

С. С. Медведев

ФИЗИОЛОГИЯ растений

Санкт-Петербург

«БХВ-Петербург»

2012

УДК 581.1
ББК 28.57
М42

Медведев С. С.

М42 Физиология растений: учебник. — СПб.: БХВ-Петербург, 2012. — 512 с.: ил. —
(Учебная литература для вузов)

ISBN 978-5-9775-0716-5

В учебнике отражены современные представления по основным направлениям физиологии растений — фотосинтезу, дыханию, водному обмену, минеральному питанию, мембранному и дальнему транспорту веществ, фитогормонам, росту и развитию, размножению растений, устойчивости и адаптации к неблагоприятным факторам среды и патогенам, вторичному метаболизму растений, системам регуляции физиологических процессов. В основу учебника положен общий курс лекций "Физиология и биохимия растений", читаемый автором для студентов биолого-почвенного факультета Санкт-Петербургского государственного университета. На сайте издательства находится электронный архив с иллюстрациями к книге.

*Для студентов и аспирантов биологических факультетов университетов,
педагогических и сельскохозяйственных вузов, а также для специалистов,
работающих в области физиологии растений*

УДК 581.1
ББК 28.57

Рецензенты:

А. М. Носов, д-р биол. наук, проф. кафедры физиологии растений МГУ им. М. В. Ломоносова, завотделом биологии клетки и биотехнологии Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН;
Кафедра физиологии и биохимии растений Нижегородского государственного университета им. Н. И. Лобачевского (завкафедрой — декан биологического факультета, д-р биол. наук, проф. *А. П. Веселов*).

*Ученым советом Санкт-Петербургского государственного университета
присвоен гриф «Учебник для студентов и аспирантов биологических факультетов университетов».*

Группа подготовки издания:

Главный редактор	<i>Екатерина Кондукова</i>
Зам. главного редактора	<i>Евгений Рыбаков</i>
Зав. редакцией	<i>Елена Васильева</i>
Редактор	<i>Анна Кузьмина</i>
Компьютерная верстка	<i>Наталья Караваевой</i>
Корректор	<i>Наталья Перишаква</i>
Дизайн серии	<i>Инны Тачиной</i>
Оформление обложки	<i>Марины Дамбиевой</i>
Фото	<i>Кирилла Сергеева</i>

Подписано в печать 14.05.12.

Формат 70×100^{1/16}. Печать офсетная. Усл. печ. л. 41,28.

Тираж 1500 экз. Заказ №

"БХВ-Петербург", 190005, Санкт-Петербург, Измайловский пр., 29.

Первая Академическая типография "Наука"
199034, Санкт-Петербург, 9 линия, 12/28

ISBN 978-5-9775-0716-5

© Медведев С. С., 2012
© Оформление, издательство "БХВ-Петербург", 2012

Оглавление

Список сокращений.....	1
Введение.....	3
Глава 1. Особенности строения растительной клетки.....	7
1.1. Ядро.....	9
1.2. Рибосомы.....	10
1.3. Пластиды.....	11
1.4. Митохондрии.....	13
1.5. Эндоплазматический ретикулум.....	16
1.6. Аппарат Гольджи.....	17
1.7. Вакуоль.....	18
1.8. Пероксисомы и глиоксисомы.....	19
1.9. Цитоскелет.....	19
1.9.1. Микротрубочки.....	20
1.9.2. Микрофиламенты.....	21
1.10. Клеточная стенка.....	22
1.10.1. Структура и функции клеточной стенки растений.....	23
1.10.2. Строение и синтез микрофибрилл целлюлозы.....	26
1.10.3. Строение и функции гемицеллюлоз.....	30
1.10.4. Строение и функции пектинов.....	31
Глава 2. Фотосинтез.....	33
2.1. Фотосинтетический аппарат растения.....	34
2.2. Пигменты хлоропластов.....	36
2.2.1. Хлорофиллы.....	36
2.2.2. Каротиноиды.....	45
2.2.3. Фикобилипротеины.....	48
2.3. Общее уравнение фотосинтеза.....	50
2.3.1. Источник выделения кислорода при фотосинтезе.....	51
2.3.2. Темновые и световые реакции фотосинтеза.....	52

2.4. Световые реакции фотосинтеза	53
2.4.1. Асимметрия распределения белковых комплексов в тилакоидных мембранах	55
2.4.2. Строение фотосистем I, II и комплекса цитохромов b_6/f	56
2.4.3. Антенные (светособирающие) комплексы	61
2.4.4. Разделение зарядов в фотосистемах	63
2.4.5. Фотоокисление воды	65
2.4.6. Z-схема фотосинтеза и транспорт электронов в фотосистемах I и II	66
2.4.7. Механизм транспорта электронов и протонов в комплексе цитохромов b_6/f	68
2.4.8. Циклический транспорт электронов и реакция Мелера	70
2.5. Фотофосфорилирование	71
2.5.1. Хемиосмотический механизм синтеза АТФ	72
2.5.2. Строение и функционирование АТФ-синтазного комплекса	73
2.6. Пути связывания углекислоты (темновые реакции фотосинтеза)	74
2.6.1. C_3 -путь фотосинтеза (Цикл Кальвина)	74
2.6.2. C_4 -путь фотосинтеза	78
2.6.3. Фотосинтез по типу толстянковых (САМ-метаболизм)	82
2.6.4. Фотодыхание и метаболизм гликолевой кислоты	84
2.7. Синтез крахмала и сахарозы	87
2.8. Транспорт ассимилятов	88
2.8.1. Строение флоэмы	89
2.8.2. Механизм флоэмного транспорта	90
2.9. Зависимость фотосинтеза от факторов внешней среды	92
2.9.1. Свет	92
2.9.2. Углекислота	95
2.9.3. Температура	98
Глава 3. Клеточное дыхание растений	101
3.1. История представлений о дыхании растений	102
3.2. Типы окислительно- восстановительных реакций	105
3.3. Гликолиз	108
3.3.1. Обращение гликолиза и глюконеогенез	111
3.4. Брожение	111
3.5. Цикл ди- и трикарбоновых кислот (цикл Кребса)	113
3.6. Превращение жиров в углеводы. Глиоксилатный цикл	118
3.7. Пентозофосфатный путь окисления глюкозы	120
3.8. Синтез АТФ в процессе окислительного фосфорилирования	123
3.8.1. Строение электрон-транспортной цепи митохондрий	123
3.8.2. Транспорт электронов во внутренней мембране митохондрий	127
3.8.3. Окислительное фосфорилирование	131
3.8.4. Механизм работы АТФ-синтазного комплекса митохондрий	134
3.9. Особенности клеточного дыхания растений	137

3.10. Цианид-устойчивое дыхание растений.....	137
3.11. Немитохондриальные электрон-транспортные цепи растительной клетки...	139
3.12. Зависимость дыхания от содержания кислорода и АДФ.....	140
3.13. Активные формы кислорода.....	142
Глава 4. Водный режим растений.....	145
4.1. Функции воды в растении.....	146
4.2. Структура и свойства воды.....	146
4.3. Водные растворы.....	149
4.4. Водный обмен растительных клеток.....	150
4.4.1. Формы воды в растительных клетках.....	150
4.4.2. Водный потенциал.....	152
4.4.3. Осмос.....	153
4.4.4. Транспорт воды в растительной клетке.....	154
4.4.5. Аквапорины.....	155
4.5. Водный баланс растения.....	156
4.5.1. Поглощение воды корнями.....	158
4.5.2. Транспирация.....	162
4.5.3. Передвижение воды по сосудистой системе растения.....	167
4.6. Водный обмен у растений различных экологических групп.....	172
Глава 5. Мембранный транспорт в растениях.....	175
5.1. Электрохимический потенциал.....	175
5.2. Виды мембранного транспорта.....	177
5.3. Первично-активный транспорт ионов. Ионные насосы.....	179
5.3.1. Транспортные АТФазы Р-типа.....	179
5.3.2. Протонные АТФазы V-типа.....	185
5.3.3. Транспортные пирофосфатазы — H ⁺ -РРазы.....	187
5.3.4. АВС-переносчики.....	188
5.4. Вторично-активный транспорт.....	190
5.4.1. Переносчики катионов.....	191
5.4.2. Анионные переносчики.....	194
5.4.3. Переносчики аминокислот и углеводов.....	196
5.5. Ионные каналы растений.....	196
5.5.1. Строение и функционирование ионных каналов.....	197
5.5.2. K ⁺ -каналы растительных клеток.....	199
5.5.3. Ca ²⁺ -каналы растений.....	202
5.5.4. Неселективные катионные каналы.....	204
5.5.5. Анионные каналы.....	205
5.5.6. Механочувствительные ионные каналы.....	207
5.6. Ионифоры.....	208
5.7. Метод пэтч-кламп регистрации ионного транспорта.....	210
5.8. Использование мембранных везикул для изучения мембранного транспорта ионов.....	212

Глава 6. Минеральное питание растений	215
6.1. Макроэлементы	217
6.1.1. Азот	218
6.1.2. Фосфор	219
6.1.3. Калий	220
6.1.4. Кальций	221
6.1.5. Сера	224
6.1.6. Магний	225
6.1.7. Кремний	226
6.1.8. Натрий	227
6.2. Микроэлементы	227
6.2.1. Железо	227
6.2.2. Медь	229
6.2.3. Цинк	230
6.2.4. Марганец	231
6.2.5. Молибден	232
6.2.6. Бор	233
6.2.7. Кобальт и никель	233
6.2.8. Хлор	234
6.3. Ассимиляция неорганических ионов растениями	234
6.3.1. Превращение азота в почве микроорганизмами	234
6.3.2. Фиксация азота клубеньковыми бактериями	236
6.3.3. Ассимиляция нитрата	242
6.3.4. Ассимиляция аммония	244
6.3.5. Ассимиляция сульфата	245
6.4. Микориза	247
6.5. Удобрения	248
6.6. Выращивание растений без почвы	250
Глава 7. Выделение веществ растениями	253
7.1. Способы секреции веществ у растительных организмов	253
7.2. Наружные секреторные структуры	254
7.2.1. Железки, железистые волоски	254
7.2.2. Нектарники	256
7.2.3. Солевые железки и волоски	257
7.2.4. Гидатоды	258
7.3. Внутренние секреторные структуры	259
Глава 8. Гормональная система растений	263
8.1. Понятие фитогормона	264
8.2. Ауксины	265
8.2.1. Метаболизм ИУК	266
8.2.2. Полярный транспорт ИУК	267

8.2.3. Механизм действия ИУК.....	270
8.2.4. Физиологическая роль ИУК.....	274
8.3. Гиббереллины.....	275
8.3.1. Синтез гиббереллинов	277
8.3.2. Механизм проведения гиббереллинового сигнала	279
8.3.3. Физиологическая активность гиббереллинов.....	284
8.4. Цитокинины.....	287
8.4.1. Метаболизм цитокининов в растениях	288
8.4.2. Механизм действия цитокининов.....	291
8.4.3. Физиологическое действие цитокининов	293
8.5. Абсцизовая кислота	295
8.5.1. Химическая структура и синтез абсцизовой кислоты	296
8.5.2. Механизм действия АБК	298
8.5.3. Физиологическая роль АБК в растении	303
8.6. Этилен	305
8.6.1. Синтез этилена и цикл Янга	306
8.6.2. Молекулярный механизм действия этилена.....	308
8.6.3. Физиологическая роль этилена в растениях	311
8.7. Брассиностероиды	314
8.7.1. Механизм действия брассиностероидов	315
8.7.2. Физиологическая роль брассиностероидов	317
8.8. Жасмонаты.....	319
8.8.1. Механизм действия жасмоновой кислоты.....	320
8.8.2. Физиологическая роль жасмонатов.....	322
8.9. Салициловая кислота.....	323
8.9.1. Биосинтез салициловой кислоты	323
8.9.2. Механизм действия салициловой кислоты при патогенезе	324
8.9.3. Физиологическая активность салициловой кислоты в растениях.....	325
8.10. Пептидные гормоны растений.....	326
Глава 9. Физиология роста и развития растений.....	329
9.1. Основные элементы в механизме морфогенеза растения.....	330
9.1.1. Гены и транскрипционные факторы — регуляторы развития растений.....	331
9.1.2. Эпигенетический контроль развития	335
9.1.3. МикроРНК.....	337
9.1.4. Полярность.....	338
9.1.5. Корреляции в ходе роста и морфогенеза	341
9.2. Меристемы.....	343
9.3. Рост растений	346
9.3.1. Деление клеток	346
9.3.2. Рост растяжением	348
9.4. Эмбриональный этап развития растительного организма	348
9.4.1. Формирование зародыша	350
9.4.2. Регуляция эмбриогенеза растений.....	352

9.4.3. Формирование семян	354
9.4.4. Формирование плодов	355
9.4.5. Покой семян	356
9.4.6. Апомиксис.....	357
9.5. Вегетативный этап онтогенеза растения	357
9.5.1. Прорастание семени.....	357
9.5.2. Апикальная меристема побега	358
9.5.3. Развитие листа	361
9.5.4. Развитие корня.....	364
9.5.5. Дифференциация сосудов.....	366
9.6. Генеративный этап развития.....	368
9.6.1. Инициация цветения	371
9.6.2. Формирование флоральных меристем	376
9.6.3. Формирование органов цветка.....	378
9.6.4. Формирование женского гаметофита.....	380
9.6.5. Формирование мужского гаметофита	382
9.6.6. Оплодотворение	384
9.7. Сенильный этап развития.....	384
Глава 10. Фотоморфогенез	385
10.1. Рецепция и физиологическая роль красного света.....	386
10.2. Рецепция и физиологическая роль синего света.....	392
Глава 11. Клонирование растений	397
11.1. Вегетативное размножение растений	397
11.2. Микрклональное размножение растений в культуре <i>in vitro</i>	399
Глава 12. Ростовые движения	405
12.1. Процессы раздражимости и возбудимости у растений.....	405
12.2. Тропизмы	407
12.2.1. Гравитропизм.....	407
12.2.2. Фототропизм.....	409
12.2.3. Гидротропизм и хемотропизм.....	409
12.2.4. Тигмотропизм	410
12.3. Настии	411
12.4. Круговые нутации.....	412
12.5. Насекомоядные растения	413
Глава 13. Физиология стресса.....	415
13.1. Водный дефицит и устойчивость к засухе	417
13.2. Устойчивость растений к низким температурам	419
13.2.1. Холодостойкость	419
13.2.2. Морозоустойчивость.....	420

