высокой динамичностью МТ и что начальная разборка МТ необходима для достижения в последующем высокого уровня адаптации и морозоустойчивости растений. Это нашло подтверждение в опытах с искусственно вызываемой у малочувствительного сорта растений кратковременной и обратимой фрагментации МТ под действием антимиотического гербицида пронамида, сопровождаемой повышением устойчивости роста корней к морозному шоку, аналогично закаливанию. С учётом этих данных, авторы пришли к выводу, согласно которому кратковременная, частичная и обратимая разборка тубулинового цитоскелета, происходящая в начале холодового закаливания, является триггером механизма низкотемпературной адаптации у выносливых к морозу растений [18].

По-видимому целесообразность высокой динамической нестабильности МТ на начальных этапах закаливания обуславливается тем, что МТ могут участвовать в модуляции Ca^{2+} -каналов плазмалеммы. Основанием для такого соображения являются данные, в соответствии с которыми низкие температуры активируют Ca^{2+} -каналы плазмалеммы, тем самым усиливают поток Ca^{2+} в цитоплазму и запускают каскад киназ, что в конечном итоге приводит к синтезу белков низкотемпературного стресса – COR белков [94]. Таким образом, считается, что именно кальциевый поток индуцирует процессы холодной адаптации [95].

Оказалось, что аналогичным образом на Ca^{2+} -каналы плазмалеммы действуют деструкция кортикальных МТ и специфические блокаторы их сборки, например, оризалин [48, 49]. При этом увеличивается «время жизни» этих каналов и в результате повышается концентрация цитоплазматического Ca^{2+} [30]. Следовательно, МТ могут функционировать как модуляторы холодной чувствительности Ca^{2+} -каналов: устойчивые (стабильные) МТ ограничивают работу индуцируемых холодом и зависящих от механического напряжения (давления) кальциевых каналов. Однако при разборке МТ происходит ослабление такого «сдерживания», и работа каналов начинает усиливаться, ускоряя цепочку сигналов, кульминацией которых является повышение сопротивляемости к холоду [96].

Вероятно, к этому имеет прямое отношение и частичная деполимеризация МФ (или фрагментация их тяжей). В работе [90] показано, что в закаленных клетках пшеницы экспрессируется ген, кодирующий актин-деполяризующий белок, подобный кофилину, уровень которого был выше у выносливых к морозу сортов. Вместе с тем также было обнаружено, что кратковременная разборка актиновых филаментов в ответ на действие низких температур является сигналом, запускающим развитие адаптационных процессов через уменьшение текучести плазматических мембран и активацию поступления кальция в цитоплазму [30].

Sangwan с сотр. [97] идентифицировали из клеток люцерны первую растительную митоген-активируемую протеинкиназу MAPK (НАМК), которая запускается тепловым шоком. Существует также SAMK – митоген-активируемая протеинкиназа, индуцируемая холодом. Для понимания механизма, с помощью

которого тепло или холод активирует НАМК или САМК, авторы предположили, что физическое состояние мембраны, на которое как прямо, так и опосредованно влияет температура, может быть первоначальным триггером (пусковым механизмом). Исследуя роль текучести мембран, стабильности цитоскелета и притока Ca^{2+} в активации САМК и НАМК, авторы показали, что для холодной активации САМК необходимо повышение жесткости мембраны, тогда как тепловая активация НАМК происходила в результате повышения текучести мембраны. Активация как САМК, так и НАМК при действии температурного стресса или при изменении структуры мембраны имитируется при 25°C дестабилизаторами МТ и МФ – оризалином и латрункулином Б соответственно. Сделан вывод, что тепловая активация НАМК и холодная активация САМК запускаются вследствие противоположных изменений текучести мембраны, что вызывает перестройку цитоскелета, приток Ca^{2+} и модифицирует работу Ca^{2+} -зависимых протеинкиназ.

Принимая во внимание эти экспериментальные данные, обнаруженная в работе [18] частичная и кратковременная деструкция кортикального тубулинового цитоскелета в начале закаливания у устойчивых к морозу растений, по-видимому, усиливает поступление Ca^{2+} в цитоплазму, что должно способствовать более ускоренному включению и более активному функционированию Ca^{2+} -зависимых сигнальных систем. Менее же динамичные МТ неустойчивых к морозу сортов (ввиду отсутствия у них начальной разборки МТ), вероятно, замедляют вход Ca^{2+} в цитоплазму и снижают тем самым скорость включения процессов холодной адаптации.

