

На правах рукописи

МАКАРОВА Марина Валерьевна

**МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ КОРНЕЙ ОЗИМОЙ
ПШЕНИЦЫ В СВЯЗИ С ДЕСТРУКЦИЕЙ ЦИТОСКЕЛЕТА ПРИ
ДЕЙСТВИИ ИНДУКТОРОВ МОРОЗОУСТОЙЧИВОСТИ**

03.00.12 – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Казань – 2007

Работа выполнена на кафедре физиологии и биотехнологии растений биолого-почвенного факультета ГОУ ВПО «Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина».

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Хохлова Людмила Петровна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Чиков Владимир Иванович

доктор биологических наук,
Клячко Нелла Леопольдовна

Ведущая организация: ГОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва» (г. Саранск)

Защита состоится **«9» ноября 2007** года в **10** часов на заседании диссертационного совета К 002.005.01 по присуждению учёной степени кандидата биологических наук при Казанском институте биохимии и биофизики КазНЦ РАН (420111, г. Казань, а/я-30, ул. Лобачевского, 2/31).

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной библиотеке Казанского научного центра РАН.

Автореферат разослан **«6» октября 2007** г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

А.Б. Иванова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Исследование физиологической роли цитоскелета в формировании стресса у растений относится к перспективной, но малоисследованной области клеточной биологии. Необходимость новых знаний в этом направлении обуславливает возможность повышения устойчивости растений к различным абиотическим и биотическим стресс-факторам, манипулируя состоянием цитоскелетных структур. Основные компоненты цитоскелета – тубулиновые микротрубочки (МТ), актиновые микрофиламенты (МФ) и ассоциированные с ними белки образуют в растительных клетках сильно разветвлённую, высокодинамичную сеть филаментных полимерных белков – структурный остов, контролирующей субклеточную организацию и целостность клеток (Васильев, 1996; Baskin, 2000). Являясь полифункциональной надмолекулярной системой, цитоскелет играет ключевую роль в процессах роста и развития растений, определяя форму клеток и органов, микроструктуру тканей и влияя на деление, полярность, дифференцировку, различные типы подвижности клеток, а также на везикулярный транспорт веществ, процессы эндо- и экзоцитоза (Barlow, Baluska, 2000; Samaj et al., 2004; Клячко, 2005).

Данные по изучению влияния цитоскелет-разрушающих ядов на растения (Morejohn, Fosket, 1991), взаимодействий цитоскелетных белков с интермедиатами сигнальных путей (Nick, 1999; Staiger, 2000), а также результаты молекулярно-генетического анализа тубулиновых мутантов растений с изменёнными морфогенетическими признаками (Емец, Блюм, 1999; Abe et al., 2004) свидетельствуют о том, что регулирующая функция МТ и МФ в ростовых и формообразовательных процессах связана с их участием в сигнальных системах и экспрессии генов (Volkman, Baluska, 1999; Smith, 2003; Клячко, 2004; 2006). Однако вопрос о том, каким образом реализуется цитоскелетный контроль морфофизиологических ответов растений, адаптирующихся к низким температурам и развивающих устойчивость к ним под влиянием стрессового фитогормона – абсцизовой кислоты (АБК), во многом остаётся не выясненным. В то же время показано, что эти два фактора вызывают в клетках озимой пшеницы глубокую физико-химическую реорганизацию цитоскелета и её генотипическую обусловленность, включая изменение экспрессии генов и состава изоформ тубулиновых белков (Хохлова, Олиневич, 2003; Abdrakchamanova et al., 2003). В настоящее время для выяснения участия цитоскелетных структур в различных процессах широко используется фармакологический подход, основанный на регистрации чувствительности изучаемых процессов к специфическим антицитоскелетным ядам (Morejohn et al., 1987; Mathur, Hülskamp, 2002).

Цель и задачи исследования. Цель работы состояла в выяснении особенностей цитоскелетного контроля роста и морфогенеза корней у разных генотипов озимой пшеницы при закаливании к холоду и действию абсцизовой кислоты.

В соответствии с поставленной целью необходимо было решить следующие задачи:

- изучить влияние высокоспецифического ингибитора полимеризации тубулиновых белков растительных клеток - оризалина на рост, биомассу и число корней

проростков отличающихся по морозоустойчивости сортов озимой пшеницы в условиях разной продолжительности холодого закаливания и после обработки АБК;

- провести морфо- и цитогистологический анализ корней и coleoptилей, обработанных оризалином, и выявить сортоспецифические эффекты препарата;
- провести электрофорез и иммуноблотинг тубулиновых и актиновых белков в экстрактах корней разных сортов озимой пшеницы при температурном и гормональном воздействиях;
- выяснить зависимость рост-альтерерирующего и морфогенного эффектов оризалина от содержания тубулиновых и актиновых белков и их соотношения;
- исследовать влияние холодого закаливания и АБК на оризалин-индуцированные изменения водоудерживающей способности корней разных сортов;
- изучить отдельное и совместное действие ингибиторов полимеризации тубулиновых (оризалина) и актиновых (цитохалазина Д и латрункулина Б) белков на водоудерживающую способность корней незакалённых, закалённых к холоду и АБК-обработанных проростков.

Научная новизна работы. Впервые показано, что при выращивании проростков отличающихся по морозоустойчивости сортов озимой пшеницы на растворе высокоспецифического ингибитора полимеризации тубулиновых белков растительных клеток – оризалина по-разному изменяются морфофизиологические характеристики корней. Эти изменения проявились в уменьшении длины корней, в радиальном набухании их кончиков вследствие появления луковицеобразных утолщений, накоплении биомассы и в повышении водоудерживающей способности корней. В большей степени изменялись клетки коровой паренхимы, которые приобретали округлую или неправильную форму и сильнее всего увеличивались в размерах, что указывает на потерю полярности клеточного роста. Наибольшее апикальное расширение оризалин-обработанных корней, как и ингибирование их линейного роста отмечено у растений среднеморозоустойчивого сорта, в корнях которых, по данным иммуноблотинга, больше содержалось актиновых и тубулиновых белков по сравнению с мало- и высокоморозоустойчивым сортами. Показано, что закаливание растений к холоду и экзогенная АБК сортоспецифично снижали или устраняли ростингибирующий и морфогенный эффекты антицитоскелетного агента на корни. При этом синергетическое действие этих факторов отмечено у маломорозоустойчивого сорта. На основании полученных результатов выдвинуто новое представление о том, что зависимость процессов роста и морфогенеза корней от содержания цитоскелетных белков (актина и тубулинов) является сортоспецифической и более выраженной у растений со средним уровнем морозоустойчивости, характеризующихся высокой экологической пластичностью.

Научно-практическая значимость работы. Проведённые исследования способствуют созданию теоретических основ функционирования цитоскелета как важнейшей сенсорной структуры клеток, влияющей на развитие термоадаптивного

потенциала растений. Выявленные в работе некоторые сортовые различия в морфофизиологических ответах корней на оризалин, свидетельствующие об обратной зависимости исследуемых показателей от морозоустойчивости сорта, представляют интерес для разработки новых цитоскелет-зависимых критериев устойчивости растений к низким температурам на более широком наборе сортов озимой пшеницы.

Обнаруженные сортоспецифические эффекты экзогенной АБК необходимо учитывать как при составлении научных программ, так и при практическом применении регуляторов роста растений гормонального типа действия.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы доложены на Международной научной конференции «New Geometry of Nature» (Казань, 2003), на Всероссийской научно-практической конференции «Физиология растений и экология на рубеже веков» (Ярославль, 2003), на V съезде ОФР и Международной конференции «Физиология растений – основа фитобиотехнологии» (Пенза, 2003), на годовом собрании ОФР и Международной научной конференции «Проблемы физиологии растений Севера» (Петрозаводск, 2004), на первой Международной научно-практической конференции «Медбиотек – 2005. Биологические и медицинские технологии: от научных результатов – к инновационным разработкам» (Москва, 2005), на годовом собрании ОФР и Международной научной конференции «Физиологические и молекулярно-генетические аспекты сохранения биоразнообразия» (Вологда, 2005), на Всероссийской научной конференции «Современные аспекты экологии и экологического образования» (Казань, 2005), на втором Международном симпозиуме «Сигнальные системы клеток растений: Роль в адаптации и иммунитете» (Казань, 2006), на итоговых научных конференциях Казанского государственного университета (Казань, 2005, 2006).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 15 работ.

Структура и объём работы. Диссертация изложена на 199 страницах машинописного текста, включая иллюстративный материал и список цитируемой литературы, и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследований, результатов исследований и их обсуждения, заключения и выводов. В работе представлено 28 рисунков и 10 таблиц. Список литературы включает 317 наименований, из которых 244 – иностранных.

1. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектом исследований служили первичные или зародышевые корни (главный, первого и второго порядка) 7-15-суточных проростков озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) трёх контрастных по морозоустойчивости сортов: Безостая 1 - маломорозоустойчивый, Мироновская 808 - среднеморозоустойчивый, Альбидум 114 – высокоморозоустойчивый. Часть экспериментов проводили на колеоптилях. Корни представляют собой удобную и информативную модель для выяснения роли цитоскелета в процессах роста и морфогенеза клеток и их ответных реакций на различные воздействия. Это связано с тем, что корни состоят из клеток, находящихся на разных стадиях роста и содержащих основные типы цитоскелетных структур,

характерных для растений. Кроме того, корни проявляют высокую чувствительность к цитоскелетным антагонистам.

Растения выращивали в лабораторных условиях в кюветах на водопроводной воде при освещённости 100 Вт/м^2 и 12-часовом фотопериоде.

Эксперименты проводили в соответствии с двумя схемами опытов (рис.1, 2), которые включали низкотемпературное закаливание разной продолжительности в течение 3-х (рис.1) и 7-ми суток (рис.2) при 3°C . Незакалённые растения выращивали при 23°C . К половине незакалённых 5-7-суточных проростков добавляли в среды выращивания растворы оризалина (10 мкМ) и АБК (30 мкМ), на которых они росли отдельно или вместе с этими препаратами 2-3 суток. В вариантах с закаливанием ингибитор или гормон добавляли за сутки до действия низких температур.

В отличие от ранее проведённых на кафедре опытов (Хохлова и др., 2004), в которых корни подвергали непродолжительной обработке раствором оризалина путём инкубации в течение 3-х часов, в наших экспериментах использовали длительное выращивание растений на растворе ингибитора в течение 2-3 суток.