13.3. Тепловой стресс	421
13.4. Адаптация растений к засолению.....	424
13.5. Адаптация растений к недостатку кислорода	426
13.6. Окислительный стресс.....	429
Глава 14. Защита растений от патогенов и фитофагов	431
14.1. Видовой иммунитет	432
14.2. Реакция сверхчувствительности	433
14.3. Системный приобретенный иммунитет растений	438
14.4. Индуцируемая системная устойчивость растений.....	440
14.5. Устойчивость растений к фитофагам	441
Глава 15. Вторичный метаболизм растений	445
15.1. Терпены.....	447
15.1.1. Моно-, сескви- и дитерпены	448
15.1.2. Стероиды и политерпены	450
15.2. Фенольные соединения	452
15.2.1. Синтез фенольных соединений.....	453
15.2.2. Кумарины	455
15.2.3. Флавоноиды	455
15.2.4. Лигнин	457
15.2.5. Танины	458
15.2.6. Сигнальные функции ряда фенольных соединений	459
15.3. Алкалоиды	459
15.4. Минорные группы вторичных метаболитов	462
15.4.1. Цианогенные гликозиды.....	462
15.4.2. Глюкозинолаты.....	463
Заключение	465
ПРИЛОЖЕНИЯ	467
Приложение 1. Список литературных источников, использованных при подготовке иллюстраций	469
Приложение 2. Описание электронного архива. Сайт интерактивных трехмерных моделей биомолекул	481
Рекомендуемая литература.....	483

Список сокращений

АБК — абсцизовая кислота

АГ — аппарат Гольджи

АДФ — аденозиндифосфорная кислота

АМФ — аденозинмонофосфорная кислота

АФК — активные формы кислорода

АФС — аденозин-5'-фосфосульфат

АЦК — аминокicloпропан-1-карбоновая кислота

БАП — бензиламинопурип

БС — brassиностероиды

БТШ — белки теплового шока

БЭП — биоэлектрический потенциал (потенциалы)

ВТМ — вирус табачной мозаики

ГА₁₋₁₁₀ (А₁₋₁₁₀) — гиббереллины

ГДФ — гуанозиндифосфорная кислота

ГК — гибберелловая кислота (ГА₃)

ГОГАТ — глутамин-2-оксoглутаратаминотрансфераза (глутаматсинтаза)

ГС — глутаминсинтетаза

ДКС — дальний красный свет (730 нм)

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖсК — жасмоновая кислота

ИУК — индолил-3-уксусная кислота (ауксин)

КС — красный свет (660 нм)

МеЖсК — метилжасмонат

ПВК — пировиноградная кислота (пируват)

Пц — пластоцианип

- РНК — рибонуклеиновая кислота
тРНК — транспортная РНК
рРНК — рибосомальная РНК
мРНК — матричная (информационная) РНК
РУБИСКО — рибулозобисфосфат-карбоксилаза/оксигеназа
РуБФ — рибулозо-1,5-бисфосфат
СВЧ — реакция сверхчувствительности
СК — салициловая кислота
ССК — светособирающий комплекс
ТФ — транскрипционный фактор
ФАЛ — фенилаланинаммонийлиаза
ФАР — фотосинтетически активная радиация
ФГА — фосфоглицериновый альдегид
ФГК — фосфоглицериновая кислота
Фд — ферредоксин
Фео — феофитин
ФЕП — фосфоенолпировиноградная кислота
Фп — флавопротеин
цАДФР — циклическая АДФ-рибоза
цит — цитохром
ЩУК — шавелевоуксусная кислота (оксалоацетат)
ЭР — эндоплазматический ретикулум
ЭТЦ — электронтранспортная цепь
СоА — коэнзим А
 Ψ_w — водный потенциал

Введение

Растение — это посредник между небом и землей. Оно как истинный Прометей, похитивший огонь с неба. Похищенный им луч горит и в мерцающей лучине, и в ослепительной искре электричества. Луч солнца приводит в движение и чудовищный маховик паровой машины, и кисть художника, и перо поэта. Однако до сих пор пока многое неясно в том, как луч света доходит до сознания поэта.

К. А. Тимирязев

Физиологией растений называют науку о функциях растительных организмов. Главная задача физиологии растений — изучение общих закономерностей и конкретных механизмов, лежащих в основе жизнедеятельности растений. К основным функциям растительного организма относятся его энергетика (процессы фотосинтеза и дыхания); водный режим и минеральное питание; мембранный и дальний транспорт веществ; процессы роста, развития и размножения; раздражимость и проведение сигналов в клетке и тканях; механизмы устойчивости и адаптации к неблагоприятным факторам. Физиология растений раскрывает закономерности протекания физиологических процессов в онтогенезе растительного организма и принципы его взаимодействия с окружающей средой.

Физиология растений изучает как минимум четыре типа превращений: превращение веществ, превращение формы, превращение энергии и превращение информации. Обмен веществом, энергией и информацией составляет основу деятельности любой саморегулирующейся системы, в том числе и растения. Под *обменом веществ* понимается превращение одних соединений в другие, их перемещение между различными клетками, тканями и органами, а также между организмом и внешней средой. *Превращение формы*, т. е. процессы формообразования (морфогенеза), происходит в течение роста, дифференцировки и развития растительного организма.

Превращение энергии включает процессы трансформации одних форм энергии в другие. Для трансформации энергии используются так называемые сопрягающие мембраны митохондрий и хлоропластов. При фотосинтезе, например, происходит превращение энергии света в электрическую энергию, которая затем трансформи-

руется в энергию химических связей органических соединений. Процесс дыхания включает последовательное превращение химической формы энергии в электрическую, механическую и, наконец, вновь в химическую.

Превращение информации имеет место в процессах рецепции и передачи сигналов и стимулов, исходящих как из внешней, так и из внутренней среды организма. Процессы рецепции и передачи информации о событиях, происходящих внутри растительного организма и вне его, обеспечиваются фитогормонами, системой рецепторов, каскадом вторичных посредников и факторами транскрипции. Каждая клетка и растение в целом обладают способностью адекватно оценивать параметры внешней и внутренней среды и быстро реагировать на их изменение. Превращение информации имеет решающее значение в процессах регуляции отдельных функций, их координации и обеспечении целостности растительного организма.

В последнее десятилетие получение нового знания о процессах, происходящих в растении, идет с постоянным ускорением и невозможно без использования методов смежных с физиологией растений наук — биохимии и молекулярной биологии, биофизики и генетики, цитологии и анатомии. В свою очередь, физиология растений является фундаментом современного растениеводства, обеспечивая теоретическую базу для всей системы мероприятий, лежащих в его основе.

Развитие физиологии растений, как и любой другой науки, зависит не только от новых идей, но и от новых методологий. Для физиологов растений в настоящее время наиболее эффективны современные методы, применяемые в молекулярной биологии, геномной и клеточной инженерии, в комбинации с классическими, используемыми в биохимии и биофизике растений. Такой подход позволяет по-новому увидеть проблемы, стоящие перед физиологией растений, и найти более конструктивные пути их решения. Это касается процессов роста и развития, механизмов внутри- и внеклеточной сигнализации, взаимоотношения между растением и микроорганизмами, поглощения и транспорта ионов, посттрансляционных превращений белков в клетке, адаптации к стрессовым воздействиям и т. д.

Большая часть знаний в физиологии растений получена с использованием методов, которые дают лишь дискретную информацию о происходящих процессах. Полученные таким образом результаты не всегда отражают реальную ситуацию и дают лишь усредненную или ситуативную картину происходящих событий. Подавляющее же число реакций, происходящих в клетках и тканях, идут в нелинейном или осциллирующем режиме. Поэтому для расшифровки механизма изучаемых процессов необходимо применять методы, с помощью которых удастся регистрировать пространственно-временные параметры происходящих событий, а не только их дискретные характеристики. Такие возможности дают ряд современных методов клеточной биологии, позволяющих контролировать динамику происходящих процессов в реальном времени и объеме без повреждения клеток.

Человек в своем обиходе постоянно пользуется миром растений. Растения дают нам кислород, необходимый для процессов дыхания и горения, основную массу пищи и лекарств, одежду и топливо, строительные материалы. Население Земли

ежегодно потребляет около 1 млрд тонн продуктов питания, что соответствует лишь около 0,5% всей энергии, запасаемой в результате фотосинтеза. Растения защищают почву от ветровой эрозии, оказывают влияние на климат, участвуют в очистке природной среды от возрастающего количества загрязнителей. Остатки растительных организмов сформировали грандиозные запасы горючего сырья, которое является основой современной энергетики и химической промышленности. Растениями создаются десятки тысяч различных веществ, которые служат пищей для большинства живых организмов.

Подсчитано, что в течение одного года в виде энергии солнечного излучения на поверхность Земли попадает $1,3 \cdot 10^{21}$ ккал, из которых 35% отражается в космос, остальная часть поглощается атмосферой, сушей и водой. И только $(3-6) \cdot 10^{17}$ ккал преобразуется в энергию химических связей органических соединений в процессе фотосинтеза растениями и микроорганизмами.

К настоящему времени в составе древесины уже запасено около 2400 млрд т биомассы. На долю животных и микроорганизмов при этом приходится 23 млрд т. Ежегодно в реакциях фотосинтеза связывается около 250—350 млрд т CO_2 , что эквивалентно 150—200 млрд т органической массы. Важной функцией растений, а также некоторых прокариотических организмов является выделение кислорода, который необходим для дыхания гетеротрофных организмов. Растения ежегодно поставляют в атмосферу Земли около 100—150 млрд т кислорода. На высоте около 25 км от поверхности Земли из кислорода формируется слой озона, который задерживает большую часть ультрафиолетового излучения, действующего губительно на все живые организмы.

В последнее столетие из-за интенсивного сжигания горючих полезных ископаемых (уголь, газ, нефть, торф) и вырубки лесов содержание углекислоты в атмосфере Земли стало возрастать в среднем на 0,23% в год. Это привело к увеличению содержания CO_2 в атмосфере с 0,027% (в доиндустриальную эпоху) до 0,036% в настоящее время. Этот процесс может иметь очень серьезные последствия для теплового режима нашей планеты из-за так называемого "парникового эффекта".

Причиной сохранения тепла внутри парника (или теплицы), как известно, является избыток углекислоты и водяных паров. Аналогичный процесс сейчас происходит и в планетарном масштабе. Поверхность Земли получает от Солнца энергию в виде инфракрасного излучения. Значительная часть этой энергии отражается в космос. Однако имеющиеся в атмосфере пары углекислоты и воды способны задерживать отражающееся поверхностью Земли тепло и сохранять его, т. е. вызывать "парниковый эффект". Возрастание концентрации углекислоты в атмосфере приведет к увеличению средней температуры на поверхности нашей планеты и изменению климата. Для предотвращения этих нежелательных процессов необходимо, чтобы содержание CO_2 в атмосфере не изменялось. Одним из наиболее эффективных способов поддержания постоянного уровня углекислоты является связывание ее растениями и микроорганизмами. Подсчитано, что более 200 млрд т CO_2 ежегодно

оказывается в составе органических соединений автотрофных организмов. Около 40% этой биомассы приходится на долю морского фитопланктона.

В результате фотосинтеза энергия поглощенного света запасается надолго: от минут и часов до сотен и даже миллионов лет (при образовании горючих ископаемых — нефти, природного газа, каменного угля, торфа). Основная масса используемых сейчас энергоносителей (уголь, природный газ, нефть) представляет собой продукты разложения наземных и морских растений, микроорганизмов и животных. Энергия, запасенная в них, миллионы лет назад была получена из солнечного света в процессе фотосинтеза. Известно, что годовое потребление энергии человечеством составляет более 10^{17} ккал и ежегодно возрастает. Нынешние разведанные и доступные энергетические ресурсы (нефть, газ, уголь, торф, горючие сланцы) оцениваются в 10^{19} — 10^{20} ккал. Нетрудно подсчитать, что эти запасы могут закончиться уже в течение XXI столетия.

Реальной и неисчерпаемой альтернативой существующим ныне видам энергии (помимо термоядерного синтеза) может служить только солнечная энергетика, которая основана на превращении энергии Солнца в электрическую (фотоэлементы, солнечные батареи). С другой стороны, в качестве топлива также эффективно могут использоваться и продукты фотосинтеза, в первую очередь такие, как целлюлоза интенсивно растущих видов древесных растений, трав и кустарников. Поэтому можно лишь сожалеть, что солнечной энергетике пока еще уделяется недостаточно внимания.

Задача предлагаемой вашему вниманию книги — дать современное состояние знаний в области физиологии растений на уровне университетского курса, поскольку с момента выхода моего предыдущего учебника "Физиология растений" прошло уже около 10 лет. В основу учебника положен общий курс лекций "Физиология и биохимия растений", читаемый автором для студентов биолого-почвенного факультета Санкт-Петербургского государственного университета.

Автор выражает благодарность своей жене, кандидату биологических наук Г. Н. Смоликовой за подготовку рукописи к изданию, неоценимую помощь и постоянную поддержку при написании учебника, а также кандидату биологических наук Т. Е. Биловой за чтение рукописи и сделанные замечания. Заранее благодарю всех, кто возьмет на себя труд высказать свои отзывы и критические замечания по поводу моей книги.



Глава 1

Особенности строения растительной клетки

Наука строится из фактов, как дом построен из камней, но накопление фактов — не больше наука, чем куча камней — дом.