Таким образом, МТ (и, очевидно, МФ) могут действовать как эффекторы активируемых холодом Ca^{2+} -каналов плазмалеммы, ускоряя (у устойчивых растений) или замедляя (у неустойчивых) внутриклеточные потоки кальция, что соответствующим образом будет влиять на включение пусковых адаптационных процессов с участием сигнальных систем и, в первую очередь, кальций-зависимых.

Что касается зависимости гормонального сигнала от динамичности цитоскелета, то в работах [19, 35], в которых параллельно с низкими температурами иммуноцитохимически было изучено влияние АБК на МТ и МФ, показано, что обработка растений экзогенной АБК наряду с частичной деструкцией тубулинового цитоскелета индуцировала как распад тяжей МФ на более тонкие нити, так и явно выраженную их деполяризацию. Ввиду того, что в клетках озимой пшеницы АБК накапливается в первые дни закаливания и больше у морозоустойчивых сортов [98], а затем её эффекты как индуктора морозоустойчивости [61] и как модификатора цитоскелета [19] снимаются низкими температурами, то это позволяет предположить, что АБК так же сортоспецифично, как и закаливание, запускает процессы холодной адаптации через деструкцию цитоскелета и изменение входа кальция в цитоплазму.

Заключение

Таким образом, представленный в обзоре материал, касающийся изменения пространственной организации и свойств основных структурных компонентов цитоскелета – микротрубочек (МТ) и микрофиламентов (МФ) – в связи

с адаптацией растений к низким температурам, свидетельствует о том, что реорганизация цитоскелетной сети является одним из важных фундаментальных механизмов формирования термоадаптивного потенциала растений. Особенно существенной частью этого механизма является повышение холодостойкости МТ, обусловленное появлением новых сообществ этих структур с изменённым составом изоформ тубулиновых белков. Получены ранее неизвестные данные о триггерной роли кратковременной и частичной деструкции цитоскелетных структур, так называемой динамической нестабильности, в низкотемпературных адаптивных процессах растений, что связывается с временной активацией Ca^{2+} -каналов плазматической мембраны и усилением поступления Ca^{2+} в цитоплазму. Таким образом, выполняя функцию эффекторов холода-активируемых Ca^{2+} -каналов, МТ и МФ могут повышать эффективность Ca^{2+} -зависимых сигнальных систем. Очевидно, что это только начало исследований по выяснению механизмов участия цитоскелета в восприятии и трансдукции низкотемпературного сигнала, включающего молекулярно-генетическую программу физиологической адаптации растений.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 04-04-491318), Минобразования РФ (проект № E02-6.0-185) и Финской академией наук (проект № 38857/2988501).

Summary

L.P. Khokhlova, M.V. Makarova. The cytoskeleton reorganization under low temperature action on plants.

The analysis of literary data and results of authors own investigations about the many – side low temperature effect on the main components of plant cell cytoskeleton – microtubules (MTs) and microfilaments (MFs) was conducted in the review for the first time. The available information about physical – chemical reorganization of cytoskeletal network and MT and MF main properties change under the action on plants of different temperature regimes are considered in detail. The special attention is given to the mechanisms of cytoskeleton structure cold stability and molecular – genetic principles of the changeability. For the first time the idea about the dynamic instability of tubulin and actin cytoskeleton as the trigger of temperature and hormonal signals under plant adaption to low temperatures is argued.

Литература

1. *Baskin T.I.* The cytoskeleton // Biochemistry and molecular biology of plants / Eds. B.B. Buchanan, W. Gruissem, R.L. Jones. – Rockville, Courier Companies, 2000. – P. 202–258.
2. *Barlow W.P., Baluška F.* Cytoskeletal perspectives on root growth and morphogenesis // Plant Mol. Biol. – 2000. – V. 51. – P. 289–322.
3. *Blancaflor E.B.* Cortical actin filaments potentially interact with cortical microtubules in regulating polarity of cell expansion in primary roots of Maize (*Zea mays* L.) // Plant Growth Regul. – 2000. – V. 19. – P. 406–414.
4. *Hepler P.K., Vidali L., Cheung A.Y.* Polarized cell growth in higher plants // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. – 2001. – V. 17. – P. 159–187.