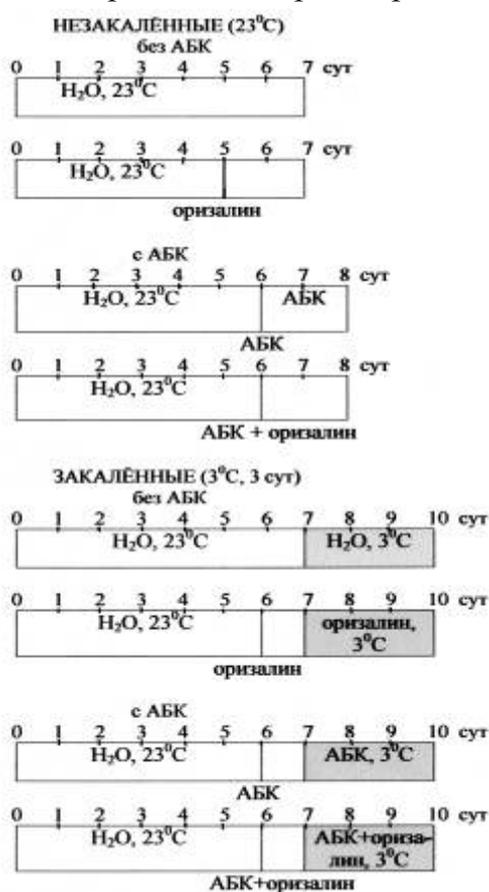


Рис.1. Схема опытов при 3-суточном закаливании.

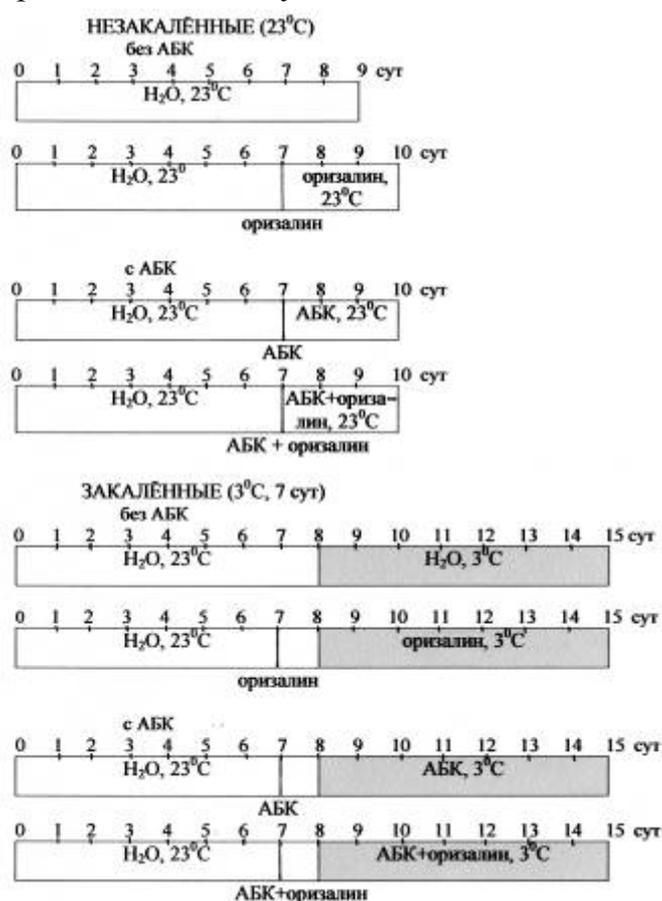


Рис.2. Схема опытов при 7-суточном закаливании.

В работе был использован методический подход, основанный на модификации структурного состояния цитоскелета *in situ* с помощью ингибиторов полимеризации тубулиновых и актиновых белков и последующей регистрации исследуемых показателей.



Определение ростовых и биометрических показателей корней. Измеряли длину корней (главного, первого и второго порядка) у 20 растений каждого варианта, число корней подсчитывали у 10 растений и определяли их биомассу путём высушивания при 105⁰С до постоянного веса.

Водоудерживающую способность (ВС) корней определяли рефрактометрическим методом (Гусев, 1960) по содержанию воды, оставшейся в образцах после инкубации в течение 1,5 ч в гипертоническом 20%-ном растворе индифферентного осмотика ПЭГ-6000 с осмотическим потенциалом -0,65 МПа. Количество оставшейся воды определяли по разности между общим содержанием воды в навеске и содержанием отнятой воды. Для расчёта извлекаемой из ткани воды использовали измеренный на рефрактометре (ИРФ-454Б) показатель преломления раствора ПЭГ-6000. Содержание общей и оставшейся воды рассчитывали в граммах на грамм сухого вещества.

Морфологический и цитогистологический анализы колеоптилей и кончиков корней проводили, используя визуальные наблюдения, световую микроскопию и микрофотографию. Подготовку образцов осуществляли по стандартной методике, описанной в работе (Паушева, 1988). Колеоптили и кончики корней длиной около 7-8 мм помещали в стеклянные бюксы с фиксатором Навашина и оставляли на 24 ч. Затем образцы отмывали дистиллированной водой в течение 3 ч. Проводку осуществляли, последовательно наливая в бюксы с образцами через каждый час растворы этанола в возрастающих концентрациях (10%-96%) и смеси бутанола с этанолом. Пропитывание тканей парафином в бюксах происходило в течение 2-3 недель, затем готовили парафиновые блоки с образцами. Продольные и поперечные срезы толщиной 20 мкм делали на микротоме (МС-2, Россия), для их окрашивания использовали гематоксилин («Serva», Германия). Срезы просматривали под световым микроскопом NU 2 (“Carl Zeiss Jena”, Германия) с помощью фотонасадки. Микрофотографирование срезов кончиков корней длиной 2,5-3 мм проводили на плёнке Микрат Изопан (Россия).

Цитоскелетные белки в экстрактах корней изучали методами одномерного ДДС-На электрофореза и иммуноблотинга (Olinevich et al., 2002). Содержание белков в

пробах определяли по Bradford (1976). Разделение полипептидов проводили в ПААГ (10%) с ДДС-Na, используя прибор для электрофореза Mini-Protein^R II dual slab cell system («Bio-Rad», США). Для вестерн-блот анализа полипептиды переносили на PVDF (поливинилидендифторид) – мембраны и инкубировали в растворах моноклональных α - , β -тубулиновых (№356 и №357, «Amersham», Швеция) и актиновых (№350, «Amersham») антител. В качестве вторичных антител использовали антимишиный IgG («Promega» и «Caltag Laboratories», США), конъюгированный с щелочной фосфатазой. На конечном этапе мембраны обрабатывали хемилюминесцентным раствором (Substrat Kit, «Bio-Rad»). Идентификацию белков проводили флюорографически.

Изучение актин-микротрубочковых взаимодействий проводили с использованием двойного ингибиторного анализа (Collings et al., 1996, Tominaga et al., 1997). Для этого корни инкубировали в растворах блокаторов полимеризации тубулиновых и актиновых белков при их отдельном и совместном действии. Были проведены две серии экспериментов, в которых наряду с оризалином в качестве актинсвязывающего агента использовали либо цитохалазин Д (10 мкМ), либо латрункулин Б (1 мкМ), тестирующим параметром актин-микротрубочковых взаимодействий являлась ВС клеток/тканей. При этом о наличии контактов между актиновыми и тубулиновыми структурами и взаимовлиянии одних компонентов на другие судили по реакции ВС на совместное и отдельное действие цитоскелет-модифицирующих агентов.

Статистическую обработку данных проводили с применением общепринятых математических методов (расчёт средних арифметических значений и их стандартных ошибок, определение критерия Стьюдента) средствами вычислительной программы Microsoft Excel.

Проведённые исследования были поддержаны Российским фондом фундаментальных исследований (грант №04-04-49318) и Академией наук РТ (фонд НИОКР, грант №03-3.9-115/2004).

2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Влияние оризалина на биометрические характеристики корней разных сортов озимой пшеницы в связи с закаливанием к низким температурам и обработкой АБК

Из данных рис.3. следует, что под влиянием оризалина (без АБК) происходило уменьшение длины корней незакалённых проростков в среднем на 21% - у главных и на 28% - у корней первого и второго порядка (табл.1), что указывает на ингибирование их линейного роста и вовлечение цитоскелета в ростовые процессы корней. До закаливания у маломорозоустойчивого сорта Безостой 1 рост корней подавлялся сильнее (на 33,3%), а у высокоморозоустойчивого Альбидум 114 – в меньшей степени (на 10,6%), то есть установлена обратная зависимость между ростингибирующим действием препарата и уровнем морозоустойчивости сорта. Наибольшее замедление роста, вызываемое оризалином, отмечено у более коротких корней первого и второго порядка (рис.3).

Следует отметить, что торможение ростовой функции корней коррелировало с оризалин-индуцированным накоплением их биомассы (табл.2). У маломорозоустойчивого сорта выявлено не только наибольшее замедление линейного роста корней, но и более значительное накопление их сухого веса (на 41,2%) под влиянием антицитоскелетного препарата.

На фоне АБК степень ингибирования роста незакалённых корней к оризалину существенно уменьшалась, особенно у Безостой 1 и Мироновской 808, что может быть связано со снижением содержания тубулиновых белков (рис.13) и начавшейся стабилизацией цитоскелета под влиянием гормона (Хохлова, Олиневич, 2003). Именно у этих сортов АБК также ослабляла эффект препарата на накопление биомассы

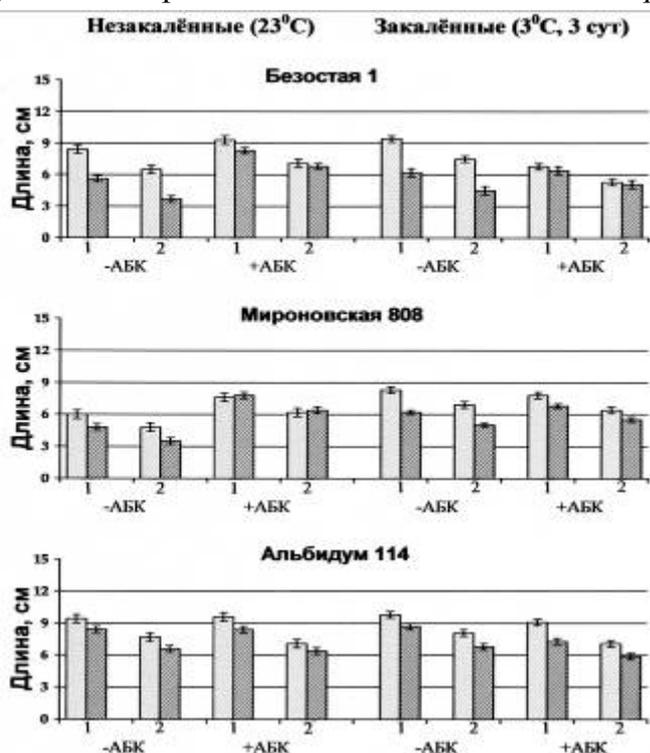


Рис.3. Влияние оризалина на длину корней незакалённых (23⁰С) и закалённых (3⁰С, 3 сут) проростков: □- контроль, ▨- оризалин (10 мкМ), 1 – главные корни, 2 – корни первого и второго порядка.