Г. Пуанкаре, 1905

Высшие растения являются многоклеточными организмами, состоящими из миллионов клеток, выполняющих специализированные функции. Несмотря на то, что дифференцированные клетки могут сильно отличаться друг от друга, все они, как клетки эукариотического организма, содержат ядро, цитоплазму, ряд клеточных органелл и систему мембран, которая не только отделяет клетку от окружающей среды, но и разделяет на компартменты ее внутреннее содержимое (рис. 1.1).

Специфическими особенностями строения растительных клеток, отличающими их от клеток других эукариотических организмов, является наличие системы пластид, крупной центральной вакуоли, а также прочной полисахаридной клеточной стенки. Растительная клетка содержит три относительно автономных, но тесно взаимодействующих между собой генетических системы — ядерную, митохондриальную и пластидную. Для растительных клеток характерен особый тип роста — рост растяжением. У делящихся растительных клеток отсутствуют центриоли. Поскольку клеточные стенки клеток одной ткани или органа непосредственно контактируют друг с другом, то возникает единая система клеточных стенок, которая называется *апопластом*.

Растительные клетки связаны между собой плазмодесмами, которые соединяют их в единое цитоплазматическое целое — *симпласт*. Каждая *плазмодесма* представляет собой мембранную пору (канал), выстланную плазмалеммой (рис. 1.2).

Центральную часть поры занимает *десмотрубка*, которая связывает эндоплазматический ретикулум соседних клеток в единое целое. Непрерывную систему мембран эндоплазматического ретикулума, переходящую из клетки в клетку, называют *эндопластом*. Вокруг десмотрубки в поре находится цитоплазма. Таким образом, у растительных организмов имеются три типа протяженных компартментов — апопласт (клеточная стенка с межклетниками), симпласт и эндопласт (соответственно цитоплазма и эндоплазматический ретикулум соседних клеток, соединенные плазмодесмами). По плазмодесмам (симпласту или эндопласту) из клетки в клетку могут диффундировать ионы и небольшие органические молекулы.

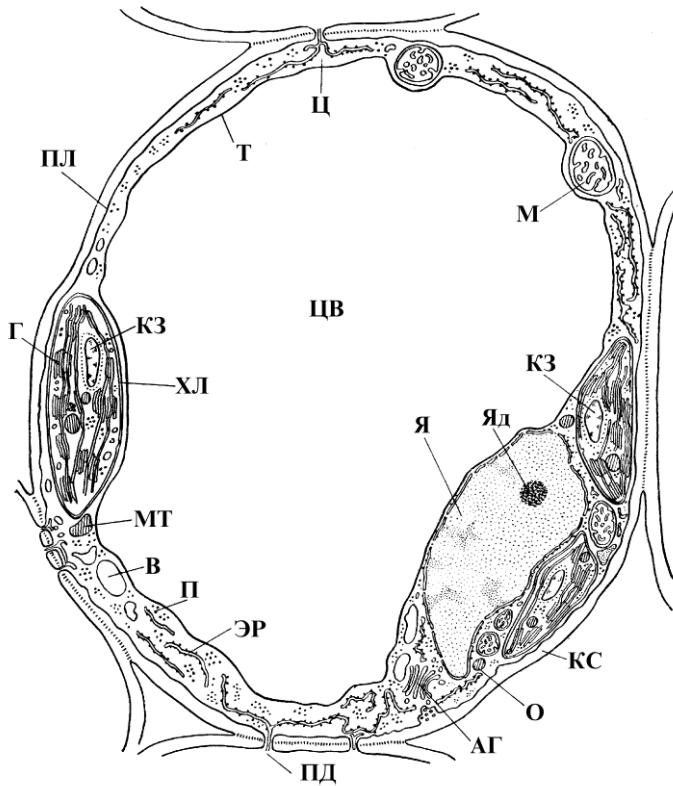


Рис. 1.1. Схема строения клетки мезофилла листа липы *Tilia cordata* (Васильев и др., 1978):

М — митохондрия; ЦВ — центральная вакуоль; Ц — цитоплазма; Т — тонопласт;

ПЛ — плазмалемма; Г — грана; КЗ — крахмальное зерно; ХЛ — хлоропласт;

МТ — микротело; В — цитоплазматическая вакуоль; П — полисома;

ЭР — эндоплазматический ретикулум; ПД — плазмодесма; АГ — аппарат Гольджи;

О — олеосома; КС — клеточная стенка; Я — ядро; Яд — ядрышко

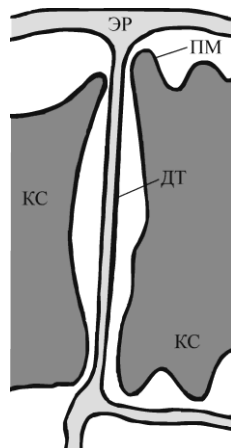


Рис. 1.2. Схема строения плазмодесмы:

КС — клеточная стенка;

ДТ — десмотрубка;

ЭР — эндоплазматический ретикулум;

ПМ — плазматическая мембрана

1.1. Ядро

Ядро — это наиболее крупный и наиболее важный органоид клетки. Снаружи оно покрыто ядерной оболочкой, состоящей из двух элементарных мембран (внутренней и наружной), между которыми находится *перинуклеарное пространство*. Обе мембраны ядерной оболочки отличаются по структуре, свойствам и функциям. К *внутренней мембране* на всем ее протяжении примыкает слой конденсированного хроматина (гетерохроматина), представляющий собой комплекс нуклеиновых кислот и белков. *Наружная мембрана* в некоторых местах объединяется с эндоплазматическим ретикулулом.

Основная функция ядра — хранение и копирование генетической информации. Во внутреннем содержимом ядра (*нуклеоплазме*) находится весь набор ферментов и кофакторов, необходимых для экспрессии генов и репликации ДНК, а также различные РНК. В делящихся клетках хроматин организуется в *хромосомы*, число которых специфично для каждого вида растений. В некоторых растительных клетках может происходить многократная репликация ДНК, в результате чего образуется полиплоидный набор хромосом. У большинства растительных клеток имеется одно ядро диаметром около 10 мкм. Размеры ядер неодинаковы в клетках разных видов растений и в разных клетках различных тканей одного и того же растения. Относительно крупные ядра характерны для молодых меристематических клеток.

Помимо хранения и репликации генетического материала, ядро выполняет еще одну важную функцию — контроль за синтезом белка в клетке. В ядре происходит процесс транскрипции — синтез молекул мРНК с использованием ДНК в качестве матрицы. Синтезированные молекулы мРНК подвергаются в ядре ряду модификаций, после чего выходят в цитоплазму. Формирование субъединиц рибосом также происходит в ядре в специальных образованиях — *ядрышках*. Они не имеют ограничивающей мембраны и состоят из рибонуклеопротеинов — предшественников рибосом. Именно в ядрышках происходит синтез рРНК, ее созревание и сборка рибосомных субъединиц. Ядрышко формируется на участке хроматина, кодирующем рРНК, который называется *ядрышковым организатором*.

Двухслойная ядерная оболочка пронизана порами — транспортными каналами, через которые перемещаются различные молекулы между ядром и цитоплазмой. У растений поры могут занимать от 8 до 20% поверхности ядерной оболочки. *Ядерная пора* не является простым отверстием, а представляет собой сложную структуру, называемую *ядерным поровым комплексом*, который функционирует как селективное молекулярное сито (сеть). Поровые комплексы млекопитающих, дрожжей и растений хотя и различаются по молекулярной массе (50—125 МДа), но имеют сходное строение и состоят из белков, называемых *нуклеопоринами*. Во время митоза ядерные поры распадаются на комплексы массой около миллиона дальтон, а после завершения клеточного деления собираются вновь. Поровый комплекс имеет октогональную симметрию (рис. 1.3).

Его основу составляют параллельно расположенные кольца — *ядерное* и *цитоплазматическое*. К ядерному кольцу прикреплены направленные внутрь ядра ядер-

ные филаменты, к которым крепится терминальное кольцо. Ядерное кольцо, ядерные филаменты и терминальное кольцо вместе формируют ядерную корзину. К цитоплазматическому кольцу прикреплены направленные в цитоплазму цитоплазматические филаменты. К ядерному и цитоплазматическому кольцам примыкают внешние и внутренние спицевые (люминальные) кольца (*spoke rings, lumen rings*), к которым крепятся структуры, получившие название спиц (по аналогии со спицами тележного колеса). Спицы поддерживают расположенный в центре порового комплекса центральный канал (транспортёр), по которому осуществляется транспорт молекул.

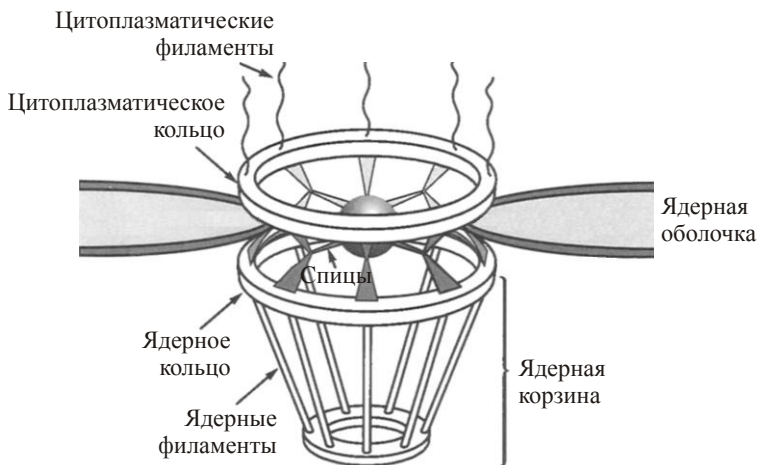


Рис. 1.3. Строение ядерной поры (по Xu and Meier, 2007)

Небольшие метаболиты диффундируют через пору пассивно, а транспорт макромолекул больше чем 40 кДа (белки, РНК, рибосомные субъединицы) идет селективно и с затратой энергии. Из цитоплазмы в ядро могут транспортироваться только белки, которые содержат специфическую сигнальную аминокислотную последовательность. В регуляции транспорта принимают участие ядерные рецепторы (кариоферины), *Ran*-тип ГТФаз и белки-переносчики (транспортинны и импортинны). *Ran* ГТФазы контролируют взаимодействие между рецепторами и переносимыми через пору соединениями. *Транспортинны* обеспечивают перенос веществ из ядра в цитоплазму, *импортинны* — из цитоплазмы в ядро. *Кариоферины* обеспечивают рецепцию сигналов экспортируемых или импортируемых соединений.

1.2. Рибосомы

Рибосомы являются местом синтеза (*трансляции*) белков из отдельных аминокислот на основе генетической информации, предоставляемой мРНК. Рибосомы и комплекс Гольджи были открыты с помощью электронной микроскопии нобелевским лауреатом Джорджем Паладе (G. Palade, 1955).

Рибосомы и их субъединицы обозначают по величине константы седиментации, которую выражают в сведбергах ($1S = 10^{-13}$ с). Рибосомы эукариот включают четыре типа молекул рибосомальной РНК — 5S-рРНК, 5.8S-рРНК, 18S-рРНК и 28S-рРНК. Каждая рибосома состоит из двух нуклеопротеиновых субъединиц (малой — 40S и большой — 60S), которые удерживаются вместе ионами Mg^{2+} . *Малая субъединица рибосом* состоит из одной молекулы 18S-рРНК и 30—35 молекул белков. *Большая субъединица рибосом* содержит по одной молекуле 5S-рРНК, 5.8S-рРНК и 28S-рРНК, а также 45—50 молекул белков.

Различают два основных типа рибосом. Для всех прокариот свойственны 70S рибосомы, а для всех эукариотических организмов более крупные — 80S рибосомы. В хлоропластах высших растений находятся 70S рибосомы, типичные для прокариот. Митохондриальные рибосомы более разнообразны, их размеры варьируют (55—70S) в зависимости от таксономической принадлежности организма. Митохондриальные рибосомы млекопитающих существенно мельче типичных 70S рибосом; их коэффициент седиментации составляет около 55S. Митохондриальные рибосомы растений, напротив, по размерам и строению более сходны с прокариотическими.

Сборка субъединиц рибосом происходит в цитоплазме на молекуле мРНК. В эукариотических клетках рибосомы располагаются на мембранах эндоплазматического ретикулума, хотя могут находиться и в неприкрепленной форме в цитоплазме. Нередко с одной молекулой мРНК ассоциировано несколько рибосом, такая структура называется полирибосомой (*полисомой*). Аминокислоты, из которых синтезируются белки, переносятся к полирибосомам растворимой, или транспортной РНК.

1.3. Пластиды

Классификацию пластид ведут по наличию (или отсутствию) в них определенных пигментов. К основным типам пластид относятся хлоропласты, хромопласты и лейкопласты. *Хлоропласты* содержат хлорофилл и участвуют в фотосинтезе. Пластиды, которые содержат больше каротиноидов, чем хлорофиллов, называют *хромопластами*. Именно хромопласты обуславливают желтую, красную или оранжевую окраску многих цветов, плодов и осенних листьев. Хлоропласты могут превращаться в хромопласты при старении листьев и созревании плодов, в некоторых случаях этот процесс является обратимым. К непигментированным пластидам относят этиопласты, лейкопласты и пропластиды.

Пропластиды, которые обычно имеются в меристематических клетках, содержат гомогенный матрикс с небольшими инвагинациями внутренней мембраны. Пропластиды могут дифференцироваться или в хлоропласты (на свету), или в этиопласты (в темноте).

В *этиопластах* содержится протохлорофиллид *a* и небольшое количество каротиноидов, которые придают им бледную желто-зеленую окраску; хлорофиллы *a* и *b* из-за отсутствия света не синтезируются. Особенностью строения этиопластов является наличие упорядоченной паракристаллической структуры (в форме решет-

ки), которая состоит из мембранных везикул, известных как *проламеллярные тела*. Последние являются своеобразным резервом мембранного материала для формирования ламеллярной структуры хлоропластов. Уже после нескольких часов экспозиции на свету проламеллярные тела превращаются в тилакоиды, протохлорофилл — в хлорофилл и, в итоге, этиопласты — в хлоропласты. Однако, если сформированные хлоропласты в течение длительного времени будут находиться в темноте, они трансформируются в этиопласты.