5. *Lloyd C., Chan J.* Microtubules and the shape of plants to come // *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* – 2004. – V. 5. – P. 13–23.
6. *Aström H., Virtanen I., Raudaskoski M.* Cold-stability in the pollen tube cytoskeleton // *Protoplasma.* – 1991. – V. 160. – P. 99–107.
7. *Chu B., Snustad P., Carter J.* Alteration of β -tubulin gene expression during low-temperature exposure in leaves of *Arabidopsis thaliana* // *Plant Physiol.* – 1993. – V. 103. – P. 371–377.
8. *Shibaoka H.* Plant hormone-induced changes in the orientation of cortical microtubules: alterations in the cross-linking between microtubules and the plasma membrane // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1994. – V. 45. – P. 527–544.
9. *Nick P.* Signaling to the microtubular cytoskeleton in plants // *Int. Rev. Cytol.* – 1998. – V. 184. – P. 33–79.
10. *Goddard R.M., Wick S.M., Silflow C.D., Snustad D.P.* Microtubule components of the plant cell cytoskeleton // *Plant Physiol.* – 1994. – V. 104. – P. 1–6.
11. *Nick P.* Signals, motors, morphogenesis – the cytoskeleton in plant development // *Plant Biol.* – 1999. – V. 1. – P. 169–179.
12. *Volkman D., Baluška F.* Actin cytoskeleton in plants: from transport networks to signaling networks // *Microscopy research and technique.* – 1999. – V. 47. – P. 135–154.
13. *Staiger C.J.* Signalings to the actin cytoskeleton in plants // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 2000. – V. 51. – P. 257–288.
14. *Туркина М.В., Соколов О.И.* Миозины – моторы актомиозиновой системы подвижности; связь с мембранами и сигнальными системами // *Физиология растений.* – 2001. – Т. 48. – С. 788–800.
15. *Deeks M.J., Hussey P.J., Davies B.* Formins: intermediates in signal – transduction cascades that affect cytoskeletal reorganization // *Trends Plant Sci.* – 2002. – V. 7. – P. 492–498.
16. *Smith L.G.* Cytoskeletal control of plant cell shape: getting the fine points // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2003. – V. 6. – P. 63–73.
17. *Клячко Н.Л.* Актиновый цитоскелет и форма растительной клетки // *Физиология растений.* – 2004. – Т. 51. – С. 918–925.
18. *Abdrakhmanova A.F., Wang Q.Y., Khokhlova L.P., Nick P.* Is microtubule disassembly a trigger for cold acclimation? // *Plant Cell Physiol.* – 2003. – V. 44. – P. 676–686.
19. *Хохлова Л.П., Олиневич О.В.* Реорганизация цитоскелета в клетках *Triticum aestivum* при закаливании растений к холоду и действию абсцизовой кислоты // *Физиология растений.* – 2003. – Т. 50. – С. 528–540.
20. *Lloyd C.W., Drobak B.K., Dove S.K., Staiger C.J.* Interactions between the plasma membrane and the cytoskeleton in plants // *Membranes: specialized functions in plants* / Eds. M. Smallwood, J.P. Knox, D.J. Bowles. – Oxford: Bios. scientific, 1996. – P. 1–20.
21. *Collings D.A., Asada T., Allen N.S., Shibaoka H.* Plasma membrane-associated actin in bright Yellow 2 tobacco cells // *Plant Physiol.* – 1998. – V. 118. – P. 917–928.
22. *Bartolo M.E., Carter J.V.* Microtubules in mesophyll cell of nonacclimated and cold-acclimated spinach, visualization and responses to freezing, low temperature and dehydration // *Plant Physiol.* – 1991. – V. 97, No 1. – P. 175–181.
23. *Rikin A., Atsmon D., Gitler C.* Quantitation of chill-induced release of a tubulin – like factor its prevention by abscisic acid in *Gossypium hirsutum* L. // *Plant Physiol.* – 1983. – V. 712. – P. 747–748.
24. *Okamura C., Kakiuchi M., Sano A., Kawajiri M.* Loss of tubulin during cold treatment of cultured carrot cells // *Physiol. Plantarum.* – 1993. – V. 88. – P. 93–98.

