

УДК 576.3:57.042:581.43

Г.В. ШЕВЧЕНКО

Институт ботаники НАН Украины, Киев
E-mail: galina-shevchenko@yandex.ru

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ
МИКРОТРУБОЧЕК
И МИКРОФИЛАМЕНТОВ
В ДИСТАЛЬНОЙ ЗОНЕ РАСТЯЖЕНИЯ
КОРНЯ *ARABIDOPSIS THALIANA***



Исследования растений Arabidopsis thaliana – GFP-MAP4 и A. thaliana – GFP-ABD2 с применением ингибиторов полимеризации актина и тубулина показали, что стабильность клеточного роста в дистальной зоне растяжения корня обеспечивается в том числе и структурной взаимосвязью между микротрубочками и актиновыми филаментами. Опыты с клинотатированием и ингибиторный анализ впервые позволили установить, что в зоне растяжения корня сила тяжести является определяющей для взаимодействия между элементами цитоскелета.

© Г.В. ШЕВЧЕНКО, 2009

Введение. Элементы цитоскелета, такие как микротрубочки и актиновые филаменты, играют ключевую роль в процессах роста и развития растений. Считается, что микрофиламенты регулируют растяжение клеток, контролируя направленный экзоцитоз и встраивание везикул Гольджи в цитоплазматическую мембрану [1]. Микротрубочкам приписывают в основном механическую роль, которая заключается в обеспечении клеточной формы и стабилизации экзоцитозных треков из микрофиламентов в процессе роста клетки [2, 3]. Микротрубочки также поддерживают направленную ориентацию фибрилл целлюлозы в клеточной стенке [4].

Регулированная организация цитоскелета особенно важна для зоны растяжения корня, которая находится между меристемой и зоной дифференцировки. Различают дистальную (ДЗР) и центральную (ЦЗР) зоны растяжения. В ДЗР происходит смена типа роста клеток с почти диффузного (изотропного) на анизотропный [5]. Смена ростового типа клеток совпадает с изменением ориентации кортикальных микротрубочек. Так, в зоне меристемы, где рост клеток преимущественно изотропный, микротрубочки располагаются плотным слоем поперечно к главной оси корня. В клетках ДЗР они становятся косыми, а в центральной зоне растяжения, для которой характерен анизотропный рост, микротрубочки представлены продольными тяжами различной плотности. Микротрубочки в ДЗР способны изменять свою ориентацию в ответ на действие различных экзогенных факторов, среди которых механические нагрузки, окисление, потоки ауксина и т.д. [6, 7], что делает ДЗР своего рода индикатором влияния внешней среды. Известно, что нарушение организации микротрубочек сказывается на скорости роста клеток [8]. Изменение темпа роста в ДЗР имеет большое значение для всего растения, поскольку скорость, с которой клетки проходят ДЗР, определяет быстроту прохождения апекса корня через неблагоприятные для роста участки почвы [5].

Одним из внешних стимулов, способных изменять расположение кортикальных микротрубочек в ДЗР, является гравитация [9, 10]. Так, при гравистимуляции растения кортикальные микротрубочки на внутренней стороне изгиба в корне кукурузы меняют расположение из поперечного на продольное. Реориен-

тацию кортикальных микротрубочек наблюдали также в гравистимулированных колеоптилях кукурузы и гипокотилиях подсолнечника [11, 12].

Помимо классической реакции на гравистимуляцию, которая осуществляется перемещением статолитов в корневом чехлике, существуют доказательства наличия вторичного механизма гравичувствительности в корнях [13, 14]. Это наглядно демонстрируют опыты с клиностаტიрованием (искусственная реориентация растений относительно вектора силы тяжести). Установлено, что сайт восприятия гравитации находится в пределах ДЗР корня и, как предполагают, на него приходится около 2 % всей способности корня воспринимать гравитацию [13, 15].

Так, эксперименты в условиях симулированной микрогравитации выявили повышенную частоту встречаемости хаотически расположенных кортикальных микротрубочек в ДЗР *Beta vulgaris* [10] и гипокотилиях *Brassica napus* [16]. Опыты *in vitro* показали гравизависимость процесса полимеризации микротрубочек. Это дает основание предполагать, что микротрубочки и сами способны выполнять функцию гравирецептора клеток [17]. Все это доказывает, что структурные перестройки тубулинового цитоскелета являются одним из элементов гравичувствительности ДЗР.

Известно, что кортикальные микротрубочки расположены параллельно кортикальным микрофиламентам [1], что подразумевает возможные модификации сети актина во время гравизависимой реориентации микротрубочек. Несмотря на активное изучение структурно-функциональной организации отдельных элементов цитоскелета, лишь недавно проявился интерес к их совместному функционированию. Установлено, в частности, что стабильность кортикальных микрофиламентов зависит от интактных микротрубочек, а свойства актина регулируются условиями сборки микротрубочек [4, 18]. Регулирование микротрубочками перестроек актинового цитоскелета существенно для цитокинеза и установления клеточной полярности [19, 20]. На сегодняшний момент механизм взаимодействия элементов цитоскелета в процессах клеточного роста в ДЗР корня выяснен не в полной мере. Возможно, этому препятствуют труд-

ности, возникающие при фиксации клеток, которая неизбежно нарушает тонкую сеть актина. Не исключено, что симулированная микрогравитация вызывает лишь незначительные изменения организации актинового цитоскелета, трудно выявляемые микроскопией.