Лейкопластами называют сходные по структуре с пропластидами бесцветные пластиды тканей, в которых откладываются запасные соединения, такие, например, как крахмал (*амилопласты*), белки (*протеинопласты*), липиды (*элайопласты*). На свету амилопласты могут превращаться в хлоропласты.

Фотосинтезирующими элементами клеток высших растений и ряда зеленых водорослей являются хлоропласты — пластиды размером 4—6 мкм (рис. 1.4). У некоторых водорослей хлоропласты могут быть больше 4—6 мкм (например, у хламидомонады они могут достигать 50 мкм).

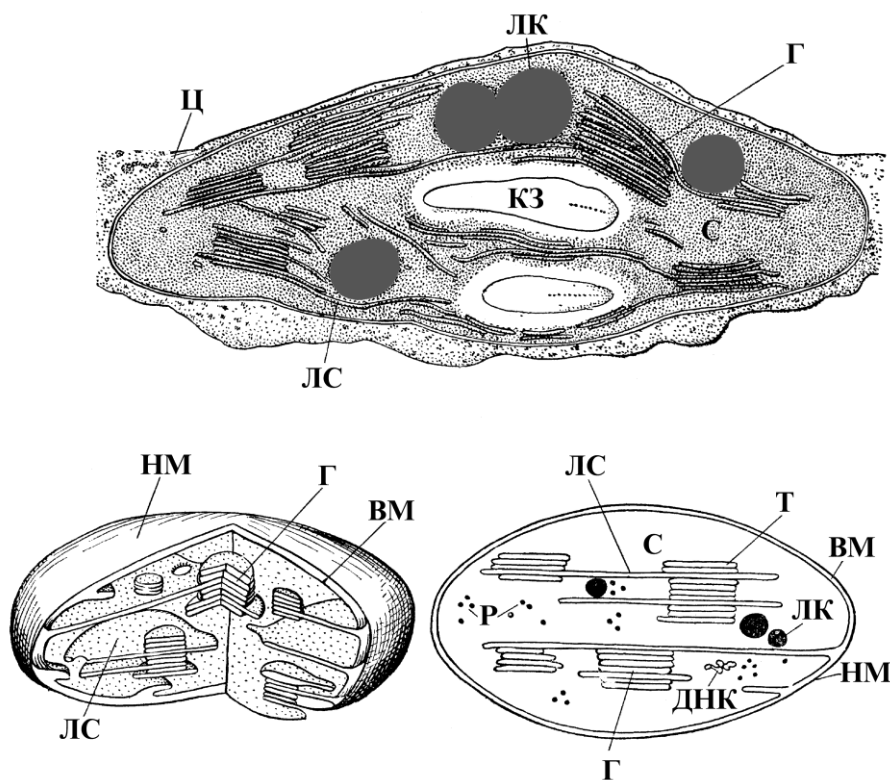


Рис. 1.4. Строение хлоропласта (Васильев и др., 1978): Ц — цитоплазма; ЛС — ламелла стромы; Г — грана; КЗ — крахмальное зерно; ЛК — липидная капля; НМ — наружная мембрана; ВМ — внутренняя мембрана; С — строма; Р — рибосомы; Т — тилакоид

В клетках высших растений хлоропласты могут быть сферической, яйцевидной или дисковидной формы. В зависимости от вида организма, внешних условий и типа клетки количество хлоропластов у высших растений может колебаться от одного до сотни и более на одну клетку. У многих растений хлоропласты воспроизводятся путем простого деления.

Хлоропласты представляют собой клеточную органеллу, окруженную (как и митохондрии) двойной мембраной. В дополнение к внешней и внутренней мембранам оболочки хлоропласты обладают еще и третьей системой мембран, формирующих *тилакоиды*. Компактная стопка тилакоидов называется *граной*. Белки и пигменты, принимающие участие в фотохимических процессах фотосинтеза, находятся в мембранах тилакоидов. Соседние граны связаны между собой одиночными (не упакованными в грану) тилакоидами, которые называются *ламеллами стромы*. Граны погружены в бесцветный *матрикс*, окружающий тилакоиды, который называется *стромой* и является аналогом матрикса митохондрий. В строме протекают биохимические реакции темновой фазы фотосинтеза. Кроме того, строма содержит ферменты синтеза фотосинтетических пигментов.

Генетическая система пластид (пластом) фотосинтезирующих эукариот представлена, как правило, многокопийной кольцевой молекулой ДНК размером 120—290 т.п.н., которая по своей организации очень похожа на типичный нуклеоид прокариот. Этот факт, а также ряд других свидетельствуют в пользу симбиогенетического происхождения пластид от свободноживущих цианобактерий. Пластидная ДНК содержит около 100 весьма консервативных генов, которые совместно с регуляторными белками (продуктами ядерного генома) контролируют транскрипцию пластидных генов, автономный синтез ряда белков и функционирование фотосинтетического аппарата. Функционирование хлоропластов обеспечивает около 2000—3000 различных белков. Геном же пластид содержит информацию менее чем о 100 белках. То есть большая часть белков поступает в хлоропласт из цитоплазмы, где они синтезируются на основе генетической информации, содержащейся в ядре.

1.4. Митохондрии

В растениях *митохондрии* впервые были идентифицированы световой микроскопией как частицы, которые связывали краситель "Янус зеленый Б". Изолированные митохондрии растений обычно сферической или продолговатой формы диаметром 0,5—1,0 мкм и длиной до 3 мкм. Много митохондрий содержится в замыкающих клетках устьиц. Количество митохондрий у растительных клеток меньше, чем в типичной животной клетке.

Ультраструктура митохондрий растений похожа на строение митохондрий других объектов (рис. 1.5).

Митохондрии имеют две мембраны: гладкую наружную и внутреннюю, образующую многочисленные выросты — *кristы*. Пространство между наружной и внутренней мембранами называется межмембранным (перимитохондриальным). Оно является внешней средой для внутренней мембраны и матрикса митохондрий.

В растительных митохондриях осуществляются процессы аэробного дыхания, окислительного фосфорилирования, превращения ряда аминокислот, синтез жирных кислот и некоторых фосфолипидов. Интактные митохондрии осмотически активны: способны набирать и отдавать воду соответственно в гипо- и гиперосмотической среде. Большинство неорганических ионов и заряженных органических молекул не способны диффундировать в матрикс. Осмотическим барьером является внутренняя мембрана митохондрий. Наружная мембрана хорошо проницаема для соединений, молекулярная масса которых ниже 10 кДа, т. е. для большинства ионов и метаболитов.

Подобно хлоропластам митохондрии являются полуавтономными органеллами, поскольку содержат рибосомы, РНК и ДНК, а также ферменты и кофакторы, необходимые для синтеза белков, кодируемых митохондриальной ДНК. Способность ДНК митохондрий к репликации позволяет этим органеллам делиться независимо от деления ядра, поэтому они пролиферируют делением, а не образованием *de novo*. Липидная часть обеих мембран состоит главным образом из фосфолипидов, 80% которых — фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин.

Многие особенности молекулярной генетики растительных митохондрий сходны с другими эукариотическими организмами. ДНК митохондрий является кольцевой молекулой и наследуется по материнской линии. *Митохондриальный геном* растений кодирует большинство тРНК, необходимых для синтеза митохондриальных белков, ряд рибосомальных белков и некоторые элементы электрон-транспортной цепи. Однако большая часть митохондриальных белков, включая ферменты цикла Кребса, кодируется ядерными генами и импортируется в митохондрии из цитоплазмы.

В растениях, в отличие от животных, простейших и грибов, митохондриальный геном имеет ряд отличительных особенностей. Хотя митохондриальный геном высших растений кодирует только около 50 различных белков, он крупнее, чем у животных клеток, и сильно варьирует по величине у различных видов растений (от 218 т.п.н. у дикой редьки до 570 т.п.н. у кукурузы). Еще одной удивительной особенностью растений является тот факт, что нуклеотидная последовательность митохондриальной ДНК не комплементарна мРНК, образующейся при транскрипции. Тем не менее потеря комплементарности при передаче генетической информации не сказывается на качестве генных продуктов — белков, кодируемых митохондриальной ДНК. Это обеспечивается исправлением (*editing*) "некомплементарных" мРНК перед трансляцией. Процессы исправления "некомплементарных" мРНК обнаружены в митохондриях многих организмов, однако у растений это явление встречается чаще. Большинство исправлений сводится к окислению аминогруппы у 6-углеродного атома цитозина и превращению его в урацил.

1.5. Эндоплазматический ретикулум

Впервые *эндоплазматический ретикулум* был выявлен группой сотрудников Рокфеллеровского института в Нью-Йорке во главе с нобелевским лауреатом Альбертом Клодом (К. Porter, A. Claude, E. Fullam, 1945). Существуют две разновидности *эндоплазматического ретикулума* (ЭР) — шероховатый и гладкий (рис. 1.6).

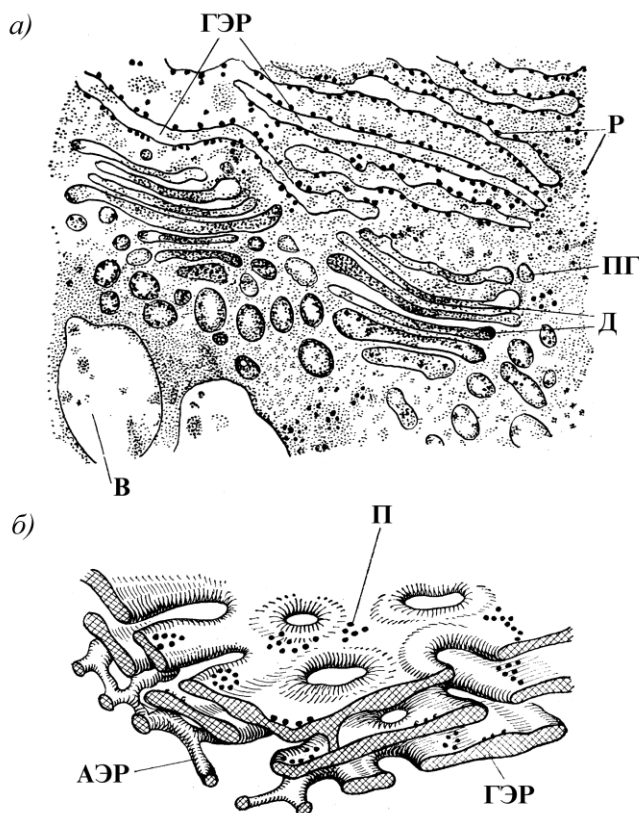


Рис. 1.6. Строение эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи в клетке железки листа тополя *Populus deltoides* (Васильев и др., 1978): *а* — цистерны гранулярного ретикулума и активные диктиосомы; *б* — трехмерная схема цистерн гранулярного и трубок агранулярного ретикулума. ГЭР — цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума; Р — рибосомы; ПГ — пузырек аппарата Гольджи; Д — диктиосомы; В — вакуоль; П — полисома; АЭР — агранулярный эндоплазматический ретикулум

Оба типа ЭР представляют собой трехмерную, непрерывную и разветвленную сеть полостей и канальцев, окруженных мембраной. Мембрана ЭР морфологически идентична оболочке клеточного ядра и составляет с ней единое целое, а полости ЭР открываются в перинуклеарное пространство ядерной оболочки. Эндоплазматический ретикулум принимает участие в создании новой ядерной оболочки.

На поверхности *шероховатого (гранулярного) ЭР* расположены рибосомы. Одной из главных функций шероховатого ЭР является обеспечение синтеза, транспорта и посттрансляционные модификации (*N*-гликозилирование, придание необходимой формы) белков, синтезируемых на прикрепленных рибосомах. С шероховатого ЭР начинается везикулярный транспорт белков. Синтезированные в цитозоле полипептиды также поступают в ЭР, где подвергаются посттрансляционным модификациям, после чего вновь возвращаются в цитоплазму. Для попадания в ЭР белок должен иметь *C*-концевой сигнальный пептид *KDEL*.

В мембранах как гладкого, так и шероховатого ЭР сосредоточены ферменты, обеспечивающие конечные этапы синтеза липидов. В *гладком эндоплазматическом ретикулуме*, помимо липидов, синтезируются терпеноиды, фенилпропаноиды, воска, а также осуществляется детоксикация токсичных для клетки веществ гидрофобной природы.

Водонерастворимые белки (*проламины*) и масла (*триацилглицериды*), которые синтезируются в ЭР, транспортируются в цитоплазму клеток в составе *белковых* и *масляных тел*. Белковые тела формируются в полостях шероховатого ЭР. При этом синтезируемые проламины самоорганизуются в большие агрегаты, которые затем отпочковываются. Масляные тела (*олеосомы*) возникают путем накопления триацилглицеридов на специальных участках ЭР, в которых присутствуют интегральные мембранные белки *олеозины*. Олеосомы окружены слоем фосфолипидов, содержащих олеозины. Водорастворимые белки (*глобулины*) транспортируются к вакуолям цитоплазмы через аппарат Гольджи. Эти процессы играют важную роль при накоплении запасных питательных веществ в созревающих семенах.

ЭР обладает способностью к активному транспорту различных соединений по внутримембранной фазе. Причем у растительных организмов вещества по системе ЭР могут переноситься не только в пределах клетки, но и между различными клетками по плазмодесмам.

1.6. Аппарат Гольджи

Аппарат (комплекс) Гольджи (АГ) назван так в честь итальянского ученого Камилло Гольджи, впервые обнаружившего его в 1898 г. Основными функциями АГ являются накопление, модификация, сортировка и везикулярный транспорт веществ, синтезированных в эндоплазматическом ретикулуме. *Комплекс Гольджи* состоит из диктиосом и транс-Гольджи сети, окруженных Гольджи-матриком.