25. *Jian L.C., Sun L.H., Lin Z.P.* Studies on microtubule cold stability in relation to plant cold hardiness // *Acta Bot. Sin.* – 1989. – V. 31. – P. 737–741.
26. *Chu B., Xin Z., Li P.H., Carter J.V.* Depolymerization of cortical microtubules is not a primary cause of chilling injury in corn (*Zea mays* L. cv. black mexican sweet) suspension culture cells // *Plant, Cell and Environment.* – 1992. – V. 103. – P. 371–377.
27. *Kerr G.P., Carter J.V.* Relationship between freezing tolerance of root – tip cells and cold stability of microtubules in rye (*Secale cereale* L. cv Prima) // *Plant Physiol.* – 1990a. – V. 93. – P. 77–82.
28. *Pihakaski-Maunsbach K., Puhakainen T.* Effect of cold exposure on cortical microtubules of rye (*Secale cereale*) as observed by immunocytochemistry // *Physiol. Plantarum.* – 1995. – V. 93. – P. 563–571.
29. *Браун А.Д., Моженок Т.П.* Неспецифический адаптационный синдром клеточной системы. – Л.: Наука, 1987. – 230 с.
30. *Örvar B.L., Sangwan V., Omann F., Dhindsa R.S.* Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity // *Plant J.* – 2000. – V. 23. – P. 785–794.
31. *Клячко Н.Л.* Фитогормоны и цитоскелет // *Физиология растений.* – 2003. – Т. 50. – С. 475–480.
32. *Fosket D.* Cytoskeletal proteins and their genes in higher plants // *Biochemistry of Plants.* – N. Y.: Academic Press, 1989. – P. 393–454.
33. *Quader H.* Cytoskeleton: Microtubules // *Progress in Botany.* – Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag, 1998. – P. 374–395.
34. *Baluška F., Parker J.S., Barlow P.W.* The microtubular cytoskeleton in cells of cold-treated roots of maize (*Zea mays* L.) shows tissue-specific responses // *Protoplasma.* – 1993. – V. 172. – P. 84–96.
35. *Олиневич О.В., Хохлова Л.П.* Реорганизация тубулинового и актинового цитоскелета при закаливании растений *Triticum aestivum* L. к холоду и действию абсцизовой кислоты // *Цитология.* – 2002. – Т. 44. – С. 532–543.
36. *Hardham A.R., Gunning B.E.* Structure of cortical microtubule arrays in plants // *J. Cell Biol.* – 1978. – V. 77. – P. 14–34.
37. *Ilker R., Breidenbach R.W., Lyons J.M.* Sequence of ultrastructural changes in tomato cotyledons during shot periods of chilling // *Lyons J.M., Graham D., Raison J.K. (eds.). Low Temperature Stress in Crop Plants.* – L.: Academic Press, 1979. – P. 97–113.
38. *Kerr G.P., Carter J.V.* Tubulin isotypes in rye roots are altered during cold acclimation // *Plant Physiol.* – 1990b. – V. 93. – P. 83–88.
39. *Mizuno K.* Induction of cold stability of microtubules in cultured tobacco cells // *Plant Physiol.* – 1992. – V. 100. – P. 740–748.
40. *Hogetsu T.* Re-formation of microtubules in *Closterium ehrenbergii* Meneghini after cold-induced depolymerization // *Planta.* – 1986. – V. 167. – P. 437–449.
41. *Torres A., Delgado P.* Effect of cold and nocodazole treatments on the microtubular systems of *Paramecium* in interphase // *J. Protozool.* – 1989. – V. 36. – P. 113–119.
42. *Dawson P.J., Lloyd C.W.* Comparative biochemistry of plant and animal tubulin // *The Biochemistry of Plants / Ed. D.D. Davies.* – N. Y.: Academic Press, 1987. – P. 3–47.
43. *Lee J.C., Timasheff Z.* In vitro reconstruction of cell brain microtubules of solution variables // *Biochem.* – 1971. – V. 16. – P. 1754–1764.
44. *Marchant H.J.* Microtubules associated with the plasma membrane isolated from protoplasts of the green alga *Mougeotia* // *Exp. Cell. Res.* – 1978. – V. 115. – P. 25–30.