Для выяснения того, насколько организация микротрубочек в ДЗР зависит от микрофиламентов и как эта взаимосвязь влияет на ростовые процессы, мы использовали непрямой подход и исследовали каким образом деполимеризация микрофиламентов цитохалазином Д (ЦД) воздействует на организацию микротрубочек и размеры клеток в апексах *Arabidopsis thaliana*, а также как сказывается действие оризалина на расположение микрофиламентов. Поскольку взаимодействие элементов цитоскелета эволюционно формировалось под воздействием гравитации как постоянного стимула внешней среды, проведение эксперимента в условиях симулированной микрогравитации позволяет разделить реакцию микротрубочек и микрофиламентов на действие силы тяжести и установить влияние этого процесса на ростовые показатели корня.

В экспериментах использовали растения *Arabidopsis thaliana*, трансформированные конструкциями MAP4-GFP и ABD2-GFP, которые являются маркерами микротрубочек [21] и микрофиламентов [22] соответственно. Использование трансформированных растений позволило впервые наблюдать за структурной организацией микротрубочек и микрофиламентов в условиях клиностаტიрования *in vivo*. Результаты исследования обсуждаются в свете потенциального взаимодействия микротрубочек и микрофиламентов в процессах регулирования роста клеток в ДЗР корня.

Материал и методика. Использовали линию *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh экотип Columbia, трансформированную GFP-MAP4 (продукт слияния гена тубулина, ассоциированного с доменом гена животного белка MAP4, который связывается с микротрубочками, и гена зеленого флюоресцирующего белка GFP), а также *Arabidopsis thaliana* – ABD2-GFP (продукт слияния генов GFP и связывающегося с актином домена 2 (ABD2) белка фимбрина) [22].

Семена любезно предоставлены профессорами D. Volkmann и F. Baluška (Институт мо-

лекулярной ботаники при Университете г. Бонн, Германия). Семена стерилизовали в 50%-ном этаноле и 3%-ной перекиси водорода (1 мин), промывали в дистиллированной воде и высаживали в сахарные стаканчики ($r = 1$ см) на 1,2%-ный агар («Sigma», Co.). Стекланные стаканчики заворачивали в черную фотобумагу, образцы проращивали в условиях стационарного контроля и медленного клино-статирования (2 об/мин) 4–5 сут при $t = 22$ °C. В части экспериментов растения проращивали на фильтровальной бумаге, увлажненной дистиллированной водой. В обоих методах проращивания семян полученные результаты были идентичными.

За 6 ч перед просмотром образцов в среду роста вводили цитохалазин Д (10 мкМ) и оризалин (20 мкМ), ингибиторы полимеризации актина и тубулина.

Ингибиторы добавляли либо непосредственно в агар (50 мл), на который переносили проростки перед просмотром, либо в dH_2O (5 мл) для смачивания фильтровальной бумаги. Во всех случаях растворы ингибиторов покрывали весь корень. Отдельно для линий *Arabidopsis thaliana* – GFP-MAP4 и *Arabidopsis thaliana* – GFP-ABD2 проводили по шесть типов экспериментов: стационарный контроль, контроль + ЦД, контроль + оризалин, горизонтальное клино-статирование, клино-статирование + ЦД, клино-статирование + оризалин. Все эксперименты повторяли трехкратно. Параметры клеток измеряли на срединном микроскопическом срезе главного корня, в дистальной зоне растяжения. Статистические данные обрабатывали при помощи программы Origin 6.1 (t-test).

Для просмотра в конфокальном микроскопе проростки размещали на предметном стекле в среде роста (агар или dH_2O). Клино-статированные растения просматривали непосредственно после снятия с клино-стата.

Образцы исследовали при помощи конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM5 Pascal («Zeiss», Германия) с апертурой 40× и линзами 1,25. Выход флуоресценции в области 488 нм и сбор флуоресценции в 500–600 нм.

Результаты исследований. Организация микротрубочек в зоне растяжения корня. Дистальная

зона растяжения корня, которая у *Arabidopsis* – GFP-MAP4 находится на расстоянии $\sim 143,58 \pm 2,24$ мкм от верхушки корня, в районе между меристемой и зоной быстрого удлинения клеток, характеризуется более или менее диффузным (изотропным) ростом, из-за чего клетки имеют близкую к квадратной форму. В ЦЗР ($201,75 \pm 4,89$ мкм от верхушки корня) клетки удлиняются преимущественно в одном направлении – растут анизотропно [23].

