



Molekularne podstawy odpowiedzi roślin na niską temperaturę

Beata Kmieć, Robert Drynda, Magdalena Wołoszyńska
Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Wrocławski,
Wrocław

Molecular basics of plant response to low temperature

Summary

Low temperature, drought and high salinity are common stress conditions that lead to similar plant cell responses. Although, in this paper, we focus on cold stress, it has to be underlined that most of the response mechanisms triggered by cold are not restricted only to this abiotic factor. We describe molecular level of plant acclimation to low temperature, including up- and down regulated genes as well as signal transduction pathway. The gene mutations that affect the ability of a plant to acclimate, as well as the methods allowing to identify genes involved in response to cold stress, are presented in this review.

Key words:

cold stress, acclimation, plant gene expression, signal transduction pathway.

1. Wstęp

Rośliny, jako niezdolne do przemieszczania się, a zatem skazane na ciągłe zmiany środowiska, zdołały rozwinąć złożone mechanizmy, służące utrzymaniu homeostazy. Abiotyczne czynniki stresogenne: niedobór wody, ekstremalne temperatury lub zbyt wysokie zasolenie, wywołują podobne efekty, takie jak uszkodzenie tkanki oraz „stresy wtórne” – osmotyczny i oksydacyjny (1).

Percepcja bodźca wyzwała kaskadę reakcji, której końcowym etapem jest ekspresja genów odpowiedzi na stres. Produkty tych genów można podzielić na dwie podstawowe grupy: 1) te, które

Adres do korespondencji

Beata Kmieć,
Instytut Biochemii
i Biologii Molekularnej,
Uniwersytet Wrocławski,
ul. Przybyszewskiego 63/77,
51-148 Wrocław;
e-mail:
Magdalena.Woloszynska@
ibmb.uni.wroc.pl

bezpośrednio chronią przed dehydratacją (np. enzymy związane z biosyntezą osmoprotektantów i przeciwutleniaczy, białka późnej embriogenezy, białka chroniące przed zamarzaniem oraz białka opiekuńcze); 2) czynniki transkrypcyjne, kinazy białkowe i enzymy związane z metabolizmem fosfatydyloinozytolu (2). Należy również pamiętać, że w odpowiedzi na czynnik stresowy może dojść nie tylko do wzrostu ekspresji genów, ale również do obniżenia ekspresji niektórych genów (3). Ze względu na to, że wymienione czynniki abiotyczne wywierają podobny efekt w postaci stresu wtórnego, aktywują podobne mechanizmy w komórce. Dlatego też, choć praca ta poświęcona jest zmianom wywołanym przez czynnik niskiej temperatury, należy pamiętać o tym, że niektóre mechanizmy, które zostaną opisane nie są specyficzne dla tego czynnika stresowego.

2. Stres wywołany niską temperaturą

Opisując wpływ obniżonej temperatury na rośliny używa się często ogólnego terminu stres chłodu, należy jednak podkreślić istotne rozróżnienie na stres wywołany chłodem i mrozem (4). Temperatury dodatnie niższe niż 12°C, powodują stres chłodu, natomiast temperatury ujemne wywołują stres zamarzania. Za wrażliwe na chłód uważa się te rośliny, które mogą ulegać nieodwracalnym uszkodzeniom już w temperaturach niższych niż 12°C (4). Rośliny tolerujące chłód, ale wrażliwe na zamarzanie giną dopiero, gdy temperatura spada poniżej zera. Istnieją wreszcie rośliny odporne na zamarzanie mogące przetrwać nawet mrozy sięgające -30°C (5). Negatywne działanie obniżonej temperatury obejmuje zarówno zmiany właściwości błon biologicznych, jak i oddziaływań pomiędzy makrocząsteczkami, co prowadzi do zaburzeń reakcji enzymatycznych (5). Stres chłodu jest bezpośrednim wynikiem oddziaływania niskiej temperatury na komórki, natomiast zamarzanie może wywoływać uszkodzenia w sposób pośredni. Tworzenie się lodu w przestrzeni pozakomórkowej prowadzi do odwodnienia komórek i rozrywania tkanek. W skrajnych przypadkach lód pojawia się wewnątrz komórek powodując ich śmierć (4). Zamarzanie wody uszkadza błony komórkowe, wywołuje denaturację białek i produkcję reaktywnych form tlenu (5). Roślina może przygotować się do obrony przed stresem w procesie aklimatyzacji do niskiej temperatury. Aklimatyzacja to nabywanie tolerancji na działanie obniżonej temperatury i zamarzanie w wyniku wcześniejszej ekspozycji na niską, ale utrzymującą się powyżej zera, temperaturę.

3. Geny uczestniczące w aklimatyzacji

Od niemal dwudziestu lat wiadomo, że aklimatyzacja roślin do niskiej temperatury jest następstwem zmian w transkrypcji genów (6). Od tego czasu zidentyfikowano wiele genów, które biorą udział w odpowiedzi roślin na chłód i zamarzanie

wody. Ostatnio ich liczba rośnie szczególnie szybko dzięki zastosowaniu najnowszych metod pozwalających na analizę transkryptomów i proteomów roślinnych na dużą skalę (7-9). W większości prac eksperymentalnych, których wyniki cytujemy, zmiany w ekspresji genów wywołane chłodem badano eksponując rośliny na temperaturę 4°C. W badaniach nad aklimatyzacją roślin wykorzystywano temperatury 2-6°C.

3.1. Geny, których produkty bezpośrednio chronią przed dehydratacją

Grupę czynników bezpośrednio zaangażowanych w ochronę przed skutkami niskiej temperatury stanowią białka modelujące właściwości błon, akumulacji osmoprotektantów oraz białka opiekuńcze.

3.1.1. Geny, których produkty wpływają na błony biologiczne

Rośliny mogą osiągnąć większą tolerancję na niską temperaturę przez zmianę składu lipidów błonowych zapobiegającą zmniejszeniu płynności błony cytoplazmatycznej. O tym, że rośliny, wykorzystują tę strategię, świadczy indukowana niską temperaturą akumulacja transkryptów genów desaturaz kwasów tłuszczowych *FAD8* (10) i *ADS2* u *Arabidopsis thaliana* (11). W zwiększeniu tolerancji na temperaturę <0°C biorą udział białka należące do lektyn, wykazujących powinowactwo do cukrów. Ustalono, że lektyny stabilizują błony, wiążąc się do galaktolipidów błony tylakoidów. Wiązanie to jest stabilizowane przez dodatkowe hydrofobowe oddziaływanie lektyn z błoną. Lektyny zmniejszają w ten sposób płynność błony i zapobiegają wypływowi substancji rozpuszczalnych. W konsekwencji nie dochodzi do pęknięcia chloroplastów spowodowanego szokiem osmotycznym (12). Swoją rolę w stabilizacji błony mają białka należące do transporterów lipidów, LTPs (*lipid transfer proteins*). Wykazano zwiększoną indukcję genów tych białek w odpowiedzi na obniżenie temperatury i zwiększenie zasolenia (12). Niektóre z transporterów LTPs indukowanych pod wpływem obniżenia temperatury odznaczają się sekwencją homologiczną do 1,3-glukanazy. Ona także została zakwalifikowana do grona krioprotektantów, wykazując się podobnym wpływem na ciśnienie osmotyczne w tylakoidach, co opisane lektyny (12).