Таблица 1. Влияние оризалина на длину корней незакалённых (23⁰С) и закалённых (3⁰С, 3 сут) проростков, % ингибирования

Варианты	Зародышевые корни			
	Главный	Первого и второго порядка	Главный	Первого и второго порядка
	-АБК		+АБК	
Безостая 1				
Незакалённые	33,3	43,1	10,8	4,2
Закалённые	34,0	40,0	5,9	3,8
Мироновская 808				
Незакалённые	20,0	27,1	2,6*	3,2*
Закалённые	25,3	27,5	12,8	14,1
Альбидум 114				
Незакалённые	10,6	14,3	12,5	9,9
Закалённые	11,2	15,9	19,8	16,9

* Увеличение длины

Таблица 2. Влияние оризалина и абсцизовой кислоты (АБК) на сухой вес корней незакалённых (23⁰С) и закалённых (3⁰С, 3 сут) проростков

Варианты	Безостая 1		Мироновская 808		Альбидум 114	
	Сухая масса корней, % от сырого веса	Изменение сухой массы, % от контроля	Сухая масса корней, % от сырого веса	Изменение сухой массы, % от контроля	Сухая масса корней, % от сырого веса	Изменение сухой массы, % от контроля
НЕЗАКАЛЁННЫЕ (23 ⁰ С)						
- АБК						
Контроль	5,1±0,2	100	5,6±0,2	100	5,1±0,1	100
Оризалин	7,2±0,9	141,2	6,6±0,1	117,9	5,7±0,2	111,8
+АБК						
Контроль	4,8±0,2	100	5,4±0,1	100	6,8±0,5	100
Оризалин	5,7±0,4	118,8	5,7±0,2	105,6	7,6±0,3	111,8
ЗАКАЛЁННЫЕ (3 ⁰ С, 3 сут)						
- АБК						
Контроль	7,5±0,1	100	6,2±0,3	100	7,5±0,4	100
Оризалин	7,5±0,7	100,0	6,0±0,1	96,8	8,4±0,5	112,0
+ АБК						
Контроль	7,2±0,3	100	6,7±0,5	100	8,4±0,6	100
Оризалин	6,8±0,2	94,4	7,5±0,4	111,9	8,8±0,5	104,8

корней (табл.2), вероятно, за счёт частичного восстановления их ростовой функции (рис.3). При 3-суточном закаливании сохранялась та же направленность, что и у корней незакалённых растений: ростигибирующий эффект препарата снижался с повышением морозоустойчивости сорта. При совместной обработке низкими температурами и АБК гормон снимал ингибирующее действие гипотермии на длину корней в большей степени у Безостой 1, в меньшей – у Мироновской 808, а у Альбидум 114 чувствительность корней к оризалину в этих условиях повышалась (рис.3, табл.1).

В следующей серии опытов наряду с 3-суточной закалкой растения подвергали более длительному действию низких температур в течение 7 суток, что соответствовало оптимальному периоду для полного прохождения первой фазы закаливания (Туманов, 1979). Обнаружено укорочение главных корней незакалённых проростков под влиянием оризалина, которое возрастало в ряду Альбидум 114 (16,1%) → Безостая 1 (23,9%) → Мироновская 808 (28,2%) (рис.4, табл.3). По сравнению с результатами опытов (рис.3, табл.1) в этих экспериментах наибольшее уменьшение длины корней отмечено у среднеморозоустойчивого сорта, который характеризовался повышенным уровнем тубулиновых белков (рис.13). АБК, как и более длительное закаливание (3⁰С, 7 сут), значительно снижала рост-замедляющее действие препарата на первичные корни исследуемых сортов (рис.4). Следует отметить, что АБК и закаливание (без оризалина), в отличие от предыдущих опытов, вызывали уменьшение длины корней, а на фоне ингибитора снижение ростовой функции корней в основном усиливалось, но в меньшей

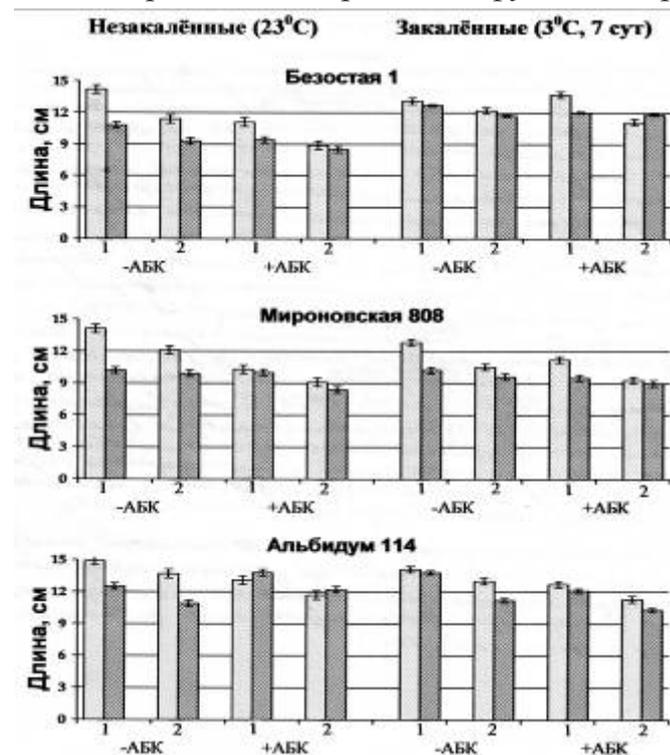


Рис.4. Влияние оризалина на длину корней незакалённых (23⁰С) и закалённых (3⁰С, 7 сут) проростков: □- контроль, ▨- оризалин (10 мкМ), 1 – главные корни, 2 – корни первого и второго порядка.

Таблица 3. Влияние оризалина на длину корней незакалённых (23⁰С) и закалённых (3⁰С, 7 сут) проростков, % ингибирования

Варианты	Зародышевые корни			
	Главный	Первого и второго порядка	Главный	Первого и второго порядка
	-АБК		+АБК	
Незакалённые Закалённые	Безостая 1			
	23,9 3,6	18,4 4,1	15,3 13,7	4,5 6,3*
Незакалённые Закалённые	Мироновская 808			
	28,2 20,3	18,2 8,6	2,9 15,2	7,7 3,2
Незакалённые Закалённые	Альбидум 114			
	16,1 2,1	20,4 13,8	5,3* 4,7	4,3* 8,8

* Увеличение длины

степени, чем у гормон-необработанных и незакалённых растений (рис.4). По-видимому, эти результаты свидетельствуют о функциональном участии цитоскелета в АБК- и температуро-опосредованном торможении линейного роста растений.

При совместном действии гормона и низких температур отмечено разнонаправленное изменение ростовой функции корней исследуемых сортов (рис.4), вероятно, обусловленное неодинаковым содержанием АБК в клетках корней этих сортов и ослаблением роли гормона на более позднем этапе закаливания (Veisz et al., 1996).

2.2. Морфогенные эффекты оризалина на корни разных сортов озимой пшеницы, адаптированных к низким температурам и обработанных АБК

2.2.1. Влияние оризалина на морфологию целых корней

Вышерассмотренные биометрические результаты по изучению влияния оризалина на длину корней в основном совпадают с визуальными морфологическими наблюдениями, представленными на рис.5. Видно, что оризалин вызывает укорочение корней и образование на их кончиках луковичеподобных утолщений (известных в литературе под названием свэллинг) у незакалённых проростков всех трёх сортов. По размеру эти апикальные расширения были больше у корней Мироновской 808 (рис.5), что может быть связано с более высоким содержанием в клетках корней

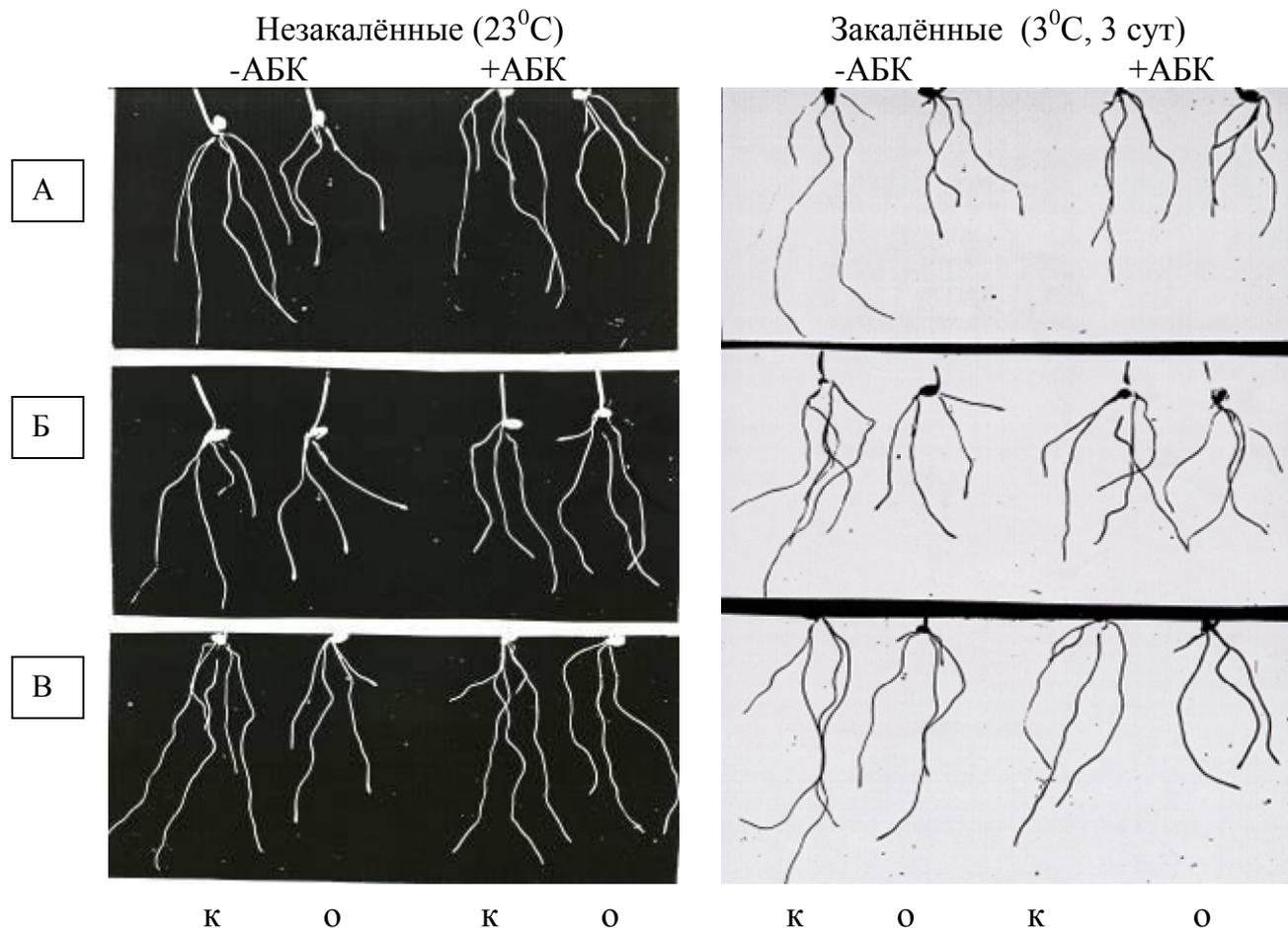


Рис.5. Влияние оризалина на морфологию корней проростков разных сортов озимой пшеницы, выращенных на воде и растворе АБК: А – Безостая 1, Б – Мироновская 808, В – Альбидум 114; к – контроль, о – оризалин.