В ДЗР как контрольных, так и клино-статированных корней во всех тканях регистрировали кортикальные и эндоплазматические микротрубочки. Последние представлены сетью отдельных микротрубочек и их пучков различной плотности, радиально расходящихся от области ядра к клеточной периферии.

Кортикальные микротрубочки в меристеме представлены плотными тяжами, расположенными перпендикулярно к продольной оси главного корня (рис. 1). В проксимальной части ДЗР начинают встречаться косые микротрубочки, а в центральной зоне растяжения кортикальные микротрубочки располагаются продольными тяжами различной плотности (рис. 1, а). Различия в расположении кортикальных микротрубочек между контрольными и клино-статированными образцами не выявлены (рис. 1, б).

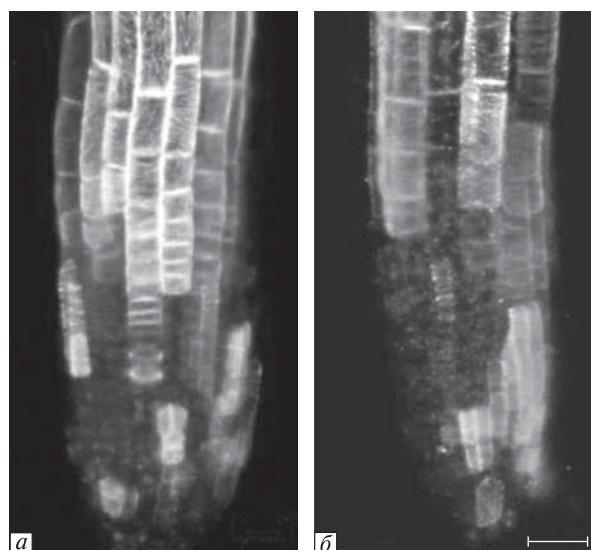


Рис. 1. Организация микротрубочек в апексе корней *Arabidopsis* – GFP-MAP4 в контроле (а) и при клино-статировании (б). Масштаб – 20 мкм

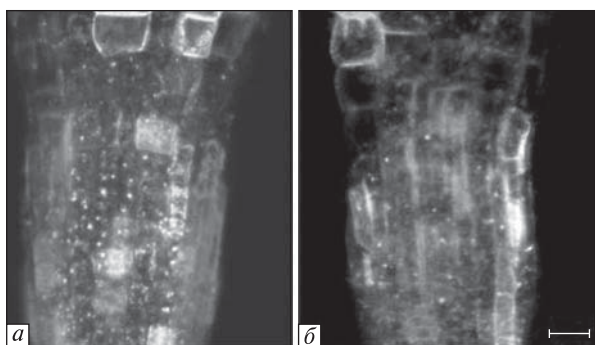


Рис. 2. Организация микротрубочек в корнях *Arabidopsis* – GFP-MAP4 после обработки цитохалазином Д в контроле (а) и при клиностатации (б). Масштаб – 20 мкм

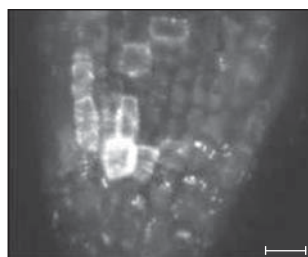


Рис. 3. Организация микротрубочек в корне *Arabidopsis* – GFP-MAP4 после обработки оризалином. Масштаб – 20 мкм

Организация микротрубочек в зоне растяжения корня после разрушения микрофиламентов. Разрушения микрофиламентов ЦД сказывались в частичном нарушении организации микротрубочек. Во всех тканях корня на уровне меристемы и ДЗР появлялись неупорядоченные яркие кластеры (рис. 2, а).

Подобные образования обнаруживали в корнях *Arabidopsis* после обработки оризалином (рис. 3) и листьях гороха, трансформированных GFP-MAP4, которые обработали другим антитубулиновым агентом – гербицидом ампифосметилом [21]. В связи с этим предполагается, что кластеры представляют собой фрагменты разрушенных микротрубочек.

Степень разрушения микротрубочек прогрессирующе понижалась с продвижением из меристемы в ДЗР и ЦЗР. В ЦЗР в основном наблюдали несущественные нарушения организации микротрубочек (рис. 2, а). В клиностазируемых корнях встречались аналогичные фрагменты микротрубочек, но их количество в меристеме и ДЗР было значительно ниже, чем в контроле (рис. 2, б). Измерения параметров клеток в ДЗР корня показали, что при действии

цитохалазина Д размеры клеток существенно не меняются, но наблюдается некоторая вариабельность их длины и ширины (табл. 1). Наоборот, применение ЦД в условиях клиностатации не вызывало большой разницы в размерах клеток.

Организация микрофиламентов в зоне растяжения корня после разрушения микротрубочек. После обработки проростков *A. thaliana* оризалином частично нарушалась организация микрофиламентов, в основном в ДЗР корня (рис. 4, б). Тяжи микрофиламентов становились тоньше. В некоторых случаях наблюдали точечные скопления актина, хаотично размещенные по всем тканям корня в ДЗР. Актин аккумулировался возле клеточной стенки. После разрушения микротрубочек среди всех тканей корня меристема и ЦЗР были менее всего подвержены изменениям.