3.1.2. Geny, których produkty biorą udział w syntezie osmoprotektantów

U wielu roślin zaobserwowano akumulację cukrów w trakcie aklimatyzacji do niskiej temperatury (5). Ich podwyższony poziom może zapobiegać utracie wody następującej pod wpływem tego stresu oraz przyczyniać się do stabilizacji makro-

cząsteczek i błon biologicznych (1). Działanie niskiej temperatury powoduje wzrost ekspresji niektórych genów kodujących enzymy związane z metabolizmem cukrów (5). U *A. thaliana* zanotowano gwałtowny wzrost poziomu transkryptów genu *ERD6* (*early-responsive to dehydration*), kodującego białko, uznane na podstawie homologii sekwencji, za transporter cukrów (13). Do grupy osmoprotektantów należy także prolina (Pro). Poziom Pro wzrasta w odpowiedzi na obniżenie temperatury, a rośliny wykazujące nadekspresję genu dla syntazy delta-pyrrolino-5-karboksylanu (*P5CS*), biorącej udział w syntezie tego aminokwasu, cechują się większą tolerancją na stres osmotyczny i mróz (1).

3.1.3. Geny *COR*; białka z rodziny *LEA* i ich homologi

U *A. thaliana* zidentyfikowano dużą rodzinę genów *COR* (*cold-regulated*), m.in. *COR6.6*, *COR15a*, *COR78*, *COR47* określanych także jako *LTI* (*low temperature induced*), *KIN* (*cold inducible*), *RD* (*responsible to dessication*) lub *ERD* (*early dehydration-inducible*) (14). Niektóre geny *COR* kodują białka *LEA* (*late-embryogenesis abundant*). Białka klasyfikowane jako *LEA* i ich homologi charakteryzuje duża hydrofilność, która wynika z wysokiej częstotliwości występowania aminokwasów takich jak alanina i lizyna (3), oraz fakt, że nie ulegają koagulacji w roztworach wodnych po ogrzaniu do temperatury wrzenia (14). Powszechną ich cechą jest również mało urozmaicony skład aminokwasowy (duże fragmenty zbudowane zaledwie z kilku aminokwasów) i obecność sekwencji powtórzonych (14). Produkty białkowe genów *LEA* pojawiają się w późnej fazie embriogenezy, ale również w odpowiedzi na dehydratację i stymulację hormonalną (5). Geny *COR47* kodują polipeptydy należące do rodziny białek *LEA* określanej jako dehydryny (14). Stwierdzono, że u żyta poziom ekspresji dehydryn jest pozytywnie skorelowany ze zwiększoną tolerancją na zimno (15). Jednym z najlepiej poznanych genów z grupy *COR* jest *COR15A* (16). Gen ten koduje polipeptyd o masie 15 kDa. Po imporcie do chloroplastów *COR15A* jest przekształcany w polipeptyd o masie 9,4 kDa, określany jako *COR15am*. Wykazano, że konstytutywna ekspresja *COR15A* w transgenicznym roślinach *A. thaliana* zwiększa ich tolerancję na zamarzanie (16). Białko *COR15am* stabilizuje wewnętrzną błonę chloroplastów chroniąc ją przed przejściem fazowym z fazy lamellarnej do heksagonalnej II, co jest głównym powodem uszkodzeń, jakie następują w przedziale temperatur od -8°C do -4°C . Spośród wszystkich błon w komórce roślinnej to właśnie wewnętrzna błona chloroplastowa wykazuje największą skłonność do tego przejścia. Uważa się, że *COR15am* powoduje obniżenie temperatury przejścia fazowego, ponieważ, dzięki obecności licznych amfipatycznych regionów alfa-helikalnych, białko to zmienia krzywiznę wewnętrznej błony chloroplastów (17). Wiele białek o nieznanym funkcji, akumulowanych podczas aklimatyzacji do niskiej temperatury, również posiada regiony zdolne do tworzenia alfa-helis. Nie jest wykluczone, że mechanizm ich działania jest podobny jak w przypadku białka *COR15a* (14).

3.1.4. Białka AFP

Kolejną grupą białek, zwiększających odporność roślin na mróz, są AFP (*antifreeze proteins*). Do tej grupy zaliczono m.in. białka podobne do glukanaz (*glucanase-like proteins*, GLPs), chitynaz (*chitinase-like proteins*, CLPs) i taumatyny (*thaumatin-like proteins*, TLPs; 18). Zapobiegają one przedostawaniu się lodu do wnętrza komórki. Zmieniają również dynamikę krystalizacji wody, poprzez hamowanie powiększania się kryształów lodu, co skutkowałoby rozrywaniem struktur komórkowych. Hamują one również zamarzanie wody po powtórny obniżeniu temperatury. Aktywność wymienionych białek jest wzmacniana pod wpływem jonów Ca^{2+} (19), które również biorą udział w odpowiedzi na niską temperaturę, co zostało opisane.

3.1.5. Geny białek opiekuńczych

Białka opiekuńcze biorą udział w głównych etapach biosyntezy białek, takich jak ich kierowanie do poszczególnych przedziałów komórkowych, czy kontrola nad ich prawidłową strukturą. W reakcji na stres niskiej temperatury są one zaangażowane w utrzymywanie prawidłowej biogenezy białek lub ich stabilizację i zapobieganie denaturacji (1). Ważną grupę białek opiekuńczych stanowią białka szoku cieplnego HSP (*heat-shock proteins*), których geny mogą być aktywowane nie tylko przez wysoką temperaturę, ale również przez inne stresse takie jak susza, zasolenie czy działanie niskiej temperatury. Chłód powoduje akumulację transkryptów genów *HSP90* (kodujących białka HSP o masie około 90 kD) u *Brassica napus* i u szpinaku (20) oraz transkryptów genów *HSP70* u szpinaku (21). Podczas jednoczesnej analizy genów kodujących białka HSP70 zlokalizowanych w cytosolu, retikulum endoplazmatycznym, chloroplastach lub mitochondriach wykazano, że, z wyjątkiem genu kodującego mitochondrialne HSP70, ekspresja wszystkich pozostałych genów ulega wzmocnieniu pod wpływem niskiej temperatury (21).

Inna grupa białek szoku cieplnego o masie 15 - 42 kD, tzw. smHSP lub sHSP (*small HSP*), jest zaangażowana w zjawisko ochrony owoców i warzyw przed uszkodzeniami spowodowanymi chłodem przez poddanie ich wcześniejszemu stresowi wysokiej temperatury. Tę krzyżową tolerancję zaobserwowano w przypadku awokado (22), ogórka (23), pieprzu (24) i pomidora (25). Po krótkiej ekspozycji na temperaturę 38°C owoce pomidora przechowywano w temperaturze 2°C i nawet po kilku tygodniach nie ulegały one uszkodzeniom (25). Wystąpienie tej odporności na chłód jest skorelowane z ekspresją dwóch genów kodujących białka smHSP – *TOM66* i *TOM111* (26).