45. Woods C.M., Polito V.S., Reid M.S. Response to chilling stress in plant cells. Redistribution of intracellular calcium // *Protoplasma*. – 1984. – V. 121. – P. 17–24.
46. Minorsky P.V., Spanswick R.M. Electrophysiological evidence for a role for calcium in temperature sensing by roots of cucumber seedlings // *Plant Cell Environ.* – 1989. – V. 12. – P. 137–143.
47. Ding J.P., Pichard B.G. Mechanosensory calcium – selective cation channels in epidermal cells // *Plant J.* – 1993. – V. 3. – P. 83–110.
48. Thion L., Mazars C., Thuleau P., Graziana A., Rossignol M., Moreau M., Ranjeva R. Activation of plasma membrane voltage – dependent calcium – permeable channels by disruption of microtubules in carrot cells // *FEBS Lett.* – 1996. – V. 393. – P. 13–18.
49. Mazars C., Thion L., Thuleau P., Graziana A., Knight M.R., Moreau M., Ranjeva R. Organization of cytoskeleton controls the changes in cytosolic calcium of cold – shocked *Nicotiana glauca* protoplasts // *Cell Calcium*. – 1997. – V. 22. – P. 413–420.
50. Cyr R.J. Calcium/calmodulin affects microtubule stability in lysed protoplasts // *J. Cell Sci.* – 1991. – V. 100. – P. 311–317.
51. Baskin T.I., Wilson J.E. Inhibitors of protein kinases and phosphatases alter root morphology and disorganize cortical microtubules // *Plant Physiol.* – 1997. – V. 113. – P. 493–502.
52. Monroy A.F., Labbe E., Dhindsa R.S. Low temperature perception in plants: effects of cold on protein phosphorylation in cell – free extracts // *FEBS Lett.* – 1997. – V. 410. – P. 206–209.
53. Komatsu S., Kato A. Varietal differences in protein phosphorylation during cold treatment of rice leaves // *Phytochemistry*. – 1997. – V. 45. – P. 1329–1335.
54. Olinevich O.V., Khokhlova L.P., Raudaskoski M. Effect of abscisic acid and cold acclimation on the cytoskeletal and phosphorylated proteins in different cultivars of *Triticum aestivum* L. // *Cell Biol. Inter.* – 2000. – V. 24. – P. 365–373.
55. Олиневич О.В., Хохлова Л.П. Влияние абсцизовой кислоты, низких температур и возраста растений на цитоскелетные и фосфорилированные белки // *Биохимия*. – 2003. – Т. 68. – С. 828–839.
56. McNally F. Modulation of microtubule dynamics during cell cycle // *Curr. Op. Cell Biol.* – 1996. – V. 8. – P. 23–29.
57. Quader H., Hofmann A., Schnepf E. Reorganization of the endoplasmic reticulum in epidermal cells of onion bulb scales after cold stress: Involvement of cytoskeletal elements // *Planta*. – 1989. – V. 177. – P. 273–280.
58. Хохлова Л.П., Палих Э., Олиневич О.В., Тараканова Н.Ю. Влияние цитохалазина Б и колхицина на водный обмен растений при холодовом закаливании и разных условиях замораживания – оттаивания // *Цитология*. – 1997. – Т. 39. – С. 294–304.
59. Olinevich O.V., Khokhlova L.P., Raudaskoski M. The microtubule stability increases in abscisic acid – treated and cold acclimated differentiating vascular root tissues of wheat // *J. Plant Physiol.* – 2002. – V. 159. – P. 465–472.
60. Олиневич О.В. Физико-химическая организация цитоскелета и водный обмен озимой пшеницы при действии низких температур и абсцизовой кислоты: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Казань, 2001. – 23 с.
61. Хохлова Л.П., Олиневич О.В., Тараканова Н.Ю., Тимофеева О.А. Оризалин – индуцированные изменения водного статуса и цитоскелетные белки проростков озимой пшеницы при закаливании к холоду и действию АБК // *Физиология растений*. – 2004. – Т. 51. – С. 759–772.