Не наблюдали существенной разницы в степени нарушения организации микротрубочек между корнями контрольных и клиностазируемых растений (рис. 4, в), не изменялись и их размеры (табл. 2). При применении цитохалазина Д параметры клеток характеризуются большей вариабельностью. В целом же в условиях клиностатации параметры клеток корня более равномерные.

Обсуждение полученных данных. *Роль микротрубочек и микрофиламентов в ростовых процессах в зоне растяжения корня.* Нарушение организации кортикальных микротрубочек в меристеме и ДЗР корня после разрушения микрофиламентов предполагает, что последние вносят свой вклад в стабилизацию образований тубулинового цитоскелета в процессе дифференциального роста клеток.

Структурное взаимодействие между актиновым и тубулиновым компонентами цитоскелета было известно и ранее. Так, в экспериментах на нитях хлопка показано, что разрушение микрофиламентов приводит к реориентации микротрубочек, а разрушение микрофиламентов в эпидермисе плодов бобовых модифицировало циклическую ориентацию кортикальных микротрубочек [2, 24, 25].

Наши эксперименты впервые показывают зависимость взаимодействия между элементами цитоскелета от зоны роста корня. Тот факт, что точечные скопления фрагментов микро-

трубочек наблюдали, в первую очередь, в клетках меристемы и ДЗР и не обнаруживали в клетках ЦЗР, свидетельствует о том, что структурная взаимосвязь микротрубочек и микрофиламентов выполняет существенную функцию в клетках с диффузным ростом (изотропным) и менее важна для ДЗР, где рост клеток начинает меняться на анизотропный. Это дает основание предполагать, что связь между микротрубочками и микрофиламентами зависит от типа роста клетки. Поскольку в ЦЗР почти не обнаруживали поврежденных микротрубочек, предположительно, взаимодействие между элементами цитоскелета здесь носит иной характер, чем в ДЗР.

Измерения параметров роста показывают, что разрушение как микрофиламентов, так и микротрубочек хотя и нарушает организацию цитоскелета, существенно не влияет на размеры клеток. Замечено, что при разрушении микрофиламентов параметры клеток более вариабельны как в контроле, так и при клиностаиировании. Предполагается, что при смене ростового типа клеток происходит реорганизация актинового цитоскелета. Так, динамическая сеть F-актина играет основную роль в процессе выроста почки корневого волоска при трансформации диффузного роста трихобласта эпидермиса в верхушечный/полярный рост волоска. Процесс формирования корневого волоска включает в себя не только смену клеточной полярности, но и изменения организации цитоскелета [26]. Развитие клеток в пределах ДЗР и последующая смена их полярности в некоторой мере сходны с развитием клеток растений с верхушечным ростом, в частности, с корневыми волосками. Поэтому не исключается, что различная организация микрофиламентов определяет смену типа роста клеток в ДЗР. В связи с этим логично предположить, что изменение структурной организации микрофиламентов способствует изменению типа роста в ДЗР и переходу клеток в ЦЗР. Это предположение подтверждается экспериментами, в которых нарушения актин-миозинового цитоскелета увеличивало количество клеток в пределах ДЗР [5]. Как известно, микротрубочки при смене типа роста клеток также меняют свою ориентацию, и существуют данные о том, что длительное отсутствие корти-

Таблица 1
Параметры клеток в дистальной зоне растяжения корней *A. thaliana*–MAP4, обработанных цитохалазином и оризалином

Параметры клеток, мкм	Контроль	Клиностаат
Высота	14,37 ± 0,51	14,06 ± 0,40
Ширина	14,42 ± 0,31	14,11 ± 0,30
Обработка цитохалазином Д		
Высота	17,33 ± 0,86	15,04 ± 0,72
Ширина	17,34 ± 0,94	14,6 ± 0,53
Обработка оризалином		
Высота	14,41 ± 0,64	16,42 ± 0,92
Ширина	14,09 ± 0,69	15,65 ± 0,54

Примечание. Статистически вероятная разница между вариантами: контроль – контроль + ЦД, контроль + ЦД – клиностаат + ЦД, клиностаат – клиностаат + оризалин, $P < 0,05$ ($n = 34$).

Таблица 2
Параметры клеток в дистальной зоне растяжения корней *A. thaliana*–ABD2, обработанных цитохалазином и оризалином

Параметры клеток, мкм	Контроль	Клиностаат
Высота	14,32 ± 0,37	14,62 ± 0,39
Ширина	15,02 ± 0,38	14,58 ± 0,31
Обработка цитохалазином Д		
Высота	12,31 ± 0,21	13,97 ± 0,30
Ширина	13,08 ± 0,31	14,57 ± 0,32
Обработка оризалином		
Высота	13,47 ± 0,42	13,13 ± 0,29
Ширина	13,74 ± 0,38	13,93 ± 0,29

Примечание. Статистически вероятная разница между вариантами: контроль + ЦД – клиностаат + ЦД, $P < 0,05$ ($n = 34$).