Znane są przykłady enzymów łączących aktywność proteolityczną z aktywnością białek opiekuńczych, co pozwala im precyzyjnie rozpoznawać specyficzne substraty i unikać przypadkowej degradacji innych białek. Uważa się, że dzięki tym enzymom komórka mogłaby zapobiegać akumulacji toksycznych polipeptydów (27), które powstają w warunkach stresu. Nie było zatem zaskakujące odkrycie udziału proteaz

Clp, posiadających aktywność białek opiekuńczych, w odpowiedzi na wiele typów stresu u bakterii (28). Również u *A. thaliana* długotrwały stres niskiej temperatury powoduje wzrost poziomu mRNA i białka niektórych chloroplastowych proteaz Clp (29). Sądzono, że podobna, indukowana chłodem, regulacja może mieć miejsce w przypadku posiadającej aktywność białka opiekuńczego proteazy PsFtsH (*Pisum sativum* FtsH), która jest pierwszą scharakteryzowaną roślinną mitochondrialną proteazą tego typu (30). Zgodnie z przypuszczeniami okazało się, że niska temperatura rzeczywiście hamuje aktywność PsFtsH polegającą na wbudowywaniu do błony mitochondrialnej podjednostek syntazy ATP.

3.2. Geny białek regulatorowych i przekazujących sygnały

Niska temperatura wpływa na ekspresję genów kodujących białka regulatorowe i przekazujące sygnały: czynniki transkrypcyjne (31), białka wiążące RNA (32), enzymy kaskady MAPK (5,33-35), fosfolipazę C (34), białka 14-3-3 (37) i białka spokrewnione z kalmoduliną (38).

Wpływ niskiej temperatury na ekspresję białek wiążących kwasy nukleinowe opisano dotychczas u kilku gatunków roślin, w tym u pszenicy (32). Do najlepiej scharakteryzowanych w tej grupie należy zidentyfikowane u pszenicy białko WCSP1 (32). Stres chłodu powoduje akumulację transkryptów genu *WCSP1* i następujący po niej wzrost poziomu białka. *WCSP1* posiada zdolność do wiązania RNA oraz jedno- i dwuniciowego DNA. Jest ono wysoce homologiczne do bakteryjnego białka *CspA* określanego jako białko opiekuńcze RNA (RNA *chaperone*). *CspA* jest syntetyzowane przez bakterie *Escherichia coli* w fazie aklimatyzacji do chłodu, wiąże się do RNA destabilizując jego struktury drugorzędowe, ułatwiając w ten sposób translację w niskiej temperaturze (39). Białko to działa również jako antyterminator transkrypcji i jest odpowiedzialne za ekspresję zestawu genów związanych z odpowiedzią na stres chłodu (40). Na podstawie podobieństwa pszenicznego białka do *CspA* uważa się, że również *WCSP1* jest odpowiedzialne za transkrypcyjną i translacyjną regulację genów zaangażowanych w aklimatyzację pszenicy do zimna (32).

Stres wywołany niską temperaturą powoduje także wzrost poziomu transkryptów genów kodujących enzymy kaskady kinaz MAP: *MMK4* u lucerny (33), *ATMEKK1*, *ATMPK3* i *ATPK19* u *A. thaliana* (34) oraz *OsMEK1* i *Os MAP1* u ryżu (35). W tych warunkach dochodzi także do wzrostu poziomu mRNA genu kodującego specyficzną dla fosfatydyloinozytolu fosfolipazę C (PI-PLC) (36). Regulacja tego genu przez niską temperaturę, jak się wydaje, ma szczególne znaczenie, ponieważ PI-PLC to bardzo ważny element szlaku przewodzenia sygnałów. PI-PLC hydrolizuje 4,5-difosforan fosfatydyloinozytolu, prowadząc do powstania przekaźników drugorzędowych: trifosforanu inozytoli (IP₃) i diacyloglicerolu (DG). IP₃ jest regulatorem poziomu wolnych jonów Ca²⁺ w cytosolu. Rola jonów Ca²⁺ w przewodzeniu sygnału inicjowanego przez niską temperaturę zostanie opisana w dalszej części pracy.

3.3. Odpowiedź komórkowa na stres oksydacyjny

Wspomniano już, że w wyniku działania niskiej temperatury oraz innych czynników abiotycznych stres oksydacyjny spowodowany jest wzrostem stężenia reaktywnych form tlenu (ROS, *reactive oxygen species*). Cząsteczki, takie jak $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $\bullet OH$, powodują uszkodzenie błon biologicznych oraz makrocząsteczek (41). Obroną roślin w walce z nimi są związki określane jako „wymiatacze” reaktywnych form tlenu (ROS scavengers), takie jak dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), a także enzymy z grup katalaz i peroksydaz (41) oraz cząsteczki o charakterze nieenzymatycznym: askorbinian, α -tokoferol, glutation, karotenoidy i antocyjany (41). Nadekspresja genów, których produkty biorą udział w syntezie wymienionych związków wiąże się ze zwiększoną tolerancją roślin na stres wywołany czynnikami abiotycznymi, również niską temperaturą (41). Napływ H_2O_2 powoduje uruchomienie kaskady kinaz białkowych MAPK, reguluje on także wewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapniowych (42). Rola tych ostatnich w indukcji ekspresji genów zostanie omówiona. Dodatkowo, same reakcje utlenienia i redukcji z udziałem przeciwutleniaczy, takich jak glutation i askorbinian, mają wpływ na ekspresję genów (41).

3.4. Geny podlegające regulacji negatywnej

Niska temperatura powoduje nie tylko ekspresję lub wzrost ekspresji określonych genów, ale również może skutkować jego obniżeniem. Fowler i Thomashow (3) wykazali, że spośród 306 genów *A. thaliana*, których profil ekspresji ulegał zmianie, 88 (27%) podlegało regulacji negatywnej. Produkty tych ostatnich są zaangażowane w pełnienie różnych funkcji, związanych z transkrypcją, biosyntezą ściany komórkowej oraz fotosyntezą (3). Zahamowanie fotosyntezy i spadek poziomu transkryptów dla białek w nią zaangażowanych został już opisany u roślin poddanych działaniu obniżonej temperatury (3). Zmiany obserwowane przez Fowler i Thomashow miały charakter zarówno przejściowy, jak również długoterminowy i utrzymywały się przez siedem dni, lub dłużej. Reakcja roślin, skutkująca obniżeniem poziomu transkrypcji, choć bardzo wyraźna, cechowała się pewnym opóźnieniem w stosunku do efektu zwiększenia poziomu ekspresji genów odpowiedzi na niską temperaturę. Autorzy nie wyjaśnili przyczyny tego zjawiska.