этого сорта тубулинов (рис.13), являющихся мишенями для ингибитора. По литературным данным, набухание апексов корней обусловлено ингибированием полимеризации МТ, поскольку оризалин, связываясь с тубулином, препятствует образованию новых МТ и, кроме того, вызывает разборку и исчезновение присутствующих в клетках тубулиновых структур (Morejohn et al., 1987). В клетках корней риса Gianì с сотр. (1998) наблюдали исчезновение кортикальных МТ, сопровождающееся изодиаметрическим набуханием клеток и расширением апексов.

Низкотемпературное закаливание, как и АБК, ослабляло оризалин-индуцированное набухание кончиков корней и особенно у среднеморозоустойчивого сорта. После совместной обработки растений гормоном и гипотермией деформирующие эффекты ингибитора на апексы корней Безостой 1 и Мироновской 808 практически исчезали, сохраняясь, хотя и в меньшей степени, при раздельном действии данных факторов. Это свидетельствует о синергетическом (взаимоусиливающем) влиянии гипотермии и гормона на морфологию кончиков корней менее морозоустойчивых сортов по сравнению с высокоморозоустойчивым (рис.5).

2.2.2. Сравнительное изучение эффектов оризалина на морфогенез coleoptилей и кончиков корней

На примере среднеморозоустойчивого сорта был проведён сравнительный цитогистологический анализ coleoptилей и кончиков корней. Из рис.6, где показаны продольные срезы кончиков корней, видно, что оризалин вызывал образование апикальных утолщений, начиная с меристематических клеток, интенсивно распространяющихся на зону растяжения. При этом клетки становились округлыми, часто неправильной формы и сильно увеличивались в размерах, что указывает на потерю полярности клеточного роста. Наиболее чёткое изменение формы клеток и их увеличение проявились на поперечных срезах корней (рис.7).

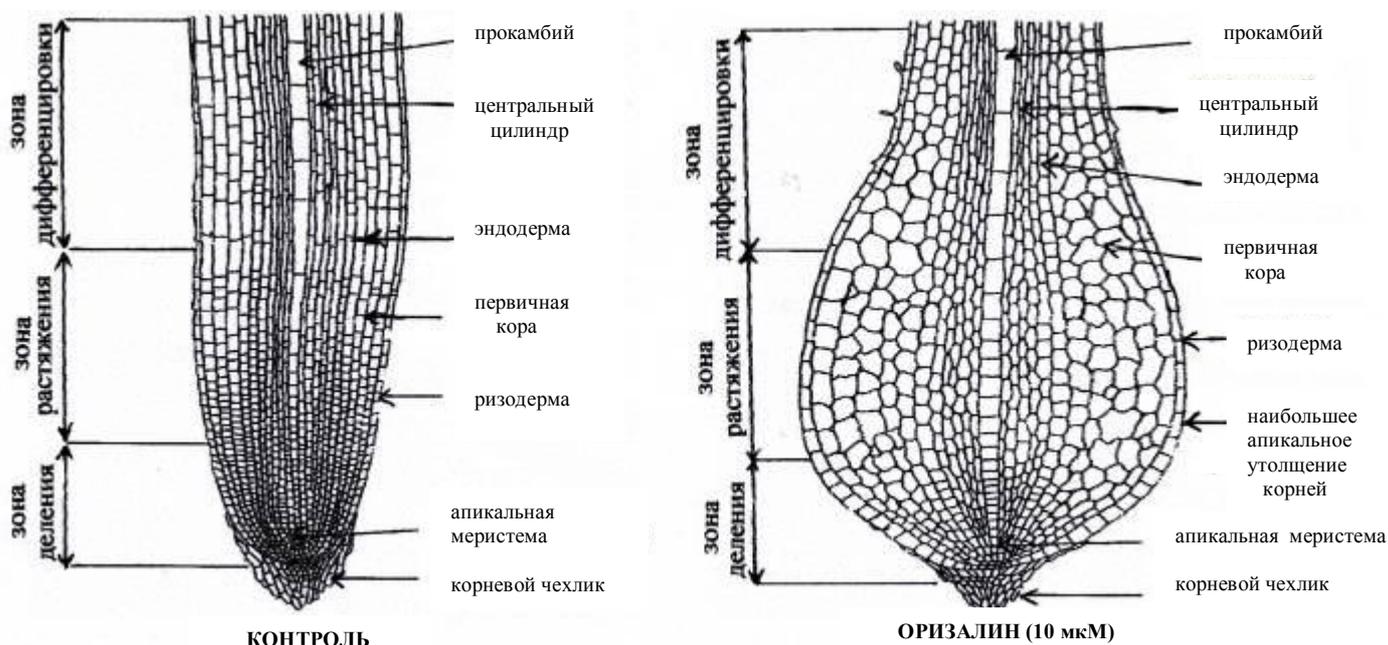


Рис.6. Продольный срез кончиков корней проростков Мироновской 808, выращенных на воде (контроль) в течение 4 суток и растворе оризалина (10 мкМ, 3 сут).

У coleoptiles отмечено лишь небольшое увеличение диаметра их основания и размера паренхимных клеток при обработке оризалином (рис.7). Морфогистологические данные подтверждаются визуальными наблюдениями, согласно которым препарат в большей степени ингибировал рост корней, чем coleoptiles (рис.8). Таким образом, можно заключить, что более высокая чувствительность корней к деструктивному действию оризалина, чем coleoptiles, возможно, связана с менее стабильным цитоскелетом в корнях, о чём свидетельствует более низкое соотношение актиновые/тубулиновые белки (Хохлова и др., 2004).

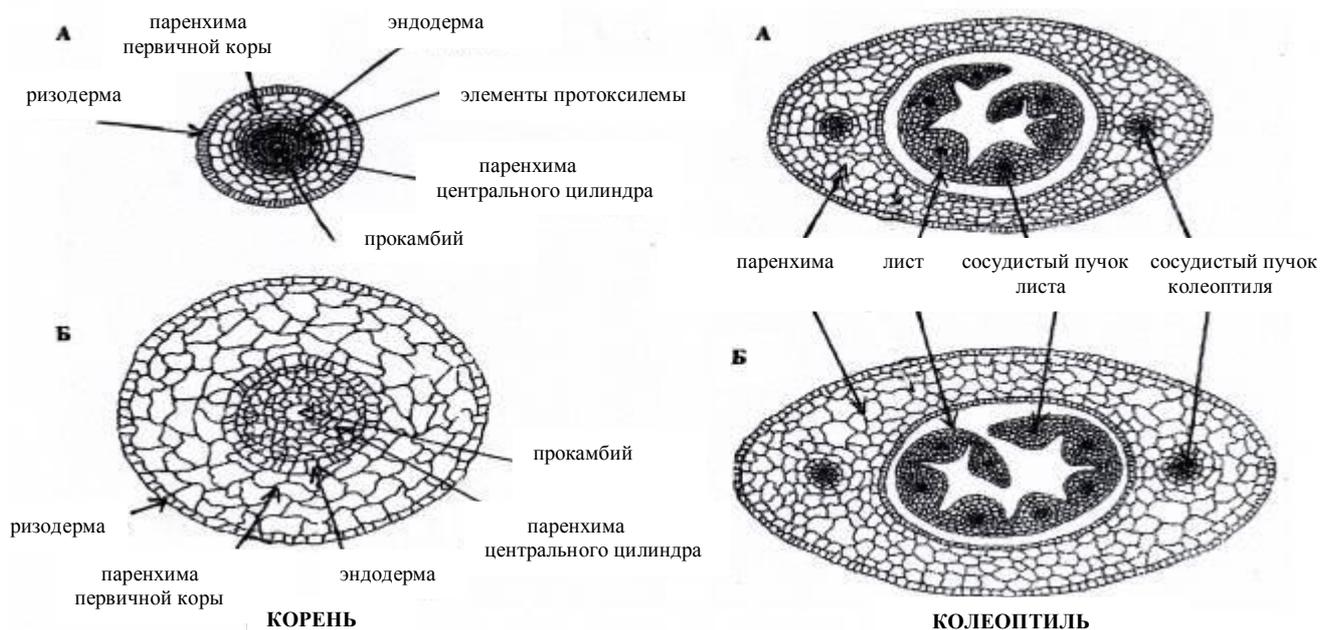


Рис.7. Поперечные срезы кончика корня и основания coleoptilia проростков Мироновской 808: А – контроль (вода, 4 сут), Б – оризалин (10 мкМ, 3 сут).

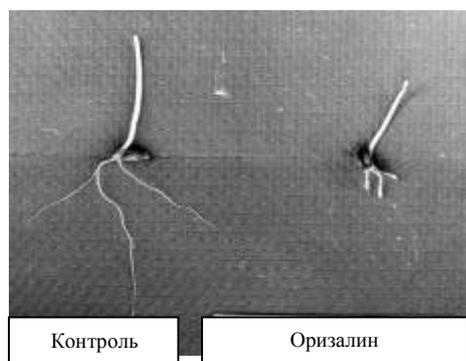


Рис.8. Проростки озимой пшеницы Мироновской 808, выращенные на воде (контроль) в течение 4 суток и растворе оризалина (10 мкМ, 3 сут).