кальных микротрубочек в клетках корня препятствует любому анизотропному росту и, в целом, задерживает морфогенез растения [27]. Основываясь на этих наблюдениях трудно предположить, какой из элементов цитоскелета играет большую роль в трансформации роста клеток из диффузного в анизотропный, но очевидно, что для этого процесса важно взаимное функционирование микротрубочек и микрофиламентов.

Взаимное расположение и функционирование кортикальных микротрубочек и микрофи-

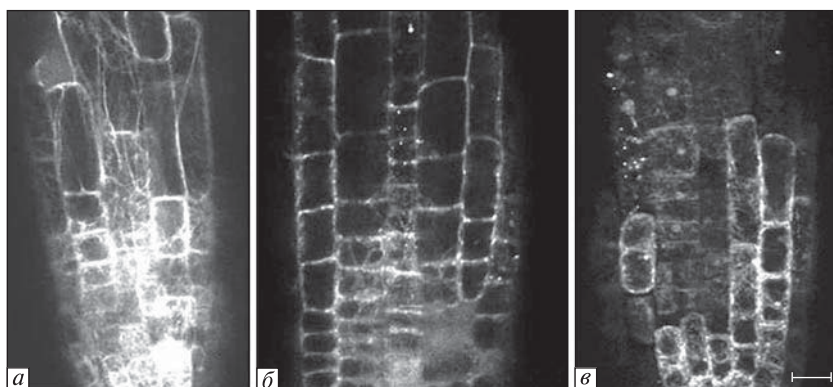


Рис. 4. Организация микрофиламентов в корнях *Arabidopsis* – GFP-ABD2 в контроле (а), после обработки оризалином в контроле (б), после обработки оризалином при клиностатации (в). Масштаб – 10 мкм

ламентов [1] подразумевает взаимодействие между ними [2]. Взаимодействие динамических растущих микротрубочек с микрофиламентами, их взаимное регулирование и участие в процессах морфогенеза описаны для целого ряда клеток животных и дрожжей [28]. У растений выявлены отдельные элементы этого процесса. Проведенные эксперименты не дают ответ на вопрос, каким образом осуществляется взаимодействие между элементами цитоскелета в ДЗР. Однако известно, что микрофиламенты могут связываться с микротрубочками непосредственно [2], например при помощи белка миозина (миозин X и миозин II) [29]. Между элементами цитоскелета существуют и опосредованные связи – через сигнальные пути, контролируемые ROP-GTPазами и RAB-подобными GTPазами [30]. Известно, что плюс-конец микротрубочек несет множество факторов, регулирующих функционирование актина, среди которых – регуляторы белков форминов (семейство tea), активаторы ROP-GTPаз, миозин (II, V), белки которые, связывают микротрубочки и везикулы, содержащие фосфолипиды [31]. В то время как некоторые из этих факторов способствуют сборке актина и его сокращаемости, другие, наоборот, снижают активность актинового цитоскелета. ROP и RAB-подобные GTPазы определяют места и длительность перестроек актинового цитоскелета и цитоплазматической мембраны. ROP-GTPазы также регулируют стабильность микротрубочек. ROP-GTPазы при смене типа роста в неспециализированных клетках эпидермиса листа *A. thaliana* обеспечивают полимеризацию и переориентацию микротрубочек [32]. Регуляторы форминов, которые обеспечивают

полимеризацию актина, доставляются микротрубочками в область клеточного кортекса, где, как считают, и происходит сбор тяжелой микрофиламентов. Одна из функций регуляторов форминов состоит в контроле поляризации клетки [33]. Известно, что активированные ROP-GTPазы привлекают формины и инициируют полимеризацию актина вокруг эндосом, а также обеспечивают ассоциацию последних с субкортикальными тяжами микрофиламентов [34]. RAB-GTPазы в клетках животных способствуют интернализации интегринов и их передвижению в эндосомах по микрофиламентам [35]. Не исключено, что их аналоги в клетках растений также могут обеспечивать аналогичное передвижение эндосом, что необходимо для контроля динамики мембраны в процессе роста клеток. Установлено, что стабилизация микротрубочек способствует актин-опосредованной поляризации, направленной на дальнейшую стабилизацию микротрубочек [31].

Регуляция роста в ДЗР при клиностатации. При клиностатации степень нарушения структурной организации микротрубочек после разрушения микрофиламентов была приблизительно одинаковой во всех зонах корня и значительно ниже, чем в контроле. Примечателен тот факт, что использование ЦД и оризалина на клиносталируемых образцах существенно не влияло на размеры клеток, хотя и приводило к их некоторой вариабельности в случае с цитохалазином.