4. Szlak przekazywania sygnału

4.1. Błona komórkowa jako pierwszorzędowy sensor stresu niskiej temperatury

Najczęściej wymienianym kandydatem do roli pierwszorzędowego sensora stresu chłodu jest błona komórkowa. Przemawia za tym fakt, że niska temperatura szybko i bezpośrednio powoduje zmniejszenie płynności błony, a ta zmiana jest niezbędna dla uruchomienia komórkowej odpowiedzi na stres. Postuluje się, że zmiany te nie dotyczą całej błony, a raczej obejmują przejścia fazowe w obrębie niewielkich domen (43). Czynniki chemiczne zwiększające płynność błony biologicznej i stabilizujące mikrofilamenty aktynowe hamują akumulację transkryptów genów związanych z aklimatyzacją do zimna, zaś czynniki usztywniające plazmalemę i destabilizujące mikrofilamenty, uniemożliwiając ich reorganizację, działają w sposób odwrotny (44,45). Zjawiskiem, które towarzyszy usztywnieniu błony i destabilizacji elementów cytoszkieletu jest wzrost stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie (44,45). Wykazano, że reorganizacja mikrofilamentów pod wpływem stresu zimna następuje już po usztywnieniu błony komórkowej, ale jeszcze przed napływem jonów wapnia do cytoplazmy (46). Pozwala to wnioskować, że to zmiany w reorganizacji elementów cytoszkieletu są odpowiedzialne za otwarcie kanałów Ca^{2+} .

Kolejnymi, obok plazmalemy, strukturami komórki roślinnej biorącymi udział w percepcji niskiej temperatury są chloroplasty (47) i mitochondria (48). Sygnałem do indukcji odpowiedzi na stres przez te organelle są zmiany redoks wywołane przez zaburzenie transportu elektronów w łańcuchu fotosyntetycznym i oksydacyjnym (47,48). W warunkach obniżonej temperatury dochodzi do zmian energetycznych w obrębie fotosystemu II (PSII). Odpowiedzią na te zaburzenia jest zwiększenie poziomu transkryptów oraz samych białek zaangażowanych w proces asymilacji CO_2 . Dochodzi także do ekspresji genu *Wcs19*, który uczestniczy w aklimatyzacji roślin do obniżonej temperatury (47). W przypadku zakłóceń w funkcjonowaniu łańcucha oddechowego, wykazano zwiększony poziom ekspresji genów dla enzymów neutralizujących wolne rodniki zarówno w samych mitochondriach, jak również w innych kompartmentach komórkowych. Rośliny z mutacją genu *nad7*, kodującego jedno z białek kompleksu I, cechowały się zwiększoną tolerancją na stres oksydacyjny (48).

Obok udziału chloroplastów i mitochondriów w odpowiedzi na stres niskiej temperatury, błona komórkowa pozostaje głównym sensorem chłodu u roślin.

4.2. Jony Ca^{2+} jako drugorzędowe przekaźniki sygnału zimna

Wzrost stężenia jonów Ca^{2+} w komórce jest uniwersalną odpowiedzią na bodźce środowiskowe. Następuje on w ciągu minut lub nawet sekund od chwili zadziałania stresu (49). Napływ jonów wapnia do komórki jest dwufazowy i ma dwa

źródła. Większość Ca^{2+} przedostaje się do cytoplazmy w pierwszej fazie z zewnątrz komórki, mniejsza ich część jest w drugiej fazie uwalniana z wakuoli (50). W pierwszej fazie napływ Ca^{2+} jest szybki, ale trwa krótko, druga faza jest dłuższa, ale wzrost poziomu jonów wapnia nie jest już tak gwałtowny. Zaobserwowano, że aklimatyzacja roślin do niskiej temperatury jest związana ze zmianą w profilu stężenia Ca^{2+} . Rośliny posiadające zdolność do aklimatyzacji i poddane raz stresowi chłodu, na następny stres reagują wolniejszym, ale przedłużonym napływem Ca^{2+} do cytoplazmy (50). Zmiana dynamiki napływu jonów Ca^{2+} w wyniku wcześniejszego działania niskiej temperatury uważana jest za element tzw. „pamięci zimna” (*cold memory*).

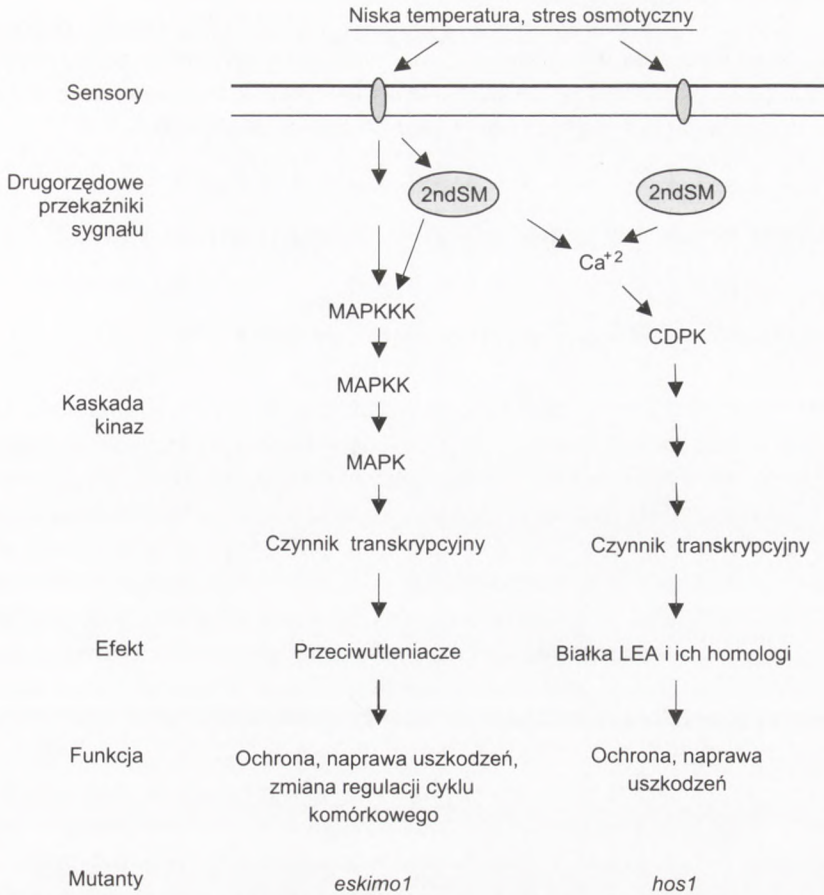
Na podstawie danych eksperymentalnych potwierdzono zasadniczą rolę Ca^{2+} jako drugorzędowego przekaźnika, biorącego udział w regulacji transkrypcji genów odpowiedzi na niską temperaturę: 1) wzrost stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie jest niezbędny dla ekspresji wspomnianych genów *KIN1* i *COR6.6* u *A. thaliana* (50,51) oraz genu *BN115* u *B. napus* (45); 2) czynniki chelatujące Ca^{2+} oraz blokujące kanały wapniowe uniemożliwiają ekspresję specyficznych dla aklimatyzacji genów *CAS15* i *CAS18* u lucerny (49) oraz genu *KIN1* u *A. thaliana* (50); 3) Istnieją dane wskazujące na to, że jony wapnia regulują ekspresję genów kodujących czynniki transkrypcyjne DREB1 kontrolujące wiele genów związanych z tolerancją na obniżoną temperaturę (52).