2.2.3. Цитогистологический анализ индуцированного оризалином апикального утолщения корней

Для более детального исследования апикальных деформаций был проведён цитогистологический анализ продольных срезов апексов корней, подвергнутых действию низких температур и АБК. Из микрофотографий видно (рис.9, 10), что оризалин-индуцированное утолщение кончиков возрастало в ряду Альбидум 114 → Безостая 1 → Мироновская 808 и было наибольшим у незакалённых и закалённых растений среднеморозоустойчивого сорта. В радиальном направлении изменялись все

клетки корня, но особенно клетки коровой паренхимы, которые приобретали округлую или неправильную форму и более всего увеличивались в размерах, что указывает на потерю полярности клеточного роста. В большей степени вызываемые ингибитором изменения происходили в переходной зоне (постмитотическая меристема и дистальная часть элонгации), то есть на участках длиной 2,5-3 мм от кончика корня. По мнению Valuska с сотр. (2001), именно эта зона перехода является разновидностью сенсорной зоны, которая даёт возможность растущему апексу постоянно контролировать действие разных условий окружающей среды и влиять на соответствующие ответные реакции корней – замедление или стимуляцию их роста. Важно, что направленность сортовых различий в реакции корней на оризалин, которая усиливалась в ряду Альбидум 114 → Безостая 1 → Мироновская 808 (рис.9), была

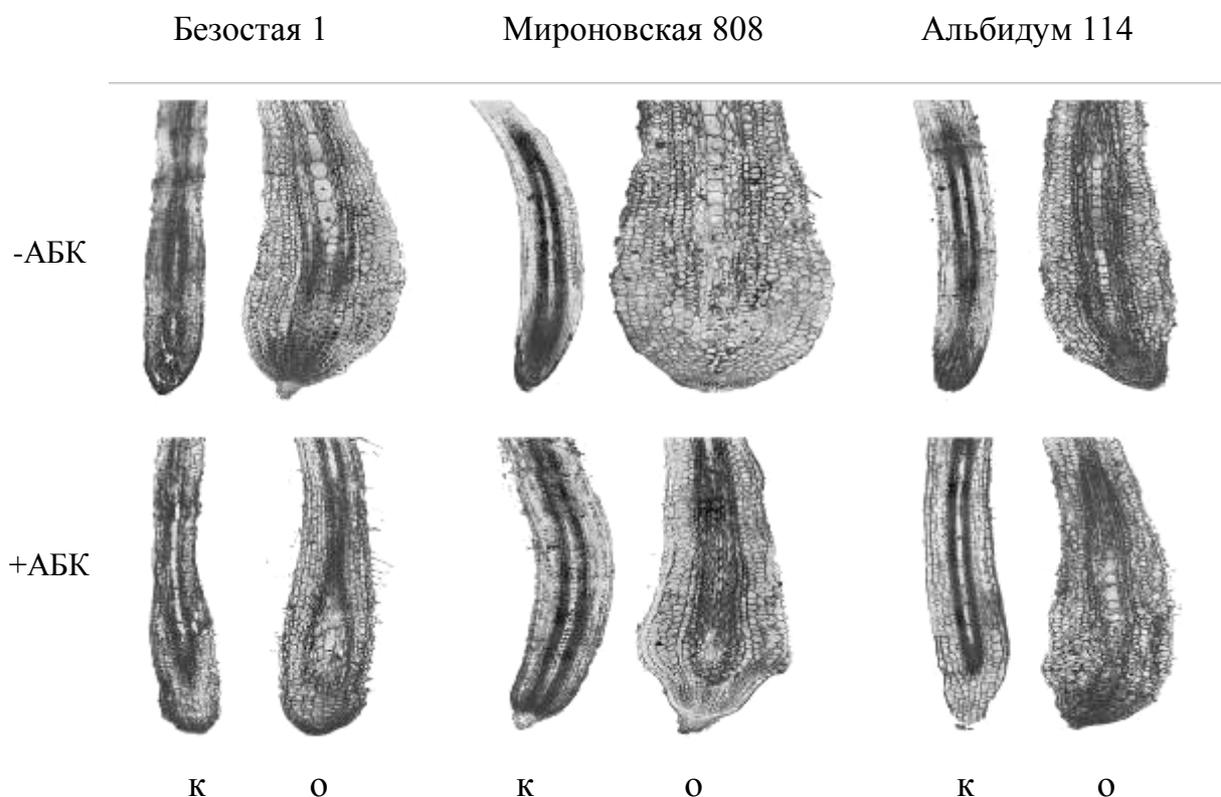


Рис.9. Продольные срезы кончиков корней незакалённых проростков (23⁰С) разных сортов озимой пшеницы, выращенных на средах без АБК и с АБК: К – контроль, О – оризалин, (увеличение x29) .

сходной с действием данного ингибитора на ростовые процессы корней (рис.4, 5). Этот результат можно рассматривать как указание на зависимость цитоскелетной регуляции роста и морфогенеза корней от уровня морозостойчивости.

АБК заметно уменьшала влияние оризалина на набухание кончиков корней Безостой 1 и Мироновской 808, в то время как на апексы корней Альбидум 114 не оказывала существенного влияния (рис.9). Низкотемпературное закаливание также снижало морфогенное действие препарата у всех трёх сортов (рис.10). Такие эффекты гормона и гипотермии могут быть связаны со стабилизацией цитоскелета, на что указывает снижение деполимеризующего влияния оризалина и криостресса (-7⁰С, 2 ч) на МТ и появление новых холодостойких популяций МТ с изменённым составом изо-

типов (Abdrakchamanova et al., 2003; Хохлова, Олиневич, 2003). Однако в этих условиях более утолщенными, по-прежнему, были кончики корней Мироновской 808.

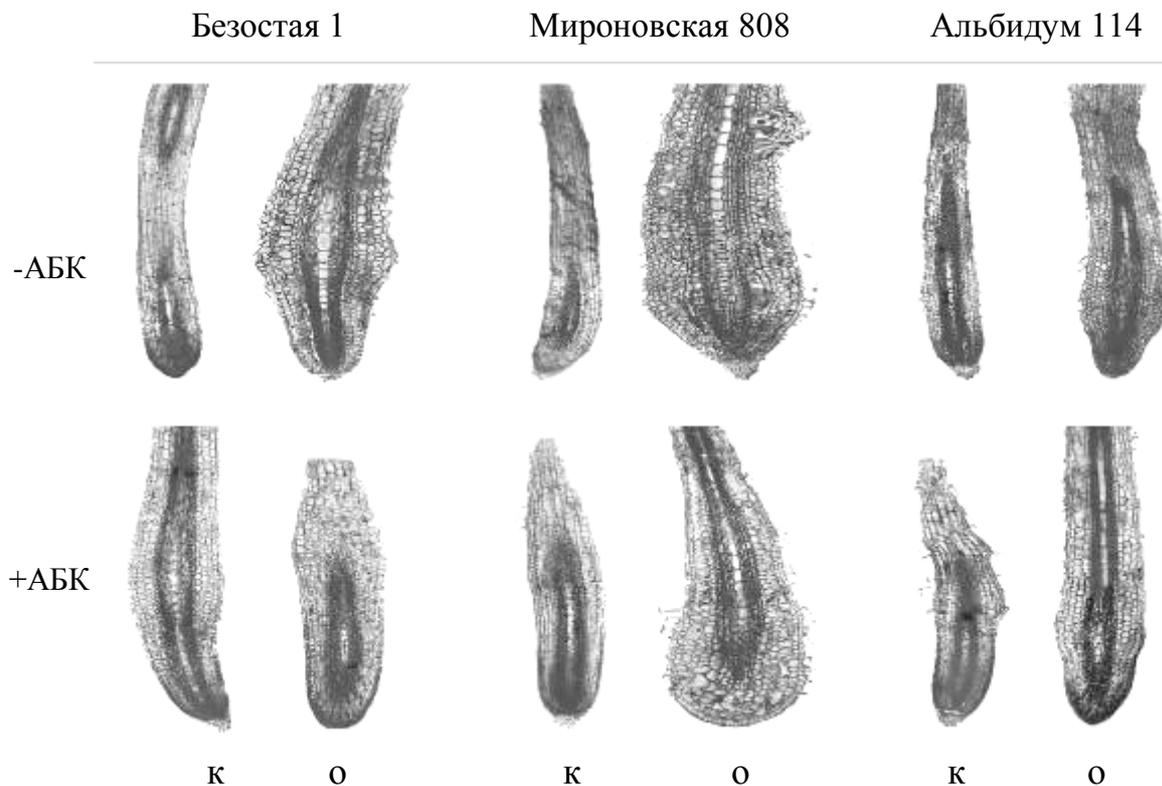


Рис.10. Продольные срезы кончиков корней закалённых проростков (3°C , 7 сут) разных сортов озимой пшеницы, выращенных на средах без АБК и с АБК : к – контроль, о – оризалин, (увеличение $\times 29$).

АБК почти полностью нивелировала реакцию закалённых корней на оризалин только у Безостой 1, поскольку у этого сорта расширение апекса не было отмечено (рис.10), то есть синергизм гормона и гипотермии прослеживался наиболее сильно. У Мироновской 808 синергизм этих двух факторов обнаруживался в меньшей степени, а у Альбидум 114 наблюдали его отсутствие. Полученные результаты свидетельствуют о том, что наибольшая способность экзогенного гормона к восстановлению нарушенного оризалином морфологического состояния кончиков корней сильнее проявляется при закаливании у маломорозоустойчивого сорта, что, по-видимому, связано с меньшим содержанием в клетках Безостой 1 эндогенной АБК, в отличие от более выносливых сортов (Veisz et al., 1996).

2.3. Влияние антицитоскелетных препаратов на водоудерживающую способность (ВС) корней разных сортов озимой пшеницы при низкотемпературном закаливании и действии АБК

2.3.1. Изменение ВС корней, обработанных оризалином

В связи с тем, что имеются данные о влиянии цитоскелета на процессы внутри- и межклеточного транспорта воды (Wayne, Tazawa, 1988; Жолкевич и др., 2001; Волобуева и др., 2001) и на осмотическую проницаемость клеток растений (Bochkareva

et al., 2005), представляло интерес выявить сходство и различия при действии АБК и закалывания на водный обмен корней, в частности, на ВС, которая является интегральным физиологическим показателем водного обмена растений, влияющим на ростовые процессы.