Изучение растений, выращенных на двухмерных клинотатах, показало увеличение частоты хаотично ориентированных микротрубочек в эпидермальных тканях в зоне растяже-

ния корня [10, 16]. Поскольку кортикальные микротрубочки ограничивают рост клеток [27], логично было бы ожидать сопутствующие изменения размеров клеток и дискоординацию роста. Однако мы не выявили существенных изменений параметров клеток в ДЗР. Единственным отличием клеток в этой зоне при клиностаировании была повышенная встречаемость волнистых клеточных стенок [36]. Они, возможно, и образуются вследствие частичного нарушения организации микротрубочек, контролирующей расположение целлюлозных фибрилл. Как показали наши предыдущие эксперименты, при клиностаировании в ДЗР наблюдается повышение плотности актинового цитоскелета [36], что может быть направлено на частичное структурное замещение дезориентированных микротрубочек. Структурная связь между элементами цитоскелета предполагает их совместное функционирование. Так, микрофиламенты способны организовывать целлюлозные фибриллы клеточной стенки, что подтверждают исследования морфогенеза клеточной стенки бурых водорослей [28]. Возможно, что повышение плотности актина при клиностаировании стабилизирует рост через регулирование процессов эндо/экзоцитоза, которые выполняют в клетке двойную функцию: обеспечивают прирост мембраны при растяжении и контролируют сам процесс растяжения клетки. Помимо этого, F-актин способен регулировать растяжение мембраны путем перехода от экзоцитоза к эндоцитозу [30]. Так, при экзоцитозе в яйцах *Xenopus* F-актин быстро аккумулируется вокруг секреторных везикул, которые сливаются с мембраной, тем самым предполагая участие динамичного обрамления из актина в закрытии мембранных пор выхода везикул. Считается, что функцией актина может быть стабилизация секреторных компартментов при соприкосновении везикул с плазматической мембраной и обеспечение компенсаторного эндоцитоза [30].

Поиски показали (база NCBI <http://www.ncbi.org>), что растения содержат белки, участвующие в регулировании эндо/экзоцитоза. Так, семейство белков комплекса WAVE регулирует активность комплекса Agr2/3 и связывает полимеризацию актина с процессами эн-

доцитоза [37]. У растений выявлен также белок Eho70, который непосредственно присоединяется к комплексу Agr2/3 и способствует экзоцитозу, т.е. накоплению везикул в примембранном пространстве и их слиянию с мембраной. Активность Eho70 также регулируется ROP-GTPазами [31].

Возможно, что при клиностаировании взаимодействие микротрубочек и микрофиламентов определяется вариабельностью популяции актина. Нельзя исключить тот факт, что в условиях клиностаирования происходит экспрессия определенных изоформ актина, которые придают ей большую динамичность. Мы сделали такое предположение, основываясь на данных молекулярно-генетического подхода, который показал, что нокаут изоформы актина ACT7 у *Arabidopsis* не сказывался на гравитропизме растений, в то время как другие параметры развития корня были нарушены [38]. Возможно также, что при клиностаировании повышается экспрессия многих актинсвязывающих белков, которые в общем и обеспечивают высокую динамичность цитоскелета в данных условиях.

Компенсаторная активность известна и для микротрубочек, которые могут влиять на актиновый цитоскелет посредством участия в транспорте везикул и организации цитоплазматической мембраны. Помимо микрофиламентов, экзоцитозные везикулы могут присоединяться и к микротрубочкам. С везикулами на мембрану доставляются компоненты, регулирующие ее свойства. В частности, компоненты фосфатидилинозитольного сигнального пути (ПИП2) и диацилглицерол могут способствовать образованию местного градиента липидов, который влияет на организацию актина через активацию Agr2/3 – N-WAVE сигнального пути [31]. В целом же в условиях клиностаирования ограничение роста на фоне разрушения компонентов цитоскелета действует более эффективно, и это предполагает существование скрытого механизма регуляции роста, который включает в себя структурное взаимодействие микротрубочек и микрофиламентов в ДЗР. Регуляторное взаимодействие между микротрубочками и микрофиламентами наблюдается у всех клеток растений, и применение клиностаирования позволяет выявить

этот механизм, так как обнаружение взаимосвязи между элементами цитоскелета всегда требует специфических экспериментальных условий [24]. Поскольку механизм координации роста сформировался эволюционно и обеспечивает пластичность растений в условиях Земли, в норме он скрыт и замаскирован постоянным действием g-вектора, а обнаруживается только тогда, когда действие g-вектора элиминируется. Аналогичный механизм, скрытый на Земле, наблюдался у мхов *Ceratodon purpureus*, *Physcomitrella patens* и *Pottia intermedia*, протонема которых в условиях микрогравитации начинала расти спиралеобразно [40, 41] при направленном росте на Земле.

Таким образом, наши эксперименты впервые показали, что структурное взаимодействие между микротрубочками и микрофиламентами в дистальной зоне растяжения корня зависит от типа роста клеток и определяется действием силы тяжести.