4.3. Od wzrostu stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie do ekspresji genów

Kiedy pada pytanie o czynniki pośredniczące w przetłumaczeniu sygnału jakim jest napływ jonów Ca^{2+} do cytoplazmy na odpowiedź komórkową, bardzo często wymienia się kalmodulinę i zależne od wapnia kinazy CDPK (*calcium dependent protein kinase*). Kalmodulina jest powszechnie znana jako białko pośredniczące w wielu procesach komórkowych zależnych od wapnia. Sugeruje się, że jest ona negatywnym regulatorem ekspresji genów *COR*, które są indukowane przez czynniki abiotyczne (52). Może działać antagonistycznie wobec CDPK uczestniczących w aktywacji genów i w odpowiednim momencie osłabiać odpowiedź komórkową na stres niskiej temperatury (52). O udziale kinaz zależnych od wapnia w przewodzeniu sygnału chłodu świadczy zwiększenie ekspresji jednej z CDPK lucerny pod wpływem niskiej temperatury (49) oraz zwiększenie aktywności CDPK u ryżu w stresie chłodu (53).

W przeprowadzonych przez Sangwan i wsp. (45) eksperymentach dowiedziono, że kinazy zależne od wapnia nie są jedynymi zaangażowanymi w zjawisko przewodzenia sygnału inicjowanego stresem chłodu. Zastosowanie inhibitorów specyficznych dla określonych typów enzymów wskazuje na udział kinaz tyrozynowych, kinazy C i kinazy fosfatydyloinozytolu oraz fosfataz 1 i 2A w odpowiedzi na stres niskiej temperatury (45).

W rozdziale 3 wspomniano, że niska temperatura powoduje podwyższoną ekspresję genów kodujących enzymy kaskady kinaz MAP oraz, w przypadku kinazy



Rys. 1. Główne szlaki przekazywania sygnału wywołane stresami niskiej temperatury i dehydracyjnym. Schemat uwzględnia najważniejsze elementy szlaków: główny sensor – błonę komórkową, przekaźniki drugiego rzędu (2ndSM), kaskadę kinaz białkowych oraz aktywowane geny i ich funkcje. Na schemacie uwzględniono również przykłady mutantów, u których doszło do zaburzenia funkcji odpowiednich genów. Rysunek zmodyfikowany (52).

p44^{MMK4} lucerny, zwiększenie aktywności enzymu w wyniku jego fosforylacji. Na kaskadę kinaz MAP składają się trzy enzymy: kinaza kinazy kinazy MAP (MAPKKK), kinaza kinazy MAP (MAPKK) i kinaza MAP (MAPK). Aktywowana MAPKKK fosforyluje i aktywuje MAPKK, a ta z kolei aktywuje MAPK. MAPK działa w jądrze komórkowym i może regulować czynniki transkrypcyjne. Dlatego udowodnienie udziału tej grupy kinaz w przewodzeniu sygnału zimna może ułatwić zrozumienie ostatniego etapu tego procesu, czyli inicjacji transkrypcji genów indukowanych zimnem.

Prawdopodobnie najbardziej kompletny obraz zdarzeń mających miejsce w komórce roślinnej eksponowanej na niską temperaturę prezentują wyniki uzyskane przez Sangwan i wsp. (46). Stosując czynniki modyfikujące płynność błony komór-

kowej, stan cytoszkieletu, poziom Ca^{2+} oraz aktywność CDPK, autorzy dowiedli, że percepcja sygnału zimna przez błonę, zmniejszenie jej płynności, zmiany w cytoszkielecie, a następnie napływ jonów wapnia do cytoplazmy, powodują aktywację CDPK, a ta pociąga za sobą aktywację kinaz kaskady MAP (46).

5. Regulacja genów biorących udział w aklimatyzacji do zimna

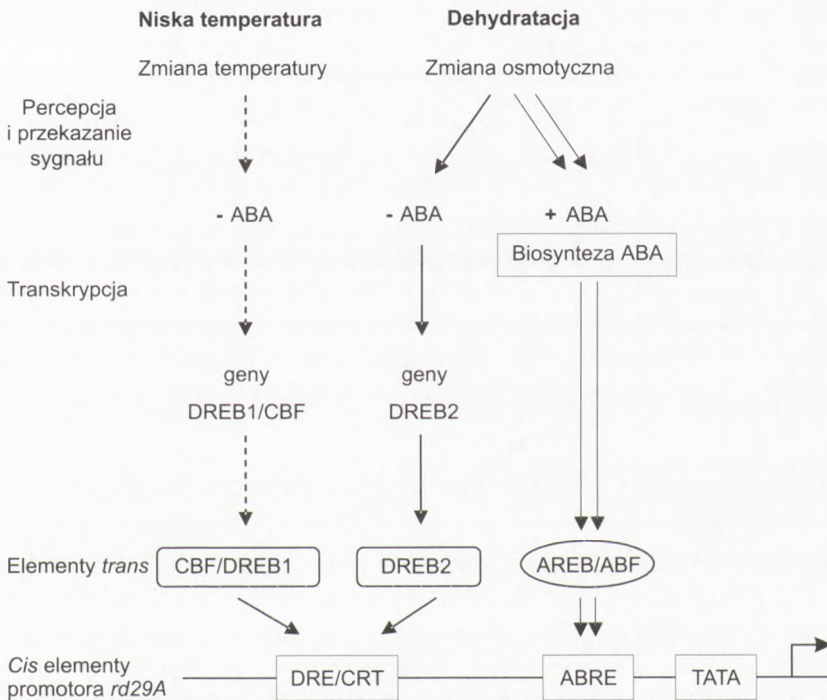
5.1. Regulacja transkrypcji przez czynniki CBF/DREB