Диктиосомы представляют собой стопку из 5—8 плоских, не соприкасающихся друг с другом, округлых дисковидных цистерн, ограниченных мембранами (см. рис. 1.6). В растительной клетке число диктиосом обычно колеблется от одной до нескольких десятков. Край цистерны часто сильно продырявлен. При большом числе отверстий эта часть цистерны выглядит как сеть тонких ветвящихся трубок, что и нашло свое отражение в названии органеллы (от греч. *диктион* — сеть).

Выделяют *цис*-, среднюю и *транс*- области аппарата Гольджи. Цистерны *цис*-области АГ формируются ближе к ядру клетки и содержат менее зрелые белки.

К ним непрерывно присоединяются везикулы, отпочковывающиеся от эндоплазматического ретикулума. Цистерны, расположенные на противоположной секреторной стороне, называют *транс-Гольджи*. В *транс*-области диктиосом к последней цистерне примыкает участок, состоящий из трубчатых элементов и массы мелких вакуолей — так называемая *транс*-сеть аппарата Гольджи или *транс-Гольджи* сеть, где происходит разделение и сортировка секретируемых продуктов.

Макромолекулы в составе небольших пузырьков попадают в аппарат Гольджи с *цис*-стороны, а покидают ее вместе с *секреторными пузырьками*, отпочковывающимися от цистерн Гольджи на *транс*-стороне. В процессе последовательного перемещения белков в *цис*- и средних зонах диктиосом происходит их модификация (созревание) путем гликозилирования и фосфорилирования. В цистернах аппарата Гольджи также происходит синтез многих полисахаридов клеточной стенки (исключение составляют только целлюлоза и каллоза). Различные цистерны аппарата Гольджи содержат разные ферменты, которые обеспечивают постепенное "созревание" макромолекул. По мере модификации вещества с помощью мелких вакуолей переносятся от цистерны к цистерне в дистальную часть диктиосомы, пока не достигают трубчатой мембранной сети в *транс*-участке диктиосомы. В этом участке происходит отщепление пузырьков, содержащих зрелый сортированный продукт.

После сортировки в *транс-Гольджи* сети различные секретируемые вещества (полисахариды, белки, липиды, гликопротеины, гликолипиды, моносахариды) попадают в различные типы секреторных везикул и направляются в сторону плазмалеммы или вакуоли. Когда секреторный пузырек достигает плазмалеммы, его мембрана сливается с ней — таким путем идет рост и обновление плазмалеммы. Содержимое пузырька при этом попадает в фазу клеточной стенки.

В процессах регуляции везикулярного транспорта важную роль играют ряд белков, входящих в состав мембран секреторных пузырьков. Например, *СОР-белки* (coat protein) обеспечивают отпочковывание везикул, а везикулы, покрытые *клатринами*, называемые также *окаймленными пузырьками*, транспортируют вещества исключительно в вакуоли.

Для активно секретирующих диктиосом характерно энергичное образование пузырьков, что, в итоге, приводит к распаду всей цистерны на секреторные пузырьки. Исчезающая цистерна замещается новой, формирующейся за счет "мембранного материала" пузырьков, поступающих из эндоплазматического ретикулума.

1.7. Вакуоль

Особенностью строения растительных клеток, отличающей их от клеток животных организмов, является наличие вакуоли, которая содержит воду, различные органические и минеральные вещества, многие из которых находятся в растворенном состоянии. В вакуоли могут накапливаться сахара, органические кислоты, белки, оксалат кальция, антоцианы, алкалоиды, танины. Поскольку вакуолярный сок кислый (рН 5,0—6,0 и даже ниже), большинство вакуолярных ферментов гидроли-

тические, с кислым оптимумом рН. Для меристематических клеток характерно много мелких пузырьков — *провакуолей*; у зрелых клеток имеется одна большая вакуоль. На долю *центральной вакуоли* может приходиться около 90% объема клетки (см. рис. 1.1).

В тканях семян и плодов имеются вакуоли, специализирующиеся на запасании белков. При прорастании семени запасные белки гидролизуются до аминокислот и экспортируются в цитоплазму на синтез новых белков.

Вакуолярная мембрана (*тонопласт*) обладает избирательной проницаемостью и поэтому участвует в регуляции осмотических процессов, связанных с вакуолью, особенно в поддержании тургора. Вакуоли не просто пассивно накапливают продукты метаболизма, а активным образом участвуют в биохимическом круговороте веществ в клетке.

1.8. Пероксисомы и глиоксисомы

Во многих клетках растений содержатся мелкие, сферические, окруженные мембраной *микротела* с характерными для них ферментами. Число этих органелл в клетке и свойственный им набор ферментов определяются внешними условиями. Эти органеллы чаще всего являются производными ЭР. В отличие от ЭР, митохондрий и хлоропластов, где компартментализация связана с векторной организацией метаболических процессов, пероксисомы и глиоксисомы представляют собой пример так называемой пассивной компартментализации обмена. В *пероксисомах* находятся ферменты, которые катализируют окисление двухуглеродных кислот, образующихся при фотодыхании (C_2 -путь фотосинтеза) и расщеплении пероксида водорода. Пероксисомы многочисленны в клетках листьев, где они взаимодействуют с хлоропластами.

У прорастающих семян для превращения жирных кислот в сахара в глиоксилатном цикле служат пероксисомы, которые получили название *глиоксилатный цикл*, который является укороченным вариантом цикла Кребса (см. разд. 3.3.1), позволяет формирующимся проросткам использовать запасы липидов семени. Пероксисомы — самый распространенный вид микротелец. Они получили свое название от пероксида водорода, который образуется в них с участием оксидаза типа II и молекулярного кислорода. Пероксисомы также содержат *каталазу*, которая восстанавливает H_2O_2 до воды с использованием в качестве доноров электронов этанол, метанол, муравьиную кислоту и ряд фенольных соединений. Этот процесс играет важную роль в окислении (обезвреживании) ряда ксенобиотиков. Существует предположение, что пероксисома — это очень «древняя» органелла, которая выполняла еще в примитивных клетках функции защиты от кислорода.

1.9. Цитоскелет

Впервые вывод о том, что в клетке есть "скелетные структуры", был сделан еще в начале XX в. выдающимся русским цитологом Н. К. Кольцовым. Общим для элементов цитоскелета является то, что они представляют собой белковые,

неветвящиеся фибриллярные полимеры, способные к полимеризации и деполимеризации. Эти фибриллярные структуры могут обеспечивать пространственную организацию цитозоля, выполняя каркасно-скелетную функцию, определять трехмерное распределение органелл в клетке, участвовать в процессе перемещения клеточных компонентов. Цитоскелет играет определяющую роль в процессах митоза, мейоза и цитокинеза, в клеточной дифференцировке и определении формы клеток, в функционировании клеточных органелл и мембран, синтезе компонентов клеточной стенки.

Цитоскелетная система растений включает в себя микротрубочки, состоящие из тубулина, и *актиновые филаменты* (микрофиламенты), а также миозиноподобные и актин-связывающие белки. В растительных клетках обнаружен ряд белков *промежуточных волокон*. Однако формирование типичных промежуточных волокон, характерных для животных клеток, у растений пока не выявлено. Отдельные элементы цитоскелета могут сшиваться специальными белками не только между собой, но и с мембранными структурами. Мембранно-скелетный комплекс является динамичной системой, чувствительной к уровню ионов Ca^{2+} , pH, АТФ, ряду других химических и физических факторов.

Фундаментальным биологическим процессом, в котором участвует цитоскелет, является деление клетки. Микрофиламенты участвуют в движении хромосом и образовании перетяжки при клеточном делении. В ходе клеточного деления цитоскелет проходит собственный цикл, принимая сменяющие друг друга различные конфигурации. Это кортикальные спирали, радиальные пучки, препрофазное кольцо, веретено деления и фрагмопласт. В делении растительной клетки основная роль принадлежит микротрубочкам. При этом в составе основных цитоскелетных структур актиновые микрофиламенты колокализуются с пучками микротрубочек.

Общим свойством цитоскелета любой растительной клетки является способность реагировать на внешние факторы. Ряд векторных сигналов, по-видимому, способен оказывать прямое поляризующее воздействие на структуру и свойства цитоскелета. К таким факторам относятся гравитация, электрические поля, изменение осмотических и ионных градиентов, механические контакты, в том числе межклеточные. Быстрое искажение векторных свойств существующего в конкретный момент времени цитоскелета в дальнейшем сопровождается более медленной его перестройкой и закреплением новой морфофизиологической оси полярности клетки. В свою очередь поляризующие сигналы могут влиять на цитоскелетный комплекс через изменение состояния рецепторов и ионных каналов, через локальные изменения концентрации вторичных посредников и прежде всего цитоплазматического кальция.

1.9.1. Микротрубочки

Микротрубочки представляют собой цилиндрические полые структуры с внешним диаметром 25 нм. Длина их варьирует. Микротрубочки состоят из глобулярного белка тубулина — гетеродимера, состоящего из α - и β -субъединиц массой 53 и 55 кДа соответственно. В составе такого димера к каждой молекуле тубулина присоединено по одной молекуле ГТФ. Гетеродимеры тубулина формируют линейные

цепочки, называемые протофиламентами. В процессе сборки микротрубочки 13 протофиламентов образуют циклический комплекс, кольца которого полимеризуются и скручиваются в полую трубку, в поперечном сечении которой видны 13 гетеродимеров тубулина. Отдельные протофиламенты и вся микротрубочка являются полярными структурами. Микротрубочки имеют быстро растущий плюс-конец и медленно растущий минус-конец, они регулярно образуются и разрушаются. Так, за 15 мин около 80% всей популяции микротрубочек обновляется. Однако 10—20% микротрубочек остаются относительно стабильными (до нескольких часов).

При достаточной концентрации тубулина полимеризация микротрубочек происходит спонтанно. Если же концентрация белка недостаточна, микротрубочки могут разбираться с обоих концов. Разборке микротрубочек способствуют понижение температуры и наличие ионов Ca^{2+} . В составе микротрубочек обнаруживаются ассоциированные с ними MAP-белки. Эти белки, стабилизируя микротрубочки, ускоряют процесс полимеризации тубулина.

Цитоплазматические микротрубочки выполняют две основные функции — скелетную и двигательную. Именно расположение микротрубочек в цитоплазме стабилизирует и определяет форму клетки. Микротрубочки цитоплазмы в ассоциации со специфичными моторными белками способны приводить в движение клеточные компоненты. В процессе растяжения клеток, когда за счет увеличения центральной вакуоли происходит рост объема клеток, большие количества микротрубочек концентрируются в периферических слоях цитоплазмы. В этом случае микротрубочки (как и клеточная стенка) механически укрепляют и как бы армируют цитоплазму.

Существует ряд соединений, которые эффективно используются для подавления сборки микротрубочек. К ним относится алкалоид *колхицин*, который связывается с отдельными молекулами тубулина, предотвращая их полимеризацию. Это приводит к падению уровня свободного тубулина, что приводит к разборке цитоплазматических микротрубочек, микротрубочек веретена деления и повреждению митотического аппарата. Такими же эффектами обладают *колцемид*, *винбластин* и *нокодозол*. Стабилизирующим действием на микротрубочки обладает противоопухолевый препарат *таксол*.

1.9.2. Микрофиламенты

Микрофиламентами называют полимерные нити, состоящие из мономеров глобулярного белка G-актина, имеющего молекулярную массу 42 кДа. В растворе мономеры G-актина могут обратимо связываться друг с другом, образуя вытянутые линейные полимеры фибриллярного F-актина. Микрофиламенты состоят из двух закрученных цепочек F-актина диаметром 6—8 нм, длиной несколько микрометров. С G-актином прочно связана молекула АТФ, которая гидролизует до АДФ при формировании фибрилл F-актина.

Микрофиламенты обладают полярностью. Два их разноименно заряженных конца, обозначаемые как (+) и (–), неравноценны по своему строению. При достаточной

концентрации белка (+)-конец будет удлиняться, а (-)-конец укорачиваться. Под влиянием различных воздействий микрофиламенты распадаются на отдельные фрагменты и вновь собираются. Это определяет такие свойства цитоплазматического матрикса, как вязкость, подвижность, переход из состояния геля в золь и обратно. Яд бледной поганки — *фаллоидин* — связывается с (-)-концом и подавляет разборку микрофиламентов. Колхицин, присоединяясь к (+)-концу, блокирует процесс полимеризации.

В цитоплазме микрофиламенты формируют пучки из параллельно ориентированных нитей или трехмерную сеть. Вся эта структура очень лабильна. Организация микрофиламентов в цитоплазме регулируется актинсвязывающими белками, специфически взаимодействующими с G- и F-актином. Эти белки выполняют самые разные функции: связывают мономеры актина и делают их недоступными для полимеризации (*профилин*), участвуют в разрезании актиновых филаментов (*виллин*), сшивают микрофиламенты друг с другом или другими структурами (*спектрин*, *α-актинин*), участвуют в полимеризации G-актина (*комплекс Arp2/3* — actin-related protein).

Микрофиламенты участвуют в изменении формы клетки и отвечают за внутриклеточное перемещение хлоропластов, клеточных ядер и везикулярных пузырьков. Внутриклеточное движение возникает при взаимодействии микрофиламентов актина с миозином.

Нитевидная молекула *миозина* (молекулярная масса — более 450 кДа, длина — 150 нм) состоит из двух больших и нескольких малых субъединиц, образующих длинную двойную спираль. Один конец этой спирали несет две головки. Он катализирует расщепление АТФ (миозиновая АТФаза) и может специфически связываться с актином. Актин активирует АТФазу. При расщеплении АТФ освобождается энергия, необходимая для внутриклеточных движений. Взаимодействие актина и миозина лежит в основе перемещения органелл и молекул вдоль нитей актина, который играет роль рельсов, а моторный белок миозин служит локомотивом.