При проведении первой серии опытов с 3-суточным закалыванием обнаружено оризалин-индуцированное снижение ВС корней незакалённых проростков Безостой 1 и Альбидум 114 (рис.11), которое, возможно, обусловлено изменением состояния клеточной воды за счёт дегидратации филаментов цитоскелета и связанных с ним клеточных структур. Не менее важной причиной уменьшения ВС у этих сортов может быть усиление водопроницаемости мембран (Khokhlova et al., 1997), связанное со структурной реорганизацией аквапоринов вследствие замедления процессов их эндоцитоза (Elkjaer et al., 1995). У Мироновской 808, наоборот, выявлено повышение ВС корней относительно контроля (рис.11). Такое влияние оризалина на способность корней удерживать воду у этого сорта, вероятно, объясняется повышенным содержанием актина в клетках Мироновской 808 (рис.13), в результате чего может происходить закупорка водных каналов полимеризованными фрагментами актиновой сети, образующимися при различных стрессах (Collings et al., 1994; 1996). При совместной обработке гормоном и низкими температурами (3⁰С, 3 сут) выявлено их синергетическое действие только у Безостой 1, о чем свидетельствует почти полная потеря чувствительности ВС корней к оризалину по сравнению с понижающим эффектом этих факторов по отдельности (рис.11).

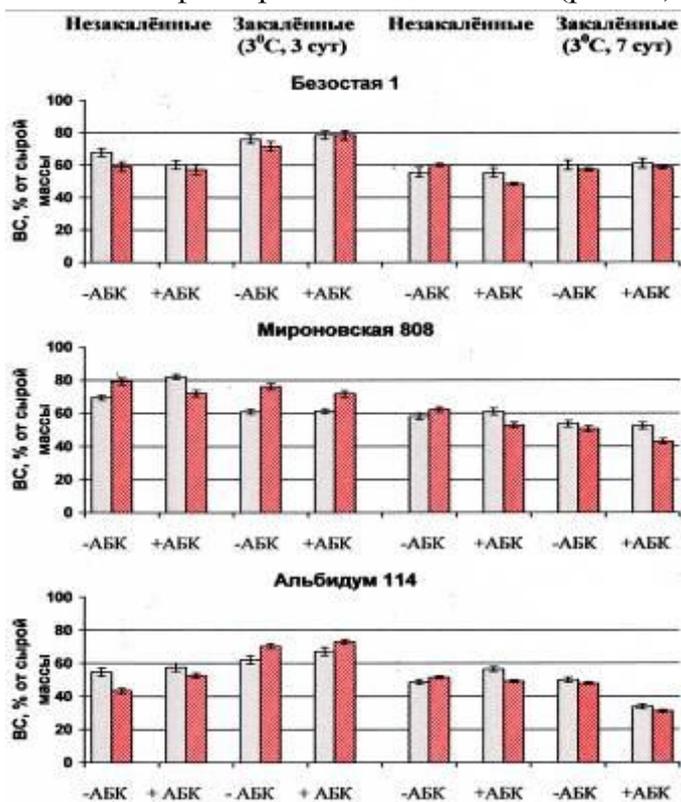


Рис.11. Влияние оризалина и абсцизовой кислоты (АБК) на ВС корней незакалённых (23⁰С) и закалённых (3⁰С, 3-7 сут) проростков: □ - контроль, ▨ - оризалин (10 мкМ).

В серии опытов при более продолжительном 7-суточном закалывании сортовые различия у незакалённых проростков были несколько сглажены в результате уменьшения реакции ВС на ингибитор (рис.11). В этих опытах оризалин вызывал

однонаправленное повышение ВС корней незакалённых проростков исследуемых сортов по сравнению с предыдущими экспериментами, что может быть обусловлено возрастными особенностями растений и более значительным вкладом в мембранный транспорт воды реорганизующихся актиновых филаментов.

2.3.2. Совместное действие оризалина и цитохалазина Д (или латрункулина Б) на ВС корней

Поскольку для сохранения структурной целостности и стабильности цитоскелета большое значение имеют актин-микротрубочковые взаимодействия, то для их изучения мы использовали двойной ингибиторный анализ (Collings et al., 1996; Tominaga et al., 1997).

Установлено, что чувствительность, в данном случае степень изменения ВС корней закалённых проростков, к одновременной обработке оризалином и цитохалазином Д, по сравнению с эффектом одного лишь цитохалазина Д, была меньше, чем до закаливания (сильнее это проявилось у Безостой 1) (рис.12, табл.4). Следовательно, на фоне гипотермии оризалин снимал «цитохалазиновый» эффект, но в меньшей степени, чем у незакалённых растений, что может указывать на менее значительное влияние тубулинового цитоскелета на актиновый и свидетельствовать о меньшем деструктивном действии МТ на актиновые филаменты. Кроме того, при адаптации к холоду прослеживается влияние и актинового цитоскелета на тубулиновый, поскольку цитохалазин Д у всех трёх сортов устранял эффект оризалина. По-видимому, эти

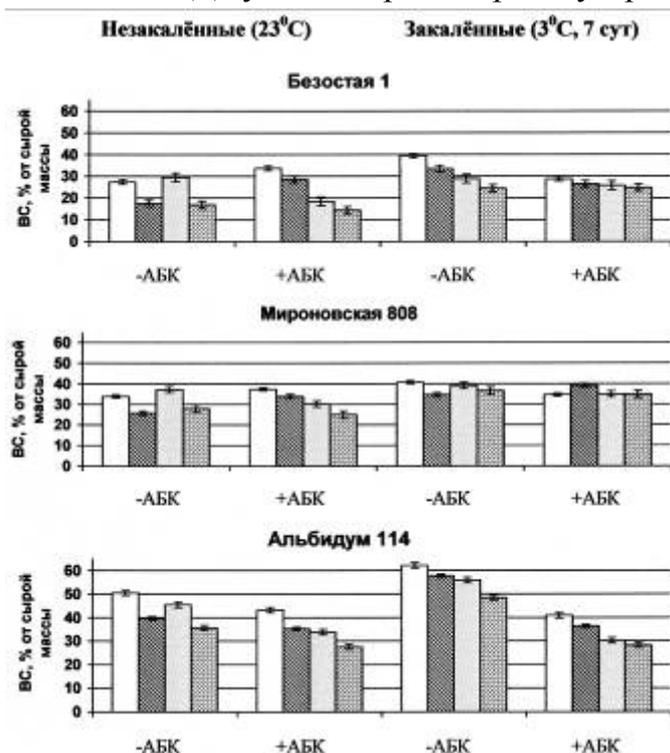


Рис.12. Влияние оризалина и цитохалазина Д на ВС корней незакалённых (23°C) и закалённых (3°C, 7 сут) проростков: □ - контроль, ▨ - оризалин (10 мкМ), ▩ - цитохалазин Д (10 мкМ), ▤ - оризалин + цитохалазин Д.

Таблица 4. Степень изменения ВС незакалённых (23°C) и закалённых (3°C, 7 сут) проростков под влиянием оризалина (О) и цитохалазина Д (ЦХ Д) (отн.ед.)

Варианты	-АБК	+АБК	-АБК	+АБК
	Незакалённые		Закалённые	
Безостая 1				
О	-0,56	-0,18	-0,14	-0,09
ЦХ Д	+0,07	-0,82	-0,37	-0,11
О+ЦХ Д	-0,61	-1,33	-0,61	-0,16
Мирововская 808				
О	-0,32	-0,10	-0,18	+0,12
ЦХ Д	+0,09	-0,23	-0,04	+0,01
О+ЦХ Д	-0,20	-0,50	-0,11	+0,01
Альбидум 114				
О	-0,28	-0,22	-0,08	-0,12
ЦХ Д	-0,11	-0,27	-0,11	-0,35
О+ЦХ Д	-0,41	-0,56	-0,28	-0,45

результаты являются отражением того, что низкие температуры упрочняют актин-микротрубочковую сеть, причём доминирующая роль в этом процессе, скорее всего, принадлежит МТ.

При использовании экзогенной АБК чувствительность ВС корней к совместной обработке ингибиторами уменьшалась по отношению к цитохалазину Д и усиливалась относительно одного оризалина (особенно у Безостой 1) по сравнению с гормононеобработанными проростками (рис.12, табл.4). В связи с этим на фоне АБК, очевидно, влияние тубулиновой сети на актиновую ослабевает и возрастает действие актиновых компонентов на тубулиновые. Учитывая данные о деструктивном эффекте гормона на компоненты цитоскелета – уменьшение содержания тубулиновых белков и МТ, интенсивности их флуоресценции, а также разрушение МФ (Олиневич, Хохлова, 2002), можно полагать, что АБК ослабляет актин-микротрубочковые контакты в результате деполимеризации актиновых филаментов.

Латрункулин Б в большинстве случаев действовал аналогично цитохалазину Д (данные не представлены). Однако этот агент сильнее, чем цитохалазин Д, влиял на способность корней удерживать воду и значительно изменял ВС. По-видимому, латрункулин Б является более специфичным ингибитором полимеризации МФ, что отмечено и в литературе (Auscough, 1998).

2.4. Содержание цитоскелетных белков в корнях при температурном и гормональном воздействиях

Учитывая, что анизотропный рост клеток и морфогенез растений зависят от полностью сформированного цитоскелета, главным образом, от МТ, МФ и связанных с ними белков (MAPs и ABPs) (Barlow, Valuska, 2000), в своей работе мы изучали тубулиновые и актиновые белки в экстрактах корней с помощью вестерн-блот анализа у растений 4-х вариантов: незакалённые без АБК, незакалённые с АБК, закалённые без АБК, закалённые с АБК.

Вестерн-блот-анализ с использованием моноклональных антител к тубулину и актину позволяет по интенсивности окрашивания полос на иммуноблотах судить о содержании белков (Giani et al., 1998). Интенсивность сигналов от тубулинов и актинов в экстрактах корней среднетемпературоустойчивого сорта была больше, чем у двух других сортов (рис.13), и это указывает на более высокое содержание цитоскелетных белков в корнях Мироновской 808. Не было обнаружено заметных различий в уровне тубулинов и актина между незакалёнными и закалёнными растениями.

Обработка незакалённых проростков АБК уменьшала количество тубулиновых белков в корнях всех исследуемых сортов, а актиновых – только у менее морозоустойчивых, в то же время актин Альбидум 114 оказался малочувствительным к действию экзогенного гормона (рис.13). При сравнении эффектов АБК на содержание цитоскелетных белков сделано заключение о большей стабильности актиновых структур, чем тубулиновых в корнях Альбидум 114, а также актинов этого сорта, в отличие от других сортов. Показано, что МФ различных растений выдерживали холодный стресс от 0°C до 4°C без изменения своей структуры, а МТ в этих условиях

разрушались (Quader et al., 1989; Astrom et al., 1991). Ингибиторный эффект АБК на тубулины и актины может быть следствием снижения синтеза цитоскелетных белков, вызываемого деструкцией цитоскелетной сети (Jiang et al., 1996; Олиневич, Хохлова, 2003).