Niektóre spośród genów zaangażowanych w odpowiedź roślin na niską temperaturę są również indukowane przez stres dehydracyjny (55). W promotorach tych genów zidentyfikowano regulatorową sekwencję DNA określaną jako CRT/DRE (*C-repeat/dehydration responsive element*), która posiada konserwowany motyw rdzeniowy CCGAC (5,55). Czynniki transkrypcyjne, które indukują ekspresję genów z motywem CRT/DRE określa się jako DREB (*DRE binding protein*) lub CBF (*CRT/DRE binding factor*). U *A. thaliana* zidentyfikowano czynniki DREB1A i DREB2A nie wykazujące znacznego podobieństwa sekwencji poza konserwowaną domeną wiążącą DNA (31). Geny kodujące czynnik DREB1A oraz jego dwa homologi (DREB1B i C) ulegają ekspresji pod wpływem niskiej temperatury, natomiast ekspresja genu *DREB2A* i jego homologa (*DREB2B*) jest indukowana przez stres dehydracyjny (31). Ten wzór ekspresji czynników DREB pozwolił wyciągnąć wniosek, że DREB1 i DREB2 to dwie niezależne rodziny białek, które funkcjonują w oddzielnych szlakach przekazywania sygnału aktywowanych odpowiednio przez stresy zimna i dehydracyjny. Białka DREB1A, DREB1B i DREB1C (nazywane również odpowiednio CBF3, CBF1, CBF2) zawierają domenę wiążącą DNA, mają prawie identyczne sekwencje aminokwasowe i są kodowane przez geny zlokalizowane w tandemowym szyku na chromosomie czwartym (31). Potwierdzeniem roli czynników DREB1 w odpowiedzi na zimno są wyniki badań wykorzystujących rośliny transgeniczne: 1) nadekspresja *DREB1A* w transgenicznych roślinach *A. thaliana* koreluje ze wzrostem ekspresji genu *COR78*, który posiada w swoim promotorze sekwencję CRT/DRE i jest indukowany przez niską temperaturę i dehydrację wywołaną innymi czynnikami środowiskowymi (31); 2) nadekspresja genów *DREB1* u *B. napus* indukuje ekspresję regulowanych przez niską temperaturę genów *BN115* i *BN28* i zwiększa tolerancję na zamarzanie (56); 3) nadekspresja *DREB1A* (42,57) i *DREB1B* (41) w transgenicznych roślinach *A. thaliana* indukuje ekspresję wielu regulowanych zimnem genów zawierających motyw CRT/DRE, bez stymulacji niską temperaturą, związana jest także ze wzrostem stężenia proliny i cukrów rozpuszczalnych; 4) nieaklimatyzowane transgeniczne rośliny *A. thaliana* z nadekspresją *DREB1A* (55) lub *DREB1B* (41) mają większą tolerancję na zamarzanie niż nieaklimatyzowane rośliny kontrolne.

Wspomniano już, że ekspresja genów *DREB1* jest regulowana przez chłód. W ciągu 15 minut od zadziałania niskiej temperatury rozpoczyna się akumulacja transkryptów *DREB1*, a od 1 do 2 godzin później obserwuje się akumulację mRNA wybranych genów zawierających motyw CRT/DRE w promotorach (31). Ekspresja genów *DREB1* nie podlega autoregulacji przez sekwencję CRT/DRE. W przeprowadzonej analizie regionów promotorowych *DREB1A,B,C* wykazano, że w regionach tych nie występuje sekwencja CRT, stanowiąca konserwatywny rdzeń motywu DRE (58).

6. Przewodzenie sygnału indukowanego chłodem drogą zależną od kwasu abscysynowego

Kolejnym uniwersalnym mechanizmem odpowiedzi na abiotyczne czynniki stresowe, obok podwyższenia wewnątrzkomórkowego poziomu wolnych rodników i Ca^{2+} , jest przejściowy wzrost stężenia kwasu abscysynowego. Stymuluje on odpowiedź roślin na stres, dlatego nazywany jest także hormonem stresu. Udział ABA



Rys. 2. Indukcja ekspresji genów drogą zależną (+ ABA) i niezależną (- ABA) od ABA na przykładzie genu *rd29A*. Przerywane strzałki pokazują drogę indukowaną niską temperaturą. Strzałki ciągłe i podwójne wskazują odpowiednio drogi niezależną i zależną od ABA, indukowane stresem dehydracyjnym; rysunek zmodyfikowany (60).

w aklimatyzacji do zimna potwierdza obserwacja podwyższonej tolerancji na zamarzanie, jaką wykazują rośliny rosnące w normalnej temperaturze, które poddano działaniu kwasu abscysynowego (5). Przede wszystkim jednak za istotną rolę ABA przemawia istnienie genów indukowanych przez chłód, w promotorach których występują sekwencje związane z odpowiedzią na kwas abscysynowy tzw. ABRE (*ABA response elements*). Sekwencję ABRE (PyACGTGGC) zidentyfikowano w promotorach genów *COR15a* (59), *RD29A* (2) i *COR6.6* (41). ABA stymuluje ekspresję genów aktywując czynniki transkrypcyjne oddziałujące z elementami ABRE (60). Scharakteryzowane u *A. thaliana* AREB (*ABA-responsive element binding protein*) oraz ABFs (*ABRE binding factors*) wiążą się do sekwencji ABRE w odpowiedzi na różne stresowe czynniki środowiskowe (5). W indukcji ekspresji genów zależnej od ABA biorą udział te same przekaźniki drugiego rzędu, co w opisanym drodze niezależnej od stymulacji hormonalnej. ABA poprzez cADPR powoduje napływ Ca^{2+} do cytoplazmy, co pociąga za sobą kaskadę reakcji z udziałem kinaz oraz fosfataz (5,61).

7. Mutacje zmieniające odpowiedź roślin na stres chłodu

7.1. Mutacja w genie *eskimo-1*

U *A. thaliana* zidentyfikowano gen *eskimo1*, którego mutacja zwiększała u roślin tolerancję na temperatury niższe niż 0°C (63). Poszukując przyczyn tej zwiększonej tolerancji oraz próbując wyjaśnić funkcję *eskimo-1* analizowano rośliny zmutowane porównując je do roślin typu dzikiego.

U mutantów zaobserwowano trzydziestokrotny wzrost stężenia wolnej proliny oraz cukrów rozpuszczalnych (55). Komórki mutantów cechował także podwyższony poziom ekspresji genu *RAB18*, który jest indukowany niską temperaturą. Sugeruje to funkcję *eskimo1* jako negatywnego regulatora w procesie aklimatyzacji (55).

7.2. Mutacja genu *SFR6*

Gen *SFR6* koduje białko, które prawdopodobnie współdziała z czynnikami CBF/DREB1 w kontroli transkrypcji genów. Proponuje się, że białko to pośredniczy w interakcji DREB1 z motywem CBF (52). U roślin z mutacją *SFR6*, pomimo niskiej temperatury, nie dochodzi do ekspresji genów regulowanych przez zimno: *LTI38*, *COR15a* i *KIN1*, które posiadają motyw CRT/DRE (52,64). Jednakże, mutacja *SFR6* nie zaburza transkrypcji genów nie zawierających tej sekwencji, wymagających innych czynników transkrypcyjnych.

7.3. Mutacje genów *HOS1* i *HOS2*

Białka HOS1 i HOS2 są uważane za ważne negatywne regulatory przewodzenia sygnału indukowanego przez stres chłodu (65,66). Funkcję tych białek określono dzięki charakterystyce recesywnych mutantów *A. thaliana hos1* (65) i *hos2* (66), które wykazują zwiększoną ekspresję genów znanych jako indukowane przez niską temperaturę (*RD29A*, *COR15A*, *KIN1*, *COR47*). Innymi słowy, mutacje w genach kodujących negatywne regulatory HOS1 lub HOS2, powodują zwiększoną wrażliwość roślin na stres niskiej temperatury. Zarówno mutacja *hos1* jak i *hos2* zmniejsza tolerancję roślin na zamarzanie. Na tym jednak kończą się podobieństwa między mutantami. W przypadku roślin typu *hos1* aklimatyzacja do obniżonej temperatury sprawia, że uzyskują one taką samą tolerancję na zamarzanie jak rośliny nie zmutowane. Mutacja *hos1* zwiększa zatem zdolność roślin do aklimatyzacji. Tymczasem po aklimatyzacji roślin z mutacją *hos2*, ich tolerancja na zamarzanie różni się jeszcze bardziej od tolerancji aklimatyzowanych roślin typu dzikiego. Mutacja *hos2*, jak się wydaje, pogarsza zdolności aklimatyzacyjne roślin. Charakterystyka roślin *hos1* i *hos2* sugeruje, że obie mutacje wywołują ten sam efekt zwiększonej ekspresji genów indukowanych niską temperaturą, ale za pośrednictwem odmiennych mechanizmów.