1.10. Клеточная стенка

Клетки растений, в отличие от клеток животных, окружены плотной, механически прочной полисахаридной оболочкой, называемой *клеточной стенкой*. Ею покрыты также клетки бактерий, грибов и водорослей. Клеточная стенка растений имеет важное значение для жизнедеятельности человека, поскольку входящие в ее состав полисахариды являются основой для производства бумаги и тканей, строительных материалов и топлива. Клеточная стенка формируется при митотическом делении клеток на стадии телофазы. Различают первичную клеточную стенку эмбриональных тканей и клеток, растущих растяжением, и вторичную клеточную стенку, которая формируется внутри первичной после прекращения роста клетки. Клеточные стенки различных клеток непосредственно контактируют друг с другом, формируя единую систему клеточных стенок в ткани, которая называется *апопластом*. Наличие апопласта облегчает передвижение воды и растворенных в ней веществ по растительным тканям.

1.10.1. Структура и функции клеточной стенки растений

Клеточная стенка состоит из комплекса полисахаридов и некоторых других полимеров, которые секретируются клеткой, а затем собираются в сложную структуру за счет ковалентных и нековалентных связей. В этот комплекс (кроме полисахаридов) входят структурные белки, ферменты, полимеры фенольных соединений и некоторые другие вещества. Клеточная стенка растений отличается от клеточных стенок других организмов и имеет особые функции.

Клеточная стенка выполняет функции внешнего скелета для растительной клетки и отделяет клетки друг от друга. Благодаря клеточной стенке в растительных клетках развивается тургорное давление и поддерживается необходимая форма тканей и органов. Поскольку клеточная стенка является хорошим катионообменником, она принимает участие в ионном обмене и минеральном питании растения. Большая часть CO_2 , фиксированного при фотосинтезе, оказывается в полисахаридах клеточной стенки. Именно клеточная стенка является основой для взаимодействия с симбионтами и служит первым барьером при защите клеток от патогенов и механических повреждений.

Структура и форма клеточной стенки варьируется у разных типов клеток. У разных видов растений клеточные стенки могут сильно различаться по химическому составу. В построении ее углеводных полимеров обычно участвует 10—11 разновидностей моносахаридов, которые обязательно находятся в циклической (фуранозной или пиранозной) форме. К их числу относятся α -D-глюкоза, α -D-манноза, α -L-рамноза, α -D-галактоза, α -D-апиоза, α -D-ксилоза, α -L-арабиноза, α -D-глюкуроновая кислота, α -D-галактуроновая кислота, α -L-фукоза.

Клеточные стенки делят на два типа: первичную и вторичную. *Первичная клеточная стенка* формируется всеми растущими клетками. Она обычно сходна по молекулярной архитектонике у разных клеток, хотя, конечно, может и отличаться. Например, у паренхимных клеток лука первичная клеточная стенка очень тонкая, структурно проста и напоминает лист бумаги, пронизанный дырочками — *плазмодесмами*, которые соединяют содержимое соседних клеток, образуя *симпласт*. Первичная клеточная стенка клеток эпидермиса гипокотыля сои более толстая и имеет несколько слоев.

Первичная клеточная стенка возникает на заключительных стадиях деления клетки, на стадии телофазы, когда появляется *клеточная пластинка*, разделяющая две дочерние клетки. Эта пластинка формируется из везикул аппарата Гольджи, концентрирующихся в зоне экватора делящейся клетки. Скопление везикул вместе с элементами цитоскелета, в том числе с остатками митотического веретена, называют *фрагмопластом*. Везикулы начинают вытягиваться в трубки и, сливаясь друг с другом, формируют *тубулярно-везикулярную сеть*. Эта сеть, заполняясь полисахаридами, превращается в окруженный мембраной и похожий на продырявленный лист бумаги диск — клеточную пластинку, которая постепенно увеличивается в размерах за счет присоединения к ее краям новых везикул. Когда клеточная пластинка достигает плазматической мембраны, она сливается с ней и изолирует

делящиеся клетки друг от друга. Содержимое мембранных везикул служит материалом для формирования первичной клеточной стенки.

Между клеточными стенками соседних клеток находится *срединная пластинка*, которая состоит в основном из пектинов и не содержит целлюлозы. Она формируется из содержимого клеточной пластинки.

По мере дифференциации клетки происходит рост и дальнейшее развитие клеточной стенки по следующей схеме:

- синтез, транспорт в везикулах аппарата Гольджи и секреция в апопласт новых элементов клеточной стенки;
- встраивание новообразованных макромолекул в полимерную цепь клеточной стенки;
- размягчение, растяжение клеточной стенки и закрепление ее поверхности в ходе роста клетки растяжением;
- прекращение роста клетки, отложение новых целлюлозных слоев изнутри на первичную клеточную стенку и формирование вторичной клеточной стенки. Первичная клеточная стенка состоит из двух (или трех) сетей биополимеров: микрофибрилл целлюлозы, связанных гемицеллюлозами, сети пектиновых полисахаридов и структурных белков.

Вторичная клеточная стенка является более жесткой, прочной и по своей структуре более дифференцирована в соответствии со специализированным статусом клетки (рис. 1.7).

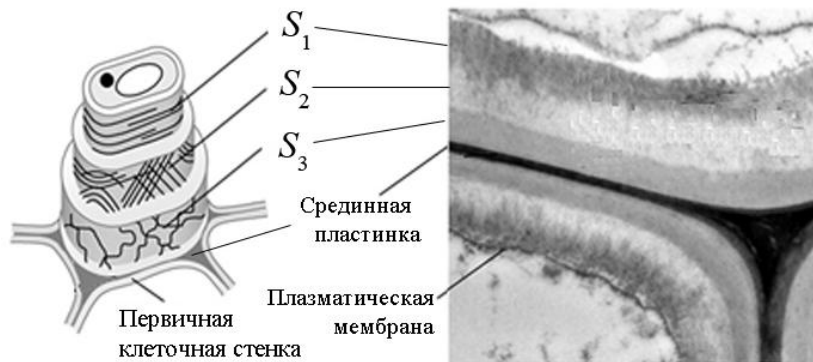


Рис. 1.7. Организация клеточной стенки в трахеидах и других клетках с утолщенной вторичной клеточной стенкой (Fahn, 1990). S_1 , S_2 , S_3 — три отдельных слоя вторичной клеточной стенки, формируемых внутри первичной

Клетки ксилемы древесных растений, например, обладают очень прочной вторичной клеточной стенкой, в состав которой входят не только полисахариды, но и лигнин. Лигнин представляет собой гетерополимерное соединение, содержащее в качестве мономеров такие фенольные соединения, как кониферилловый, синаповый

и паракумаровый спирты в различных соотношениях (см. рис. 15.12). Лигнин заполняет все пространство между фибриллами целлюлозы и как бы цементирует клеточную стенку. В состав клеточной стенки также могут входить суберин, силикаты и карбонаты кальция.

В первичной клеточной стенке микрофибриллы целлюлозы встроены в *матрикс*, состоящий главным образом из гемицеллюлоз, пектинов и небольшого количества структурных белков (рис. 1.8).

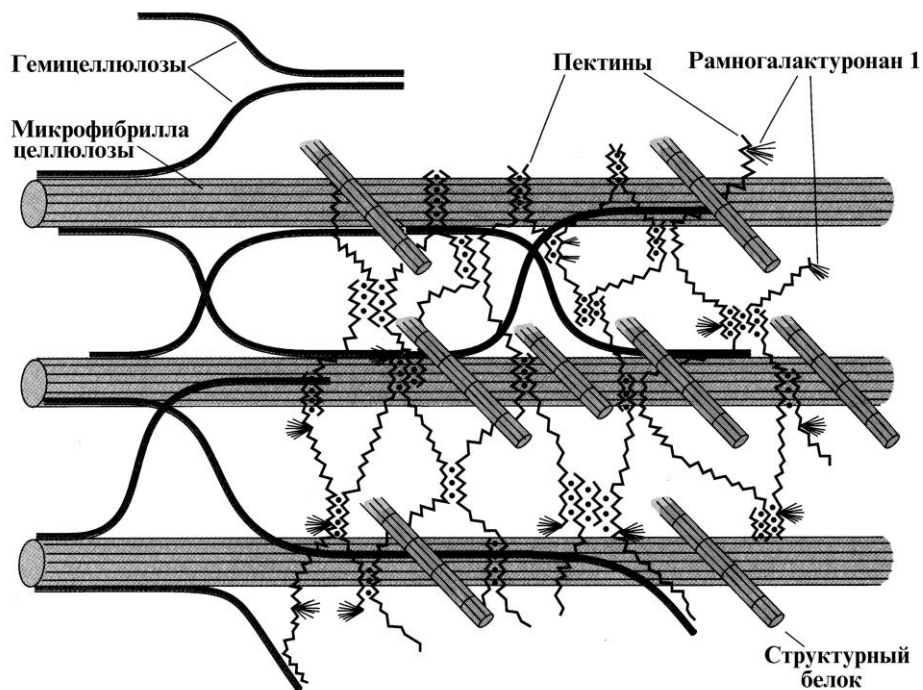


Рис. 1.8. Основные структурные элементы клеточной стенки растений (Brett, Waldron, 1996)

Целлюлозные микрофибриллы являются относительно жесткими структурами и служат основой клеточной стенки. Отдельные полисахаридные цепи, которые образуют микрофибриллу, формируют кристаллическую или паракристаллическую структуру, которая относительно устойчива к воздействию гидролитических ферментов. Поэтому целлюлоза является очень стабильным материалом.

Гемицеллюлозы представляют собой более гибкие полисахаридные структуры. Они связываются с поверхностью целлюлозных микрофибрилл и сшивают их в сеть (рис. 1.8). С другой стороны, гемицеллюлозы предотвращают трение микрофибрилл целлюлозы друг о друга, поскольку действуют, как смазка, по которой осуществляется скольжение целлюлозных волокон.

Пектины формируют гелевую фазу, в которую встроены и целлюлоза, и гемицеллюлоза. Они предотвращают агрегацию и слипание целлюлозной сети, а также функционируют как гидрофильный фильтр, определяющий проницаемость клеточной стенки для макромолекул.

В формировании клеточных стенок участвует несколько типов *структурных белков*: гидроксипролин- и пролин-богатые гликопротеины, а также глицин-богатые белки. Основная масса гидроксипролин-богатых белков представлена *экстенсинами*. В меньших количествах содержатся арабиногалактановые белки, более 90% массы которых приходится на долю олигосахаридных цепей, состоящих в основном из остатков арабинозы и галактозы. Эти белки так же, как и пектин рамногалактуронан II, участвуют в процессах узнавания, определяя специфичность и пространственный паттерн клетки.

Первичные нелигнифицированные клеточные стенки ряда однодольных растений содержат значительные количества фенолпропаноидов, представленных прежде всего такими гидроксикоричными кислотами как, *ферулловая* и *n-кумаровая*. Эти кислоты, связываясь с глюкуроноарабиноксиланами, могут формировать сложную сеть.

По полисахаридному составу, содержанию структурных гликопротеинов и фенольных соединений первичные клеточные стенки цветковых растений разделяют на два типа. К *I типу* относятся клеточные стенки двудольных и некоторых однодольных растений. В их составе обнаружено около 30% целлюлозы, гемицеллюлоз и пектинов, а также 10% структурных белков. Преобладающей гемицеллюлозой стенок этого типа является ксилоглюкан. К *II типу* относятся клеточные стенки большинства однодольных растений (злаки, осоки, камыши, пальмы). В их состав входит около 30% целлюлозы, 60% гемицеллюлоз, 10% пектина и 0,5—1% структурных белков. Основное количество гемицеллюлоз представлено глюкуроноарабиноксиланом (GAX) и β -глюканами со смешанным типом связи. На долю ксилоглюкана приходится только 2—5%. GAX, являясь кислой гемицеллюлозой, компенсирует недостаток пектинов.

1.10.2. Строение и синтез микрофибрилл целлюлозы

Для "выхода растений на сушу" был необходим материал, который мог бы поддерживать их в воздухе. Наиболее эффективно выполнять опорные функции была способна лишь клеточная стенка, содержащая целлюлозу. Ни гемицеллюлозы, ни тем более пектиновые вещества для этой цели не подходили. Хитин же, который является структурным компонентом наземных и водных организмов, осуществляющих гетеротрофное или миксотрофное питание, содержит дефицитный для растений азот. Эволюционное развитие автотрофии привело к возрастанию доли безазотистых соединений в клеточной стенке растений.

Именно поэтому одним из основных компонентов клеточной стенки растений является полисахарид *целлюлоза*, представляющий собой линейную цепь остатков D-глюкозы, соединенных между собой $\beta(1\rightarrow4)$ -гликозидными связями (рис. 1.9). Мономером целлюлозы является дисахарид *целлобиоза*, состоящий из двух остатков

D-глюкозы, соединенных $\beta(1\rightarrow4)$ -гликозидной связью. Эта полисахаридная цепь может включать от 2000 до 25 000 остатков глюкозы. Уложенные параллельно друг другу полимерные цепи целлюлозы формируют *микрофибриллу* диаметром 4—10 нм и длиной 1—5 мкм. Особенностью организации микрофибриллы является наличие аморфных зон и паракристаллических доменов, в которых глюканы связаны между собой водородными и гидрофобными связями (см. рис. 1.9).