При совместном действии низких температур и АБК уровни тубулинов и актина были больше, чем у растений, обработанных одной лишь АБК, то есть холодное закаливание снимало эффект гормона, причём значительнее у Альбидум 114 в экспериментах с тубулинами и у Мироновской 808 в опытах с актином (рис.13). По-видимому, влияние гипотермии на цитоскелетные белки проявляется только после изменения гормонального статуса клеток и связано с наиболее полным восстановлением организации цитоскелета в результате снижения содержания АБК и ослабления её роли на завершающих этапах низкотемпературной адаптации проростков.

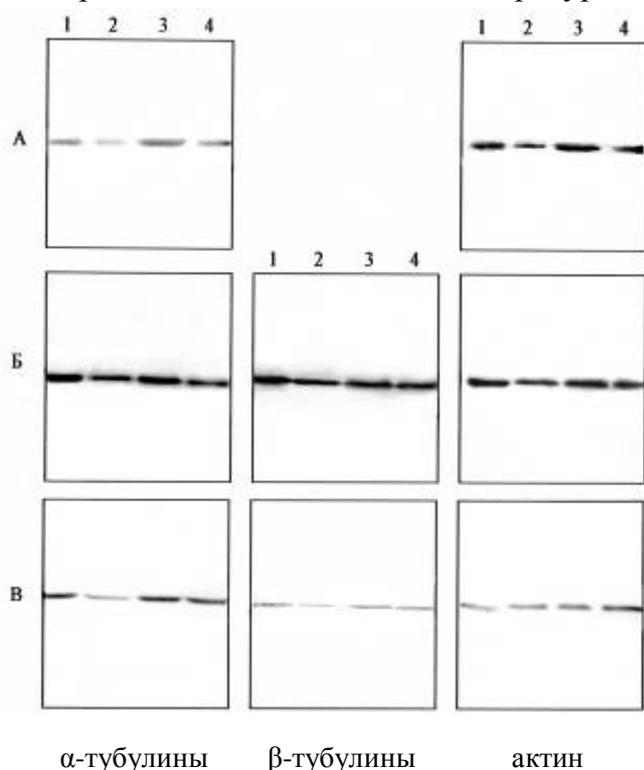


Рис.13. Иммуноблоты цитоскелетных белков корней проростков разных сортов озимой пшеницы.

А – Безостая 1, Б – Мироновская 808, В – Альбидум 114. 1 – незакалённые (23⁰С), без АБК; 2 – незакалённые, с АБК; 3 – закалённые (3⁰С, 7 сут), без АБК; 4 – закалённые, с АБК. Концентрация белка в каждой аликвоте 15 мкг.

2.5. Зависимость ростингибирующего и морфогенного эффектов оризалина от содержания цитоскелетных белков

Согласно довольно распространённой точке зрения рост клеток растяжением зависит от кортикальных МТ (Lloyd, Chan, 2004), однако, существуют и другие механизмы цитоскелетного контроля, связанные с вовлечением актиновых филаментов в процессы полярного клеточного роста. В ранее проведённых нами исследованиях показано, что 3-часовая инкубация корней в растворе оризалина, вызывая деполимеризацию МТ в разных зонах корня, не повлияла на размер и форму клеток (рис.14) (Хохлова и др., 2003). Однако после продолжительного выращивания растений на растворе оризалина (2-3 сут) мы наблюдали заметное замедление линейного роста корней и морфологические деформации их кончиков. Для объяснения зависимости реакции корней и их апексов на оризалин от содержания цитоскелетных белков следует иметь в виду сообщения о тесной физической колокализации МТ и МФ (Collings et al.,

1998; Hasezawa et al., 1998) и влиянии деполимеризации/разборки одной цитоскелетной сети на полимерное состояние и организацию другой (Tomimaga et al., 1997; Volkman, Baluska, 1999). В связи с этим можно полагать, что обнаруженные нами при длительном действии оризалина торможение ростовых процессов корней и радиальное расширение их апексов вызваны разборкой именно актиновых структур, запускаемой деструкцией взаимодействующих с ними МТ. Основанием для такого предположения является установленное в опытах возрастающее ингибирование оризалином роста корней и утолщение их кончиков в ряду Альбидум 114 → Безостая 1 → Мироновская 808 (рис.4, 9), которое соответствует таким же сортовым различиям в содержании актина (рис.13). Следовательно, чем больше в корнях содержится актина, тем значительнее ростиингибирующее и морфогенное влияние антимиотрубочкового агента на корни.

При закаливании чувствительность корней и их апексов к оризалину снижалась, но содержание тубулинов и актина практически не изменялось (рис.13). По-видимому, это свидетельствует об отсутствии прямой зависимости морфофизиологических ответов корней закалённых растений от массы цитоскелетных белков. Вместе с тем более низкая реакция корней на оризалин при адаптации к холоду, возможно, связана со стабилизацией цитоскелета (Олиневич, Хохлова, 2002; Abdrakchamanoва et al., 2003) и усилением вследствие этого актин-микротрубочковых контактов, на что указывают полученные нами результаты двойного ингибиторного анализа.

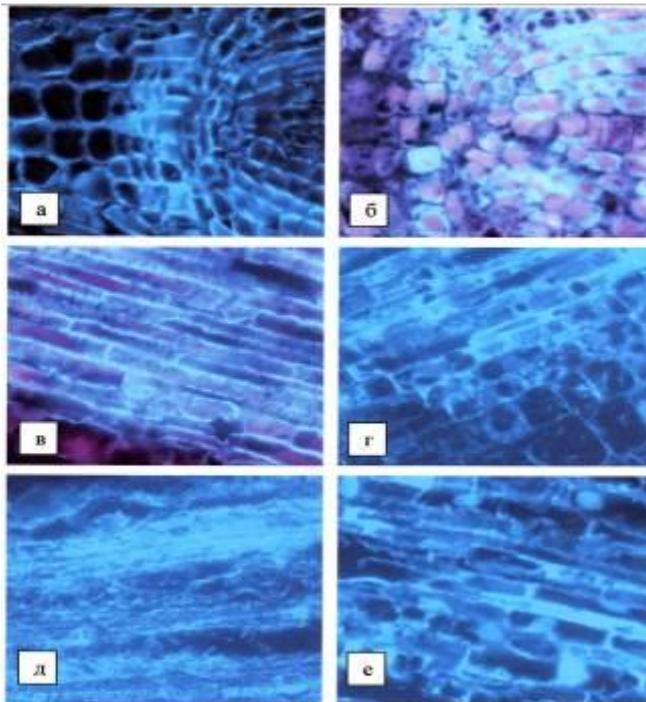


Рис.14. Иммунофлуоресцентная визуализация тубулинового цитоскелета в клетках зон меристемы (а,б), растяжения (в,г) и начала дифференцировки (д, е) корней контрольных (а, в, д) и опытных (б, г,е) обработанных оризалином (10 мкМ, 3 ч) проростков Мироновской 808 (Хохлова и др., 2003).

В отличие от низких температур, АБК, в основном, уменьшала содержание цитоскелетных белков (рис.13) и в то же время снимала ростиингибирующий и морфогенный эффекты оризалина на корни. Из этого следует, что ростовые и формообразовательные процессы корней при действии АБК контролируются уровнем тубулинов и актина, поскольку, чем их меньше, тем меньше корни реагируют на оризалин. Дополнительным фактором, снижающим чувствительность АБК-

обработанных корней к оризалину, может быть повышение стабильности МТ за счёт избирательной деструкции компонентов тубулинового цитоскелета (Хохлова, Олиневич, 2003) и, судя по данным двойного ингибиторного анализа, ослабления ассоциированности между МТ и МФ из-за деполимеризации последних. Торговые различия проявились в том, что в корнях Альбидум 114 тубулинов было меньше, чем в корнях двух других сортов, а уровень актина не изменялся после обработки АБК (рис.13), и это сопровождалось наименьшей реакцией апекса корня на оризалин (рис.10).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно общепринятой точке зрения, рост и морфогенез растений контролируются высокой динамичностью взаимодействий основных компонентов цитоскелетной сети – тубулиновых микротрубочек (МТ), актиновых микрофиламентов (МФ) и ассоциированных с ними белков (MAPs и ABPs) как между собой, так и с клеточной стенкой (Tominaga et al., 1997; Blancaflor, 2000; Baluska et al., 2003). При этом в процессах клеточного роста предпочтение отдаётся динамичности кортикальной F-актиновой сети (Volkman, Baluska, 1999; Nepler et al., 2001).

Принимая во внимание эти сведения, мы полагаем, что обнаруженные в работе нарушения клеточного роста и морфологии корней, вплоть до апикального утолщения, в ответ на продолжительное действие оризалина вызваны разборкой актиновых филаментов, запускаемой деполимеризацией взаимодействующих с ними МТ. Основанием для такого предположения является установленное в опытах возрастающее ингибирование оризалином роста корней и утолщение их кончиков в ряду Альбидум 114 → Безостая 1 → Мироновская 808, которое соответствовало таким же торговым различиям в содержании актина. Зависимость морфологических ответов корней на вызываемую оризалином деструкцию МТ от содержания цитоскелетных белков можно представить следующим образом. Повышенный уровень тубулинов в корнях Мироновской 808 по сравнению с другими сортами приводит к более сильному разрушению тубулинового цитоскелета и, следовательно, - к более значительной разборке связанной с ним кортикальной актиновой сети. Возникающие при этом нарушения трансмембранных взаимодействий F-актина с клеточной стенкой будут способствовать наибольшим эффектам апикального утолщения корней и вместе с тем интенсивному торможению их роста, что мы и наблюдали у среднеморозоустойчивого сорта.

Анализ имеющихся в литературе сведений и собственных экспериментальных данных позволил представить в виде схемы (рис.15) последовательность событий, отражающих зависимость процессов роста, морфогенеза и водообмена корней от структурного состояния цитоскелета. При составлении данной схемы мы исходили из существующего представления, согласно которому полярный рост и создание специфических форм клеток в большей степени контролируется актиновым цитоскелетом и, прежде всего, кортикальной F-актиновой сетью, тесно связанной с

сигнальными путями плазмалеммы и кортикальными МТ (Barlow, Baluska, 2000; Staiger, 2000; Клячко 2004, 2006).