G.V. Shevchenko

INTERRELATION OF MICROTUBULES AND MICROFILAMENTS IN THE DISTAL ELONGATION ZONE OF *ARABIDOPSIS THALIANA* ROOT

Investigations on *Arabidopsis thaliana* – GFP-MAP4 and *A. thaliana* – GFP-ABD2 plants treated with tubulin and actin inhibitors has shown that stability of cell growth in the distal elongation zone of plant root is achieved by structural interrelation of microtubules and microfilaments. Use of clinorotation and application of inhibitor analysis allowed us to show that gravity force defines the type of such interrelation.

Г.В. Шевченко

ВЗАЄМОДІЯ МІЖ МІКРОТРУБОЧКАМИ ТА МІКРОФІЛАМЕНТАМИ У ДИСТАЛЬНІЙ ЗОНІ РОЗТЯГУ КОРЕНЯ *ARABIDOPSIS THALIANA*

Дослідження рослин *Arabidopsis thaliana* – GFP-MAP4 і *A. thaliana* – GFP-ABD2 із застосуванням інгібіторів полімеризації актину і тубуліну показали, що стабільність клітинного росту в дистальній зоні розтягу кореня забезпечується структурною взаємодією між микротрубочками і мікрофіламентами. Досліди із кліностакуванням і інгібіторний аналіз вперше дозволили встановити, що у зоні розтягу кореня сила тяжіння визначає взаємодію між елементами цитоскелету.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Blancaflor E.B.* Cortical actin filaments potentially interact with cortical microtubules in regulating polari-

ty of cell expansion in primary roots of maize (*Zea mays* L.) // *J. Plant Growth Regul.* – 2000. – **19**. – P. 406–414.

2. *Collings D., Allen N.* Cortical actin interacts with the plasma membrane and microtubules // *Actin: a dynamic framework for multiple plant cell functions.* – Dordrecht : Kluwer Acad. Publ., 2000. – 145 p.
3. *Gu Y., Wang Z., Yang Z.* ROP/RAC GTPase: an old new master regulator for plant signaling // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2004. – **7**. – P. 527–536.
4. *Wasteneys G., Galway M.* Remodeling the cytoskeleton for growth and form: an overview with some new views // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2003. – **54**. – P. 691–722.
5. *Baluška F., Volkmann D., Barlow P.* A polarity crossroad in the transition growth zone of maize root apices: cytoskeletal and developmental implications // *J. Plant Growth Regul.* – 2001. – **20**. – P. 170–181.
6. *Blancaflor E.B.* The cytoskeleton and gravitropism in higher plants // *J. Plant Growth Regul.* – 2002. – **21**. – P. 120–136.
7. *Mancuso S., Boselli M.* Characterization of the oxygen fluxes in the division, elongation and mature zones of *Vitis* roots: influence of oxygen availability // *Planta.* – 2002. – **214**. – P. 767–779.
8. *Wymer C., Wymer S., Cosgrove D., Cyr R.* Plant cell growth responds to external forces and the response requires intact microtubules // *Plant Physiol.* – 1996. – **110**. – P. 425–430.
9. *Fischer K., Schopfer P.* Physical strain-mediated microtubule reorientation in the epidermis of gravitropically or phototropically stimulated maize coleoptiles // *Plant J.* – 1998. – **15**. – P. 119–123.
10. *Shevchenko G.* Patterns of cortical microtubules formed in epidermis of *Beta vulgaris* roots under clinorotation // *Adv. Space Res.* – 1999. – **24**. – P. 739–742.
11. *Blancaflor E., Hasenstein K.* Organization of cortical microtubules in graviresponding maize roots // *Planta.* – 1993. – **191**. – P. 231–242.
12. *Himmelspach R., Wymer C., Lloyd C., Nick P.* Gravity-induced reorientation of cortical microtubules observed in vivo // *Plant J.* – 1999. – **18**. – P. 449–453.
13. *Wolverton C., Mullen J., Ishikawa H., Evans M.* Root gravitropism in response to a signal originating outside of the cap // *Planta.* – 2002. – **215**. – P. 153–157.
14. *LaMotte C., Pickard B.* Control of gravitropic orientation II. Dual receptor model for gravitropism // *Funct. Plant Biol.* – 2004. – **31**. – P. 109–120.
15. *Perrin R., Young L-S., Murthy N., Harrison B., Wang Y., Will J., Masson R.* Gravity signal transduction in primary roots // *Ann. Bot.* – 2005. – **96**. – P. 737–743.
16. *Skagen E., Iversen T.* Simulated weightlessness and hyper-g results in opposite effects on the regeneration of the cortical microtubule array in protoplasts from *Brassica napus* hypocotyls // *Physiol. Plant.* – 1999. – **106**. – P. 318–325.