62. Mizuta S., Kaneko M., Tsurumi S. Assembly of cortical microtubules during cold treatment of the coenocytic green alga, *Chaetomorpha moniligera* // *Planta*. – 1995. – V. 196. – P. 190–191.
63. Хохлова Л.П., Олиневич О.В., Тараканова Н.Ю., Тимофеева О.А., Воловник И.Л., Палих Э., Раудаскоски М. Цитоскелет-зависимые изменения водного статуса и морозоустойчивость разных генотипов озимой пшеницы // *Грани сотрудничества. К 10-летию соглашения о сотрудничестве между Казанским и Гиссенским университетами*. – Казань: Унипресс, 1999. – С. 275–298.
64. Войников В.К., Корытов М.В. Синтез стрессовых белков в проростках озимой пшеницы при закаливании к холоду // *Физиология растений*. – 1991. – Т. 38. – С. 960–969.
65. Akashi T., Kawasaki S., Shibaoka H. Stabilization of cortical microtubules by the cell wall in cultured tobacco cells // *Planta*. – 1990. – V. 182. – P. 363–369.
66. Cyr R.J., Palevitz B.A. Microtubule-binding proteins from carrot // *Planta*. – 1989. – V. 177. – P. 245–260.
67. Rutten T., Chan J., Lloyd C. A 60-kDa plant microtubule – associated protein promotes the growth and stabilization of neurotubules in vitro // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1997. – V. 94. – P. 4469–4474.
68. Durso N.A., Cyr R.J. A calmodulin-sensitive interaction between microtubules and a higher plant homolog of elongation factor 1 α // *Plant Cell*. – 1994. – V. 6. – P. 893–905.
69. Chang-Jie J., Sonobe S. Identification and preliminary characterization of a 65 kDa higher plant microtubule – associated protein // *J. Cell Sci*. – 1993. – V. 105. – P. 891–901.
70. Chan J., Rutten T., Lloyd C. Isolation of microtubule – associated proteins from carrot cytoskeleton: a 120 kDa map decorates all four microtubule arrays and the nucleus // *The Plant J*. – 1996. – V. 10. – P. 251–259.
71. Collings D.A., Wasteneys G.O., Miyazaki M., Williamson R.E. Elongation factor 1 α is a component of the subcortical actin bundles of characean algae // *Cell. Biol. Int*. – 1994. – V. 18. – P. 1019–1024.
72. Jiang C.G., Nakajima N., Kondo N. Disruption of microtubules by abscisic acid in guard cells of *Vicia faba* L. // *Plant and Cell Physiol*. – 1996. – V. 37. – P. 697–701.
73. Lopez I., Anthony R.G., Maciver S.K., Jiang C.L., Khan S., et al. Pollen specific expression of maize genes encoding actin depolymerizing factor like proteins // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1996. – V. 93. – P. 7415–7420.
74. Staiger C.J., Yuan M., Valenta R., Shaw P.J., Warn R., Lloyd C.W. Microinjected profilin affect cytoplasmic streaming in plant cells by rapidly depolymerizing actin microfilaments // *Curr. Biol*. – 1997. – V. 4. – P. 215–219.
75. Smertenko A.P., Jiang C.J., Simmons N.J., Weeds A.G., Davies D.R., Hussey P.J. Ser 6 in the maize actin – depolymerizing factor, Zm ADF3, is phosphorylated by a calcium – stimulated protein kinase and is essential for the control of functional activity // *Plant J*. – 1998. – V. 14. – P. 187–194.
76. Asada T., Collings D. Molecular motors in higher plants // *Trends Plant Sci*. – 1997. – V. 2. – P. 29–37.
77. Туркина М.В., Акатова Л.З. Термостабильные актин-связывающие белки из флоремы *Heracleum sosnowskyi* // *Физиология растений*. – 1994. – Т. 41. – С. 367–373.
78. Traas J.A. The plasma membrane – associated cytoskeleton // *The Plant Plasma Membrane*. – Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1990. – P. 270–292.