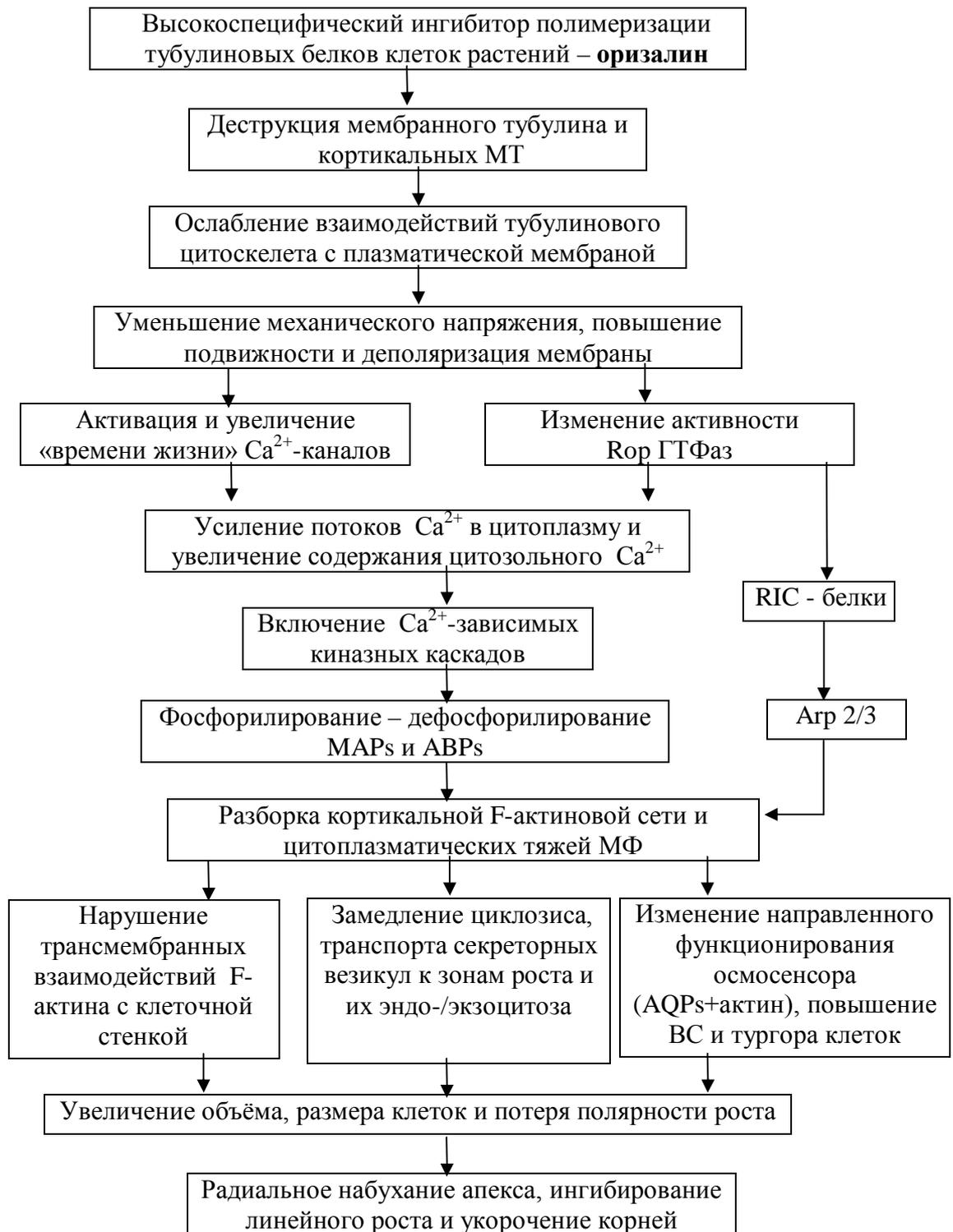


Рис.15. Механизм действия оризалина на рост и морфогенез корней: Rop ГТФазы – малые ГТФазы; MAPs – белки, ассоциированные с МТ; ABPs – актин-связывающие белки; RIC – белки, взаимодействующие с малыми ГТФазами; Arp2/3 – актин-белковый комплекс; AQPs – аквапорины; ВС – водоудерживающая способность.

ВЫВОДЫ

1. При выращивании проростков отличающихся по морозоустойчивости сортов озимой пшеницы на растворе высокоспецифического ингибитора полимеризации тубулиновых белков растительных клеток – оризалина впервые обнаружены сортовые различия в морфофизиологических изменениях корней, которые проявились в неодинаковом замедлении их линейного роста, увеличении биомассы и луковичеобразном утолщении кончиков, а также повышении водоудерживающей способности (ВС).
2. Цитогистологический анализ показал, что под действием оризалина происходило изменение в радиальном направлении всех клеток корня, но особенно коровой паренхимы; последние приобретали округлую или неправильную форму и более всего увеличивались в размерах вследствие потери полярности клеточного роста.
3. Реакция корней на оризалин была более выраженной, чем колеоптилей.
4. Впервые установлено, что содержание тубулинов и актина в корнях среднеморозоустойчивого сорта было больше по сравнению с мало- и высокоморозоустойчивым сортами. Холодовое закаливание нивелировало ингибирующий эффект АБК на цитоскелетные белки.
5. Деформирующее влияние оризалина на корни (укорочение, набухание апексов) возрастало в ряду высоко- → мало- → среднеморозоустойчивого сортов и коррелировало с содержанием актина в корнях. Это позволяет предполагать генотипически детерминированную зависимость морфофизиологических ответов корней на антимикротрубочковый агент от разборки актинового цитоскелета.
6. Низкотемпературное закаливание проростков, как и АБК, снижало или устраняло рост-замедляющий и морфогенный эффекты оризалина на корни. Наблюдаемое синергетическое действие гипотермии и АБК в большей степени характерно для корней маломорозоустойчивого сорта.
7. У закалённых и обработанных гормоном растений отмечены по-разному происходящие изменения ВС корней при совместном использовании ингибиторов тубулинового и актинового цитоскелета – оризалина и цитохалазина Д (или латрункулина Б) по сравнению с влиянием каждого из них по отдельности. По-видимому, эти различия обусловлены модификацией актин-микротрубочковых контактов – усилением (гипотермия) или ослаблением (АБК).

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Бондарева, А.И. Оризалин-индуцированные морфофизиологические изменения проростков озимой пшеницы / А.И. Бондарева, **М.В. Макарова** // Итоговая научно-студенческая конференция 2001 г.: Тез. докл. – Казань: Изд-во КГУ, 2002. – С.6.
2. Морфофизиологические ответы растений в связи с модификацией цитоскелета / Л.П. Хохлова, Н.Ю. Тараканова, Е.В. Рычкова, А.И. Бондарева, **М.В. Макарова** // Международная конференция «Экологическая ботаника: наука, образование, прикладные аспекты»: Тез. докл. – Сыктывкар. – 2002. – С.237-238.

3. **Макарова, М.В.** Сортовые особенности ответов растений озимой пшеницы на оризалин при температурном и гормональном воздействиях / М.А. Макарова // Итоговая научно-студенческая конференция 2002 г.: Тез. докл. – Казань: Изд-во КГУ, 2003. – С.11.
4. Хохлова, Л.П. Морфофизиологические ответы растений на действие антимиотического препарата оризалина / Л.П. Хохлова, О.В. Олиневич, **М.В. Макарова** // Доклады РАН. – 2003. – Т.390, №1. – С.122-126.
5. Morphofunctional approach at the study of the cytoskeleton role in the thermoadaptive potential in plants with different genotype / Khokhlova L.P., Olinevich O.V., **Makarova M.V.** et al. // Proceedings of the Joint International Scientific Conference “New Geometry of Nature”. – Kazan. – 2003. – P.144-155.
6. Роль цитоскелета в морфофизиологических ответах растений на действие адаптогенных факторов / Л.П. Хохлова, О.В. Олиневич, **М.В. Макарова**, М.А. Бочкарёва // Тез. докл. 5 съезда ОФР и Международной конференции «Физиология растений – основа фитобиотехнологии». – Пенза. – 2003. – С.352-353.
7. **Макарова, М.В.** Морфофизиологические ответы растений на действие антимиотического агента – оризалина, являются генотипически детерминированными / М.В. Макарова, А.И. Бондарева, М.А. Бочкарёва // Материалы ХLI Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс». – Новосибирск. – 2003. – С.24.
8. Системные исследования цитоскелета в связи с адаптацией растений к низким температурам / Л.П. Хохлова, О.В. Олиневич, **М.В. Макарова**, М.А. Бочкарёва // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Физиология растений и экология на рубеже веков». – Ярославль. – 2003. – С.139-141.
9. Роль цитоскелета в водном обмене растений разных генотипов озимой пшеницы / Л.П. Хохлова, О.В. Олиневич, **М.В. Макарова**, Л.Ш. Граханцева // Тез. докл. годовичного собрания ОФР и Международной научной конференции «Проблемы физиологии растений Севера». – Петрозаводск. – 2004. – С.195.
10. Биотехнологические аспекты фундаментальных исследований цитоскелета: идентификация маркеров стресс-устойчивости растений / Л.П. Хохлова, О.В. Олиневич, П. Ник, **М.В. Макарова** и др. // Материалы первой Международной научно-практической конференции «Медбиотек – 2005. Биологические и медицинские технологии: от научных результатов – к инновационным разработкам». – Москва. – 2005. – С.115-119.
11. Новые диагностические маркеры стресс-устойчивости растений / Л.П. Хохлова, О.В. Олиневич, **М.В. Макарова**, М.А. Бочкарёва // Материалы Всероссийской научной конференции «Современные аспекты экологии и экологического образования». – Казань: Изд. центр. КГУ, 2005. – С.493-496.
12. Цитоскелетный контроль роста и морфогенеза разных генотипов озимой пшеницы в связи с индукцией морозоустойчивости / Л.П. Хохлова, О.В. Олиневич, **М.В. Макарова**, М.А. Бочкарёва // Тез. докл. годовичного собрания ОФР и Международной

научной конференции «Физиологические и молекулярно-генетические аспекты сохранения биоразнообразия». – Вологда. – 2005. – С.176.

13. Морфофизиологические изменения корней разных генотипов озимой пшеницы в связи с деструкцией цитоскелета / Л.П. Хохлова, О.В. Олиневич, **М.В. Макарова**, М.А. Бочкарёва // Физиология растений. – 2006. – Т.53, № 3. – С.418-430.
14. Хохлова, Л.П. Реорганизация цитоскелета при действии на растения низких температур / Л.П. Хохлова, **М.В. Макарова** // Учёные записки КГУ. – 2006. – Т.148, кн.3. – С.65-88.
15. **Макарова, М.В.** Биосенсорика корней разных генотипов озимой пшеницы в связи с деструкцией цитоскелета при температурном и гормональном воздействиях / М.В. Макарова, Л.П. Хохлова // Тез. докл. годового собрания ОФР и конференции «Физиология растений – фундаментальная основа современной фитобиотехнологии». – Ростов-на-Дону. – 2006. – С.120.