17. Papaseit C., Pochon N., Tabony J. Microtubule self-organization is gravity-dependent // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 2000. — **97**. — P. 8364–8368.
18. Foissner I., Wasteneys G. Microtubule disassembly enhances reversible cytochalasin-dependent disruption of actin bundles in characean internodes // Protoplasma. — 2000. — **214**. — P. 33–44.
19. Gundersen G.G., Gomes E.R., Wen Y. Cortical control of microtubule stability and polarization // Curr. Opin. Cell Biol. — 2004. — **16**. — P. 106–112.
20. Bannigan A., Baskin T. Directional cell expansion — turning toward actin // Curr. Opin. Plant Biol. — 2005. — **8**. — P. 619–624.
21. Marc J., Granger Ch., Brincat J. et al. A GFP-MAP4 reporter gene for visualizing cortical microtubule rearrangements in living epidermal cells // Plant Cell. — 1998. — **10**. — P. 1927–1939.
22. Wang Y.S., Yoo C.M., Blancaflor E.B. Improved imaging of actin filaments in transgenic *Arabidopsis* plants expressing a green fluorescent protein fusion to the C- and N-termini of the fimbrin actin-binding domain 2 // New Phytologist. — 2008. — **177**. — P. 525–536.
23. Ishikawa H., Evans M. The role of the distal elongation zone in the response of maize root to auxin and gravity // Plant Physiol. — 1993. — **102**. — P. 1203–1210.
24. Collings D., Lill A., Himmelspach R., Wasteneys G. Hypersensitivity to cytoskeletal antagonists demonstrates microtubule-microfilament cross-talk in the control of root elongation in *Arabidopsis thaliana* // New Phytologist. — 2006. — **170**. — P. 275–290.
25. Bannigan A., Wiedemeier A., Williamson R. et al. Cortical microtubule arrays lose uniform alignment between cells and are oryzalin resistant in the *Arabidopsis* mutant, radially swollen 6 // Plant Cell Physiol. — 2006. — **47**. — P. 949–958.
26. Balu ka F., Salaj J., Mathur J. et al. Root hair formation: F-actin dependent tip growth is initiated by local assembly profiling-supported F-actin meshworks accumulated within expansin-enriched bulges // Dev. Biol. — 2000. — **227**. — P. 618–632.
27. Haseñstein K., Blancaflor E., Lee J. The microtubule cytoskeleton does not integrate auxin transport and gravitropism in maize roots // Physiol. Plant. — 1999. — **105**. — P. 729–738.
28. Katsaros Ch., Karyophyllis D., Gallatis B. Cytoskeleton and morphogenesis // Ann. Bot. — 2006. — **97**. — P. 679–693.
29. Paredes A.R., Somerville C.R., Ehrhardt D.W. Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules // Science. — 2006. — **312**. — P. 1491–1495.
30. Lancetti L. Actin in membrane trafficking // Curr. Opin. Cell Biol. — 2007. — **19**. — P. 453–458.
31. Basu R., Chang F. Shaping the actin cytoskeleton using microtubule tips // Curr. Opin. Cell Biol. — 2007. — **19**. — P. 88–94.
32. Fu Y., Gu Y., Zheung Z., Wasteneys G., Yang Z. *Arabidopsis* interdigitating cell growth requires two antagonistic pathways with opposing action on cell morphogenesis // Cell. — 2005. — **120**. — P. 687–700.
33. Martin S.G., McDonald W.H., Yates J.R. III, Chang F. Tea4p links microtubule plus ends with the forming for3p in the establishment of cell polarity // Dev. Cell. — 2005. — **8**. — P. 479–491.
34. Wallar B.J., Deward A.D., Resau J.H., Alberts A.S. RhoB and the mammalian Diaphanous-related formin mDia2 in endosome trafficking // Exp. Cell Res. — 2007. — **313**. — P. 560–571.
35. Pellinen T., Ivaska J. Integrin traffic // J. Cell Sci. — 2006. — **119**. — P. 3723–3731.
36. Shevchenko G., Kordyum E. Organization of cytoskeleton during differentiation of gravisensitive root sites under clinorotation // Adv. Space Res. — 2005. — **35**. — P. 289–295.
37. Suetsugu S., Yamazaki D., Kurisu S., Takenawa T. Differential roles of WAVE1 and WAVE2 in dorsal and peripheral ruffle formation for fibroblast cell migration // Dev. Cell. — 2003. — **5**. — P. 595–609.
38. Gilliard L., Pawloski L., Kandasamy M., Meagher R. *Arabidopsis* actin gene ACT7 plays an essential role in germination and root growth // Plant J. — 2003. — **33**. — P. 319–328.
39. Demkiv O.T., Kordyum E.L., Kardash O.R., Khorkavtsiv O.Ya. Gravitropism and phototropism in protonemata of the moss *Pohlia nutans* (Hedw.) Lindb // Adv. Space Res. — 1999. — **23**. — P. 1999–2004.
40. Demkiv O.T., Khorkavtsiv O.Ya., Pundiak O.I. Changes of protonemal cell growth related to cytoskeleton organization // Cell Biol. Intern. — 2003. — P. 187–189.

Поступила 27.06.08

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

ДЗР — дистальная зона растяжения корня

ЦЗР — центральная зона растяжения

ЦД — цитохалазин Д

МАР — белок, ассоциированный с микротрубочками (microtubule associated protein)

ABD — домен, связывающийся с актином (actin-binding domain),

GFP — зеленый флуоресцирующий белок (green fluorescent protein)