8. Najnowsze techniki badawcze w analizie transkryptomów i proteomów roślinnych w celu detekcji genów regulowanych przez stres chłodu

Jednoczesna analiza ekspresji dużej liczby genów jest możliwa dzięki wykorzystaniu mikromacierzy (*microarray*) – szklanych płytek, na których osadza się cDNA z gęstością >1000 genów/cm². Znajdujące się na mikromacierzach sekwencje są poddawane hybrydyzacji z sondami cDNA otrzymanymi na matrycy mRNA roślin kontrolnych oraz badanych (poddanych działaniu stresu). Te dwa typy sond posiadają różne znaczniki fluorescencyjne, co umożliwi analizę porównawczą ekspresji genów w warunkach kontrolnych i stresowych.

Seki i wsp. wykorzystali mikromacierze do monitorowania zmian w ekspresji 1300 genów *A. thaliana* następujących pod wpływem stresów suszy i chłodu (7). Ta sama technika umożliwiła także identyfikację genów, których transkrypcja jest regulowana przez opisany w rozdziale 3.1. czynnik DREB1a. Wykryto w ten sposób 44 geny indukowane suszą i 19 genów, których ekspresja wzrastała pod wpływem niskiej temperatury. Spośród nich odpowiednio 30 i 10 genów opisano po raz pierwszy jako stymulowane stresem. Okazało się, że czynnik DREB1a kontroluje ekspresję 12 ze wszystkich zidentyfikowanych genów. Większość genów ulegała zwiększonej ekspresji zarówno pod wpływem suszy jak i chłodu, ekspresja tylko dwóch z 19 genów indukowanych chłodem była specyficzna wyłącznie dla tego stresu. Jednym z tych dwóch genów okazał się *DREB1a* (7).

Inną strategię zastosowali Kollipara i wsp., aby zidentyfikować geny, których ekspresja zmienia się pod wpływem chłodu u linii kukurydzy wyróżniających się zwiększoną zdolnością do kiełkowania w niskich temperaturach (8). W tym przypadku autorzy posłużyli się nie tylko zakrojoną na szeroką skalę analizą profili mRNA, ale również badali zmiany profili białkowych. Profile transkrypcyjne linii kukurydzy uzyskano za pomocą technologii GeneCalling. mRNA z analizowanych tkanek posłużył do otrzymania dwuniciowego cDNA, który trawiono enzymatycznie, otrzymane fragmenty amplifikowano i rozdzielono w elektroforezie kapilarnej. Zaobserwowano aż 336 fragmentów cDNA, które charakteryzowała przynajmniej półtorakrotna zmiana w ekspresji, korelująca ze zdolnością nasion do kiełkowania w niskich temperaturach. Geny identyfikowano dzięki komputerowemu algorytmowi pozwalającemu na porównanie wielkości otrzymanych fragmentów z wartościami przewidzianymi na podstawie „wirtualnego trawienia” genów, których sekwencje zgromadzono w bazach danych. W ten sposób rozpoznano 23 geny.

Profile ekspresji białek badano natomiast stosując elektroforezę dwukierunkową. Wykryto 117 białek, których ekspresja była znacząco zmieniona u linii kukurydzy o podwyższonej zdolności do kiełkowania w warunkach chłodu. Spośród nich niemal połowę udało się zidentyfikować po wycięciu z żelu i analizie za pomocą spektroskopii masowej. Opisane badania pozwoliły na rozpoznanie genów, które pod względem funkcji pełnionych przez ich produkty prezentują bardzo szerokie spektrum (8). Są wśród nich geny kodujące enzymy związane z metabolizmem węglowodanów, lipidów i aminokwasów, enzymy glikolizy i glukoneogenezy, białka ściany komórkowej i cytoszkieletu, białka opiekuńcze, białka kanałów jonowych, histony, czynniki transkrypcyjne oraz białka zapasowe.

9. Podsumowanie

Rośliny, jako organizmy niezdolne do ruchu są szczególnie narażone na niekorzystny wpływ środowiska. Badanie odpowiedzi roślin na stesy środowiskowe jest zadaniem szczególnie trudnym. Z jednej strony ten sam mechanizm obronny bywa uruchamiany w odpowiedzi na różne czynniki stresowe, a z drugiej reakcja roślin na stres obejmuje cały zespół procesów. Działanie obniżonej temperatury pociąga za sobą zarówno zmiany fizyczne, jak i fizjologiczne w komórkach roślinnych. W naszej pracy skupiliśmy się na wpływie niskiej temperatury na ekspresję genów i znaczeniu tego etapu odpowiedzi dla aklimatyzacji roślin. W coraz większej liczbie doniesień potwierdza się, że aklimatyzacja jest związana ze wzrostem ekspresji jednych genów i ze spadkiem ekspresji innych.

W większości publikacji, poświęconych temu problemowi, znajduje opis kolejnych genów regulowanych przez niską temperaturę. Można oczekiwać, że w najbliższych latach najistotniejsze badania będą się koncentrowały na szczegółowym poznaniu czynników uczestniczących w przewodzeniu tego sygnału do jądra ko-

mórkowego i stymulacji ekspresji genów związanych z aklimatyzacją do niskiej temperatury.