79. Pearce R.S., Willison J.H.M. A freeze-etch study of the effects of extracellular freezing on cellular membranes of wheat // *Planta*. – 1985. – V. 163, No 3. – P. 304–316.
80. Dugas C.M., Li Q., Khan I.A., Nothnagel E.A. Lateral diffusion in the plasma membrane of maize protoplast with implication for cell culture // *Planta*. – 1989. – V. 179. – P. 387–396.
81. Laporte K., Rossignol M., Traas J.A. Interaction of tubulin with the plasma membrane tubulin is present in purified plasmalemma and behaves as an integral membrane protein // *Planta*. – 1993. – V. 191. – P. 413–416.
82. Akashi T., Shibaoka H. Involvement of transmembrane proteins in the association of cortical microtubules with the plasma membrane in tobacco BY-2 cells // *J. Cell Sci.* – 1991. – V. 98. – P. 169–174.
83. Baluška F., Samaj J., Wojtaszek P., Volkmann D., Menzel D. Cytoskeleton-plasma membrane-cell wall continuum in plants. Emerging links revisited // *Plant Physiol.* – 2003. – V. 133, No 2. – P. 482–491.
84. Aström H. Acetylated α -tubulin in the pollen tube microtubules // *Cell Biology Inter. Reports*. – 1992. – V. 16. – P. 871–881.
85. Foissner I., Wasteneys G.O. Taxol stabilized microtubules in characean internodal cells but does not prevent their disassembly at wound sites // *Cell Biol. Inter.* – 1997. – V. 21. – P. 966–867.
86. Collings D.A., Wasteneys G.O., Williamson R.E. Actin-microtubule interactions in the alga *Nitella*: analysis of the mechanism by which microtubule depolymerization potentiates cytochalasins effects on streaming // *Protoplasma*. – 1996. – V. 191. – P. 178–190.
87. Tominaga M., Morita K., Sonobe S., Yokota E., Shimmen T. Microtubules regulate the organization of actin filaments at the cortical region in root hair cells of *Hydrocharis* // *Protoplasma*. – 1997. – V. 199. – P. 83–92.
88. Takesue K., Shibaoka H. The cyclic reorientation of cortical microtubules in epidermal cells of azuki bean epicotyls: the role of actin filaments in the progression of the cycle // *Planta*. – 1998. – V. 205. – P. 539–546.
89. Bokros C.L., Yugdahl J.D., Blumenthal S.S.D., Vorejohn L.C. Proteolytic analysis of polymerized maize tubulin: regulation of microtubule stability to low temperature and Ca^{2+} by the carboxyl terminus of β -tubulin // *Plant. Cell and Environment*. – 1996. – V. 19. – P. 539–548.
90. Ouellet F., Carpentier E. Regulation of a wheat actin-depolymerizing factor during cold acclimation // *Plant Physiol.* – 2001. – V. 125. – P. 360–368.
91. Joshi H.C., Cleveland D.W. Diversity among tubulin subunits: toward what functional end // *Cell Motil Cytoskeleton*. – 1990. – V. 16. – P. 156–163.
92. Danyluk J., Carpentier E., Sarhan F. Identification and characterization of a low temperature regulated gene encoding an actin-binding protein from wheat // *FESB Lett.* – 1996. – V. 389. – P. 324–327.
93. Iida K., Moriyama K., Matsumoto S., Kawasaki H., Nishida E., Yahara I. Isolation of a yeast essential gene, COF1, that encodes a homologue of mammalian cofilin, a low-M(r) actin-binding and depolymerizing protein // *Gene*. – 1993. – V. 124, No 1. – P. 115–120.
94. Thomashow M.F. So whats new in the field of plant cold acclimation? Lots! // *Plant Physiol.* – 2001. – V. 125. – P. 89–93.
95. Monroy A.F., Sarhan F., Dhindsa R.R. Cold-induced changes in freezing tolerance, protein phosphorylation, and gene expression. Evidence for a role of calcium // *Plant Physiol.* – 1993. – V. 102. – P. 1227–1235.

96. *Nick P.* Control of the response to low temperatures // *Plant Microtubules Potential for Biotechnology.* – 2000. – V. 8. – 209 p.
97. *Sangwan V., Örvär B.L., Beyerly J., Hirt H., Dhinsa R.* Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways // *The Plant J.* – 2002. – V. 31. – P. 629–638.
98. *Veisz O., Galiba G., Sutka J.* Effect of abscisic acid on the cold hardiness of wheat seedlings // *J. Plant Physiol.* – 1996. – V. 149. – P. 439–443.

Поступила в редакцию
09.02.06

Хохлова Людмила Петровна – доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой физиологии и биотехнологии растений Казанского государственного университета.

E-mail: Ludmila.Khokhlova@ksu.ru

Макарова Марина Валерьевна – кандидат биологических наук, научный сотрудник кафедры физиологии и биотехнологии растений Казанского государственного университета.