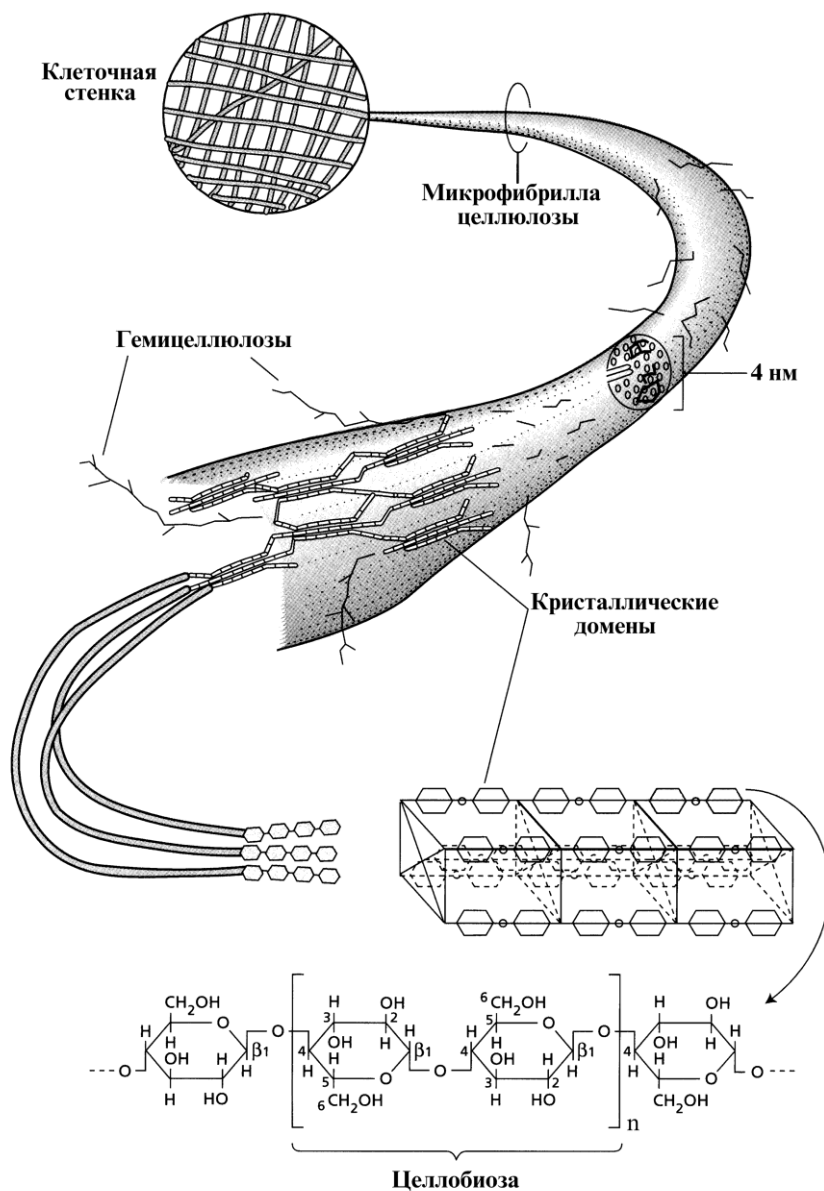


Рис. 1.9. Строение микрофибриллы целлюлозы (Taiz, Zeiger, 1998)

Целлюлоза очень устойчива при химических и enzymатических воздействиях и столь же прочна при растяжении, как сталь. Эти свойства делают целлюлозу великолепным строительным материалом, придающим прочность клеточной стенке растений. Для гидролиза гликозидных связей этого полимера необходимо длительное нагревание с сильной кислотой. Целлюлоза может разрушаться гидролитическими ферментами бактерий и грибов, при этом вначале происходит деградация аморфных участков, а затем кристаллических зон микрофибрилл.

Целлюлозные микрофибриллы синтезируются в специальных, сложно организованных белковых комплексах, называемых розетками или *терминальными комплексами*, которые встроены в плазматическую мембрану (рис. 1.10).

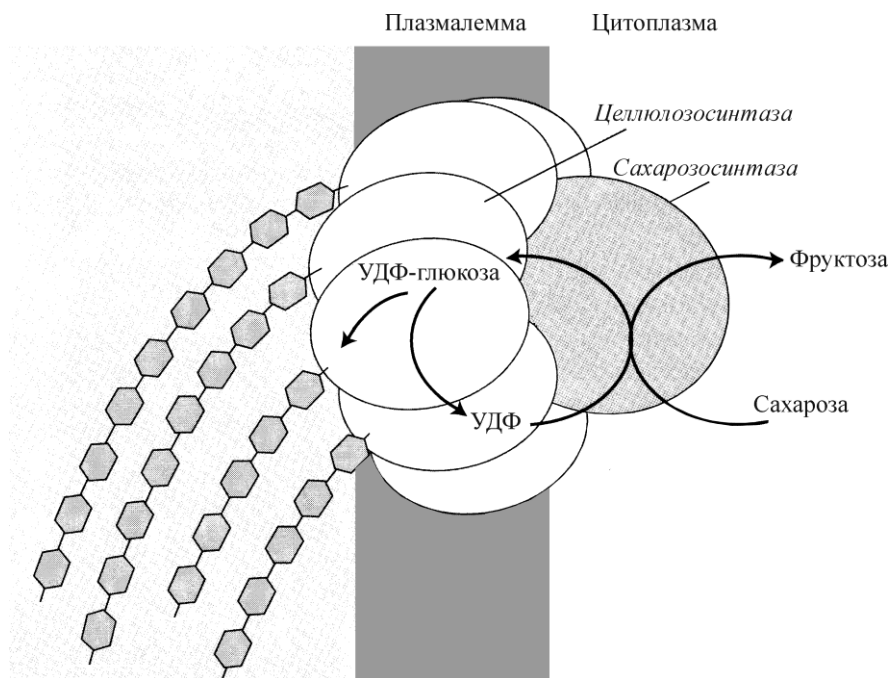


Рис. 1.10. Молекулярная модель синтеза целлюлозы (Delmer, Amor, 1995)

Предполагается, что эти комплексы являются элементами фермента *целлюлозосинтазы*, который осуществляет сшивку D-глюканов по 1→4-атомам и строит линейные цепочки целлюлозы, образующие микрофибриллу в результате самопроизвольного объединения и кристаллизации (рис. 1.11).

Целлюлозосинтаза передает остаток глюкозы от уридиндифосфат-D-глюкозы и сшивает его с растущей цепью глюкана. Источником УДФ-глюкозы является дисахарид сахароза, состоящий из глюкозы и фруктозы. При этом фермент сахарозосинтаза вместе с целлюлозосинтазой составляют метаболический канал, в котором глюкоза вначале передается от сахарозы на УДФ, а затем — на растущую целлюлозную цепь.

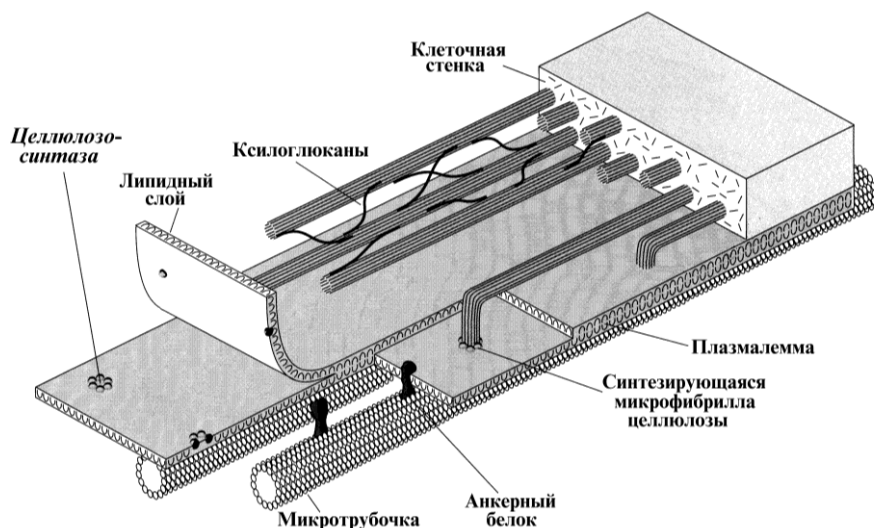


Рис. 1.11. Механизм формирования микрофибрилл целлюлозы терминальными комплексами (Gunning, Steer, 1996)

Следует еще раз подчеркнуть, что мономером целлюлозной фибриллы является не моносахарид глюкоза, а дисахарид целлобиоза. Фермент целлюлозосинтаза, очевидно, имеет два каталитических центра: в первом происходит образование целлобиозы, а во втором молекула целлобиозы сшивается с растущей цепью целлюлозы. Поэтому для каждого каталитического цикла требуется наличие двух остатков УДФ-глюкозы. Хотелось бы отметить, что за открытие сахаронуклеотидов — УДФ-глюкозы и УДФ-галактозы — Л. Ф. Лелуару (L. F. Leloir) в 1970 г. была присуждена Нобелевская премия по химии.

Формирование целлюлозы предполагает не только синтез глюкана, но и кристаллизацию нескольких полисахаридных цепей в микрофибриллу. Векторность процесса формирования фибрилл задается ориентацией кортикальных микротрубочек, прилегающих к плазмалемме (см. рис. 1.11). Одновременно с синтезом целлюлозы в матрикс клеточной стенки секретируется ряд других полисахаридов, которые взаимодействуют с целлюлозной фибриллой и модифицируют ее (рис. 1.12).

Микрофибриллы целлюлозы первичной клеточной стенки ориентируются перпендикулярно направлению растяжения клетки. Слои вторичной клеточной стенки ориентированы под различными углами по отношению к продольной оси клетки, что придает ей устойчивость к деформации.

Очень удобной моделью для изучения физико-химических характеристик целлюлозы служат целлюлозные пленки, являющиеся продуктом жизнедеятельности бактерии *Acetobacter xylinum*. Крупные целлюлозные микрофибриллы, образуемые этим микроорганизмом, по структуре похожи на растительную целлюлозу и хорошо видны под микроскопом.

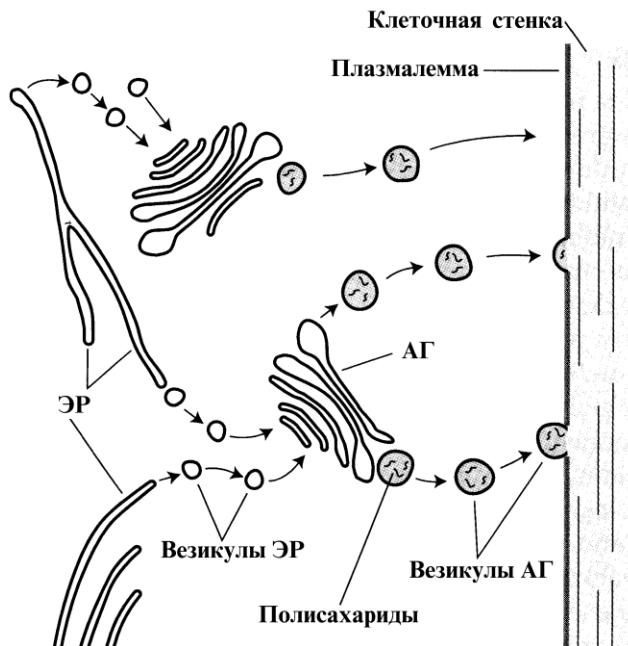


Рис. 1.12. Транспорт полисахаридов матрикса в клеточную стенку (Brett, Waldron, 1996)

1.10.3. Строение и функции гемицеллюлоз

Гемицеллюлозы или *связующие гликаны* — это полисахариды, которые способны образовывать водородные связи с микрофибриллами целлюлозы. Именно гемицеллюлозы, связываясь с несколькими микрофибриллами целлюлозы, способствуют формированию разветвленной сети полисахаридов клеточной стенки. Некоторые авторы, в частности А. М. Носов (2005), считают, что термин "*гемицеллюлозы*" (*полуцеллюлозы*) "неудачен", поскольку они представляют собой группу полисахаридов, мономерами которых являются, в основном, ксилоглоканы и глюкуроноарабиноксиланы (а не D-глюкоза). Тем не менее термин "*гемицеллюлозы*" уже прочно вошел и в учебную, и в научную литературу.

Основой *ксилоглюканов* является линейная цепь из D-глюкоз, связанных $\beta(1\rightarrow4)$ -гликозидными связями, к которой $\alpha(1\rightarrow6)$ -гликозидной связью присоединены остатки D-ксилозы или трисахарид, состоящий из остатков ксилозы, галактозы и фукозы. Ксилоглоканы функционируют (как связующие гликаны) в клеточной стенке многих растений.

Глюкуроноарабиноксиланы являются основным связующим гликаном в клеточных стенках так называемых "*коммелиноидных*" однодольных растений, к которым

относят коммелиновые (Commelinaceae), бромелиевые (Bromeliaceae), пальмы (Arecaceae), имбирные (Zingiberales).

Функции связующих гликанов в первичных клеточных стенках также могут выполнять глюкоманнаны и ксиланы. Полимерная цепь глюкоманнанов состоит из остатков D-глюкозы и D-маннозы, связанных $\beta(1\rightarrow4)$ -гликозидной связью. *Ксиланы* представляют собой полимерную цепь, состоящую из остатков β -D-ксилозы (соединенные $1\rightarrow4$ -гликозидной связью), к которой могут быть присоединены арабиноза, глюкуроновая кислота или другие сахара. В первичной клеточной стенке преобладают ксиланоглюканы, а во вторичной — ксиланы и глюкоманнаны.

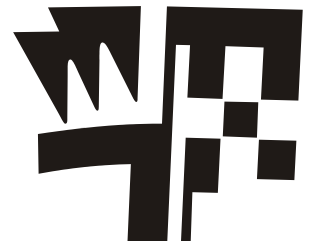
Большинство полисахаридов клеточной стенки (за исключением целлюлозы) синтезируется мембранно-связанными ферментами аппарата Гольджи и поступает в клеточную стенку путем экзоцитоза (см. рис. 1.12). Ферменты, ответственные за синтез этих полисахаридов (гликозилтрансферазы), формируют полисахариды из соответствующих нуклеозиддифосфат-моносахаров.

1.10.4. Строение и функции пектинов

Пектины — соединения, формирующие гелевую фазу в матриксе клеточной стенки. Пектины представляют собой гетерогенную группу кислых полисахаридов. Особенностью их строения является наличие в полимерной цепи галактуроновой кислоты. В состав пектинов входят также остатки рамнозы, галактозы и арабинозы. Выделяют три типа пектиновых соединений: гомогалактуронан, рамногалактуронан I и рамногалактуронан II.