Literatura

1. Wang W., Vinocur B., Altman A., (2003), *Planta*, 218, 1-14.
2. Seki M., Kamei A., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., (2003), *Curr Opin Biotechnol.*, 14, 194-199.
3. Fowler S., Thomashow M. F., (2002), *Plant Cell*, 14, 1675-1690.
4. Pearce S. R., (1999), *Plant Growth Regulation*, 29, 47-76.
5. Palva E. T., Thtiharju S., Tamminen I., Puhakainen T., Laitinen R., Svensson J., Helenius E., Heino P., (2002), *JIRCAS Working Report*, 9-15.
6. Guy C. L., Niemi K. J., Brambl R., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 3673-3677.
7. Seki M., Narusaka M., Abe H., Kasuga M., Yamaguchi-Shinozaki K., Carninci P., Hayashizaki Y., Shinozaki K., (2001), *Plant Cell*, 13, 61-72.
8. Kollipara K. P., Saab I. N., Wych R. D., Lauer M. J., Singletary G.W., (2002), *Plant Physiol.*, 129, 974-992.
9. Tafforeau M., Verdus M. C., Charlionet R., Cabin-Flaman A., Ripoll C., (2002), *Electrophoresis*, 23, 2534-2540.
10. Gibson S., Arondel V., Iba K., Somerville C., (1994), *Plant Physiol.*, 106, 1615-1621.
11. Fukuchi-Mizutani M., Tasaka Y., Tanaka Y., Ashikari T., Kusumi T., Murata N., (1998), *Plant Cell Physiol.*, 39, 247-253.
12. Hinch D. K., (2002), *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 357, 909-916.
13. Kiyosue T., Abe H., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., (1998), *Biochim. Biophys. Acta*, 1370, 187-191.
14. Thomashow F. M., (1999), *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 5, 571-599.
15. Zhu B., Choi D. W., Fenton R., Close T. J., (2000), *Mol. Gen. Genet.*, 264, 145-153.
16. Artus N. N., Uemura M., Steponkus P. L., Gilmour S. J., Lin C., Thomashow M. F., (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 13404-13409.
17. Steponkus P. L., Uemura M., Joseph R. A., Gilmour S. J., Thomashow M. F., (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 14570-14575.
18. Antikainen M., Griffith M., Hon W-C., Yang D. S. C., Pihakaski-Maunsbach K., (1996), *Plant Physiol.*, 110, 845-857.
19. Stressmann M., Griffith M., Moresoli C., Bravo L. A., Marangoni A. G., (2004), *Plant Physiology*, 135, 364-376.
20. Krishna P., Sacco M., Cherutti J. F., Hill S., (1995), *Plant Physiol.*, 107, 915-923.
21. Guy C. L., Li Q. B., (1998), *Plant Cell*, 10, 539-556.
22. Woolf A. B., Watkins C. B., Bowen J. H., Lay-Yee M., Maindonals J. H., Ferguson I. B., (1995), *J. Am. Soc. Hortic Sci.*, 120, 1050-1056.
23. McCollum T. G., Doostdar H., Mayer R. T., McDonald R. E., (1995), *Postharv Biol. Technol.*, 6, 55-64.
24. Mencarelli F., Ceccantoni B., Bolini A., Anelli G., (1993), *Acta Hort.*, 343, 238-243.
25. Lurie S., Klein J. D., (1991), *J. Am. Soc. Hortic Sci.*, 116, 1007-1012.
26. Sabehat A., Lurie S., Weiss D., (1998), *Plant Physiol.*, 117, 651-658.
27. Parsell D. A., Lindquist S., (1993), *Annu. Rev. Genet.*, 27, 437-496.
28. Porankiewicz J., Wang J., Clarke A. K., (1999), *Mol. Microbiol.*, 32, 449-458.
29. Zheng B., Halperin T., Hruskova-Heidingsfeldova O., Adam Z., Clarke A. K., (2002), *Physiol. Plant.*, 114, 92-101.
30. Kolodziejczak M., Kołaczowska A., Szczyński B., Urantówka A., Knorpp C., Kieleczawa J., Jańska H., (2002), *J. Biol. Chem.*, 277, 43792-43798.
31. Liu Q., Kasuga M., Sakuma Y., Abe H., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., (1998), *Plant Cell*, 10, 1391-1406.

32. Karlson D., Nakaminami K., Toyomasu T., Imai R., (2002), *J. Biol. Chem.*, 277, 35248-35256.
33. Jonak C., Kiegerl S., Ligterink W., Barker P. J., Huskisson N. S., Hirt H., (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 11274-11279.
34. Mizoguchi T., Irie K., Hirayama T., Hayashida N., Yamaguchi-Shinozaki K., Matsumoto K., Shinozaki K., (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 765-769.
35. Wen J.-Q., Oono K., Imai R., (2002), *Plant Physiol.*, 129, 1880-1891.
36. Hirayama T., Ohto C., Mizoguchi T., Shinozaki K., (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 3903-3907.
37. Jarillo J.A., Capel J., Leyva A., Martinez-Zapater J. M., Salinas J., (1994), *Plant Mol. Biol.*, 25, 693-704.
38. Polisenky D. H., Braam J., (1996), *Plant Physiol.*, 111, 1271-1279.
39. Jiang W., Hou Y., Inouye M., (1997), *J. Biol. Chem.*, 272, 196-202.
40. Bae W., Xia B., Inouye M., Severinov K., (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 7784-7789.
41. Wang H., Datla R., Georges F., Loewen M., Cutler A. J., (1995), *Plant Mol. Biol.*, 28, 605-617.
42. Pastori G., Foyer C., (2002), *Plant Physiol.*, 129, 460-468.
43. Murata N., Los D. A., (1997), *Plant Physiol.*, 115, 875-879.
44. Orvar B. L., Sangwan V., Omann F., Dhindsa R. S., (2000), *Plant J.*, 23, 785-794.
45. Sangwan V., Foulds I., Singh J., Dhindsa R. S., (2001), *Plant J.*, 27, 1-12.
46. Sangwan V., Orvar B. L., Beyerly J., Hirt H., Dhindsa R. S., (2002), *Plant J.*, 31, 629-638.
47. Huner N. P. A., Oquist G., Sarhan F., (1998), *Trends Plant Sci.*, 3, 224-230.
48. Dutilleul C., Garmier M., Noctor G., Mathieu C., Chétrit P., Foyer C. H., de Paepe R., (2003), *Plant Cell*, 1, 1212-1226.
49. Monroy A. F., Dhindsa R. S., (1995), *Plant Cell*, 7, 321-331.
50. Knight H., Trewavas A. J., Knight M. R., (1996), *Plant Cell*, 8, 489-503.
51. Tahtiharju S., Sangwan V., Monroy A. F., Dhindsa R. S., Borg M., (1997), *Planta*, 203, 442-447.
52. Knight M. R., (2002), *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 357, 871-875.
53. Martin M. L., Busconi L., (2001), *Plant Physiol.*, 125, 1442-1449.
54. Xiong L., Karen S., Schumaker K. S., Zhu J.-K., (2002), *Plant Cell*, S165-S183.
55. Thomashow M. F., (2001), *Plant Physiol.*, 125, 89-93.
56. Jaglo K. R., Kleff S., Amundsen K. L., Zhang X., Haake V., Zhang J. Z., Deits T., Thomashow M. F., (2001), *Plant Physiol.*, 127, 910-917.
57. Kasuga M., Liu Q., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., (1999), *Nat. Biotechnol.*, 17, 287-291.
58. Gilmour S. J., Zarka D. G., Stockinger E. J., Salazar M. P., Houghton J. M., Thomashow M. F., (1998), *Plant J.*, 16, 433-442.
59. Baker S. S., Wilhelm K. S., Thomashow M. F., (1994), *Plant Mol. Biol.*, 24, 701-713.
60. Uno Y., Furihata T., Abe H., Yoshida R., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 11632-11637.
61. Moller S. G., Chua N. H., (1999), *J. Mol. Biol.*, 293, 219-234.
62. Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., (2000), *Curr Opin Plant Biol*, 3, 217-223.
63. Xin Z., Browse J., (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 7799-7804.
64. Knight H., Veale E. L., Warren G. J., Knight M. R., (1999), *Plant Cell*, 11, 875-886.
65. Ishitani M., Xiong L., Lee H., Stevenson B., Zhu J. K., (1998), *Plant Cell*, 10, 1151-1161.
66. Lee H., Xiong L., Ishitani M., Stevenson B., Zhu J. K., (1999), *Plant J.*, 17, 301-308.