Преобладающим пектином в клеточных стенках является линейный полимер *гомогалактуронан*, или полигалактуронової кислоты. *Рамногалактуронан I* представляет собой крупный и разветвленный полимер, основу которого составляет линейная цепь чередующихся остатков рамнозы и галактуронової кислоты, к которой по остаткам рамнозы присоединены олигомерные арабинозные, галактановые или арабиногалактановые цепи. Минорным пектиновым компонентом клеточной стенки является *рамногалактуронан II*, который состоит из полигалактуронової кислоты, несущей сложно ветвящиеся боковые цепи. В этих боковых цепях насчитывают до 10 различных сахаров с преобладанием рамнозы. Предполагают, что рамногалактуронан II отвечает за процессы межклеточного распознавания, являясь своеобразными отпечатками пальцев растительной клетки.

При метоксилировании образуются сложные эфиры пектинов ($R - COO - CH_3$). Степень метоксилирования определяет ионообменные свойства клеточной стенки, влияет на ее жесткость и pH. Жесткость клеточной стенки возрастает при увеличении содержания ионов Ca^{2+} . Это происходит за счет сшивания кальцием отдельных молекул полигалактуронової кислоты в единую сеть в результате взаимодействия карбоксильных групп с ионами Ca^{2+} .



Глава 2

Фотосинтез

Преизобильное рощение тучных дерев, которые на бесплодном песку корень свой утвердили, ясно изъявляет, что жирными листьями жирный тук из воздуха впитывают....

*М. В. Ломоносов
"Слово о явлениях воздушных" (1753)*

Под *фотосинтезом* понимают процесс, в котором растения на солнечном свете синтезируют органические соединения из неорганических. Фотосинтез — единственный на Земле процесс, с помощью которого космическая энергия солнечного света трансформируется в энергию химических связей органических соединений, составляющих основу для жизнедеятельности всех гетеротрофных организмов — от бактерий до человека. Процесс фотосинтеза — уникальное биологическое явление, протекающее с увеличением и запасанием свободной энергии. Все другие биологические процессы осуществляются за счет химической энергии, накапливаемой фотосинтезирующими организмами.

Впервые утверждение о том, что "зеленые растения преобразуют энергию солнечного света в химическую энергию", сделал в 1845 г. немецкий врач, открывший закон сохранения и превращения энергии, Роберт Майер (R. Mayer). В работе "Органическое движение в его связи с обменом веществ", в которой им впервые был сформулирован закон сохранения энергии, Р. Майер пишет: "Природа поставила себе задачей перехватить на лету притекающий на Землю свет и превратить эту подвижнейшую из сил в твердую форму, сложив ее в запас. Для достижения этой цели она покрыла земную кору организмами, которые в течение своей жизни воспринимают солнечный свет и, используя эту силу, создают постоянно нарастающую сумму химической разности. Эти организмы — растения". Фотосинтез способны осуществлять не только высшие растения, но также водоросли, папоротники, мхи, хвощи, плауны и некоторые виды бактерий. Процесс фотосинтеза поставляет нам не только пищу, но и различные виды топлива (как ископаемого, так и биомассу).

Фотосинтезирующие организмы так рационально решают проблемы эффективного улавливания солнечной энергии, ее преобразования и запасаения в удобной для

биологического потребления форме, что до сих пор не удается смоделировать эти процессы в искусственных условиях. Продукты фотосинтеза привлекают все большее внимание в связи с необходимостью прокормить, обеспечить энергией и одеть постоянно растущее население Земли. Знание фундаментальных и прикладных аспектов фотосинтеза находит широкое применение в самых разных областях науки и техники — от сельского хозяйства, лесоводства, экологии и биологии до химии, энергетики и машиностроения.

2.1. Фотосинтетический аппарат растения

Специализированным органом воздушного питания растений является лист, который представляет собой уникальную структуру для поглощения и преобразования энергии света в ходе фотосинтеза. В функции листа также входят газообмен, транспирация, терморегуляция, синтез ряда органических соединений, например гормонов, которыми снабжается все растение. Как правило, лист имеет плоскую форму, что обеспечивает наибольшую поверхность на единицу объема ткани и наилучшие условия для воздушного питания.

Важнейшей тканью листа, в которой протекает процесс фотосинтеза, является *хлоренхима*, состоящая из содержащих хлоропласты паренхимных клеток. Хлоренхиме листа часто называют мезофиллом, поскольку она расположена между слоями эпидермиса и проводящими пучками. *Мезофилл* представлен двумя типами клеток — клетками *столбчатой* и *губчатой паренхимы* (рис. 2.1).

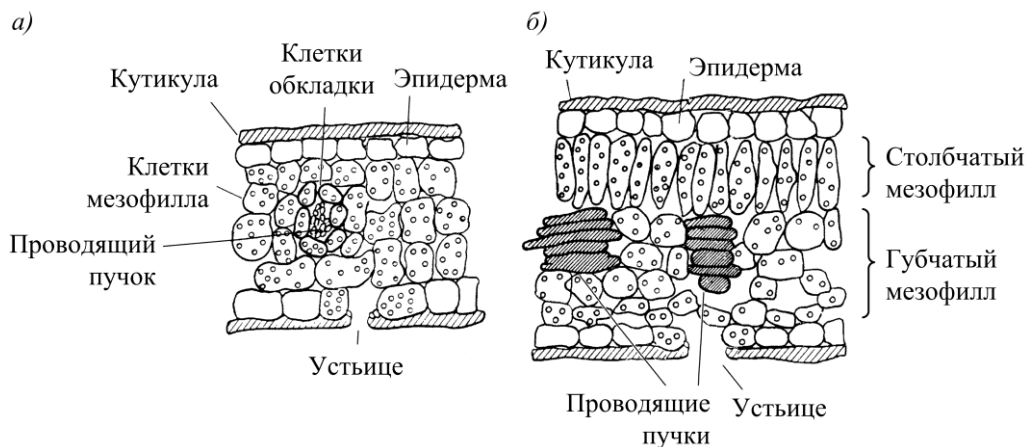


Рис. 2.1. Строение листа у C_4 -растений (а) и C_3 -растений (б) (Zelitch, 1979)

Столбчатая (палисадная) паренхима обычно представляет собой один или несколько слоев плотно прилегающих друг к другу клеток. Число слоев клеток мезофилла и их форма зависят от интенсивности освещения. Столбчатая паренхима, которая обращена к свету, содержит большую часть всех хлоропластов и выполняет основ-

ную нагрузку по ассимиляции углекислоты. В губчатой паренхиме клетки связаны между собой рыхло, что во много раз (по сравнению с наружной поверхностью листа) увеличивает поверхность, доступную для газо- и водообмена.

Лист покрыт *эпидермой*, клетки которой не содержат хлоропластов. Эпидерма не только защищает ткани листа от внешних воздействий, но также регулирует газообмен и транспирацию через *устьица*, ограниченные двумя *закрывающимися клетками*. На свету устьичные щели, как правило, широко открыты. Исключение составляют только растения семейства толстянковых (*Crassulaceae*). У некоторых видов растений клетки эпидермиса благодаря своей форме могут фокусировать свет, увеличивая его интенсивность в толще листа в 15—20 раз. Сосудистая система листа представлена *флоэмой*, обеспечивающей отток ассимилятов, и *ксилемой*, по которой в лист поступают вода и минеральные вещества.

Корни и другие гетеротрофные органы растения зависят от ассимилятов, поступающих из листа и образующихся в ходе фотосинтеза. Стебель необходим растительному организму для того, чтобы разместить листья в пространстве определенным образом и передать от них в корни ассимиляты, а также снабжать листья водой и минеральными элементами.

Структурная организация хлоропластов. В отличие от других типов пластид, *хлоропласты*, отличаются наличием сложно организованной системы внутренних мембран (см. рис. 1.4). Это позволяет строго упорядочить компоненты реакционного центра, пространственно разделить восстановленные и окисленные продукты фотосинтеза и отделить фотофизические процессы, протекающие со скоростями 10^{-9} — 10^{-12} с, от более медленных химических процессов (10^{-4} — 10^{-2} с).

Оболочка хлоропласта состоит из двух мембран. *Наружная мембрана хлоропласта* проницаема для большинства органических молекул. *Внутренняя мембрана оболочки хлоропласта* сходна с плазмалеммой, обладает избирательной проницаемостью и контролирует передвижение белков, липидов, углеводов и органических кислот между хлоропластом и цитоплазмой.

Внутренняя система мембран хлоропластов включает *тилакоиды гран* и *тилакоиды стромы*. Они пронизывают весь хлоропласт и соединяют отдельные грани в единую мембранную систему пластиды (см. рис. 1.4). Во внутренних мембранах обоих типов тилакоидов локализованы фотосинтетические пигменты, компоненты электронтранспортной цепи и синтеза АТФ.

Хлоропласты большинства растений способны перемещаться в клетке в зависимости от интенсивности освещения и его направления. Сильный свет вызывает отрицательный фототаксис хлоропластов, обуславливая их перемещение к боковым стенкам клеток палисадной паренхимы. При ослаблении светового потока хлоропласты распределяются по клетке равномерно. У светолюбивых растений пластиды значительно мельче, чем у теневыносливых. Функционально активные хлоропласты присутствуют также в стеблях и черешках листьев, осях и чешуях колоса и даже в освещаемых корнях некоторых растений.

2.2. Пигменты хлоропластов

Ту область электромагнитного спектра, которая видима человеческим глазом, называют светом, а световые кванты — фотонами. Свет охватывает область с длиной волны 400—700 нм. Все фотосинтезирующие организмы содержат пигменты, способные поглощать видимый свет и переходить в возбужденное состояние, запуская тем самым химические реакции фотосинтеза. Из листьев пигменты экстрагируют спиртом или другими органическими растворителями. Из экстракта отдельные пигменты можно выделить методом хроматографии. Впервые это на колонке с сорбентом (толченый мел, сахарная пудра) проделал в 1903 г. русский ученый М. С. Цвет. Он изобрел принципиально новый метод для разделения пигментов, который позволил ему выделить *хлорофилл а*, *хлорофилл b* и получить три фракции желтых пигментов. Метод адсорбционной хроматографии, который был разработан М. С. Цветом для изучения пигментов фотосинтеза, произвел революцию в аналитической химии и стал основным методом разделения веществ, используемым в современных научных исследованиях и промышленности.

Растительные организмы содержат несколько видов пигментов, каждый из которых выполняет определенные функции. В пластидах высших растений и водорослей встречаются пигменты трех основных классов — хлорофиллы, каротиноиды и фикобилины. Хлорофиллы и каротиноиды нерастворимы в воде, а фикобилины растворимы. Пигменты пластид связаны с белками. Фикобилины связаны с белками (апопротеинами) ковалентно и образуют фикобилипротеины. Хлорофиллы и каротиноиды ассоциированы с соответствующими белками с помощью ионных, гидрофобных и координационных связей. Пигмент-белковые комплексы обеспечивают упорядоченную ориентацию хромофорных групп и повышают эффективность их функционирования.

2.2.1. Хлорофиллы

К. А. Тимирязев писал, что "зерно хлорофилла — тот фокус, та точка в мировом пространстве, в которой живая сила солнечного луча, превращаясь в химическое напряжение, слагается, накапливается для того, чтобы впоследствии исподволь освобождаться в тех разнообразных проявлениях движения, которые нам представляют организмы, как растительные, так и животные. Таким образом, зерно хлорофилла — исходная точка всякого органического движения, всего того, что мы разумем под словом жизнь".

Именно хлорофиллы придают растениям характерный зеленый цвет. Они нерастворимы в воде, но хорошо растворимы в органических растворителях. У высших растений и водорослей обнаружены хлорофиллы *a*, *b*, *c*, *d*. Из большого числа фотосинтетических пигментов только два — хлорофилл *a* и бактериохлорофилл *a* прекрасно приспособлены не только для *поглощения*, но также и для *преобразования* энергии света. Все остальные пигменты участвуют только в процессах поглощения и миграции энергии. Поэтому все фотосинтезирующие организмы (включая водоросли и цианобактерии) содержат хлорофилл *a* или бактериохлорофилл *a*.

Хлорофилл а имеет голубовато-зеленый цвет, *хлорофилл b* — желтовато-зеленый. Хлорофилл *b* содержат все высшие растения, зеленые и эвгленовые водоросли. У бурых и диатомовых водорослей, а также у криптофитов и динофлагеллят вместо хлорофилла *b* содержится хлорофилл *c*. Хлорофилл *d* присутствует в красных водорослях вместе с хлорофиллом *a*. Бактериохлорофиллы *a*, *b*, *c*, *d* и протохлорофилл содержат фотосинтезирующие прокариотические организмы.

Физико-химические свойства хлорофилла. Впервые из листьев выделили зеленое вещество и назвали его *хлорофиллом* французские химики-фармацевты Ж. Пельтье (J. Pelletier) и Ж. Каванту (J. Caventou) в 1817 г. Это открытие было ими сделано случайно в процессе поиска новых лекарственных средств в различных растениях. В кристаллическом виде хлорофилл был впервые получен русским физиологом и ботаником И. П. Бородиным в 1882 г.

Польские биохимики Марцелл Ненцкий (M. Nencki) и Леон Мархлевский (L. Marchlewski) в 1887 г. показали, что основу молекулы хлорофилла, как и гема гемоглобина, составляет *порфириновое кольцо*. Элементный химический состав хлорофилла *a* — $C_{55}H_{72}N_4O_5Mg$ и хлорофилла *b* — $C_{55}H_{70}N_4O_6Mg$ был определен в 1914 г. немецким химиком Рихардом Вильштеттером (R. Willstätter). Он не только выделил хлорофилл *a* и хлорофилл *b* и установил их химический состав, но также доказал, что у всех растений, независимо от условий их обитания, хлорофилл совершенно одинаков. За эти исследования Р. Вильштеттер в 1915 г. был удостоен Нобелевской премии по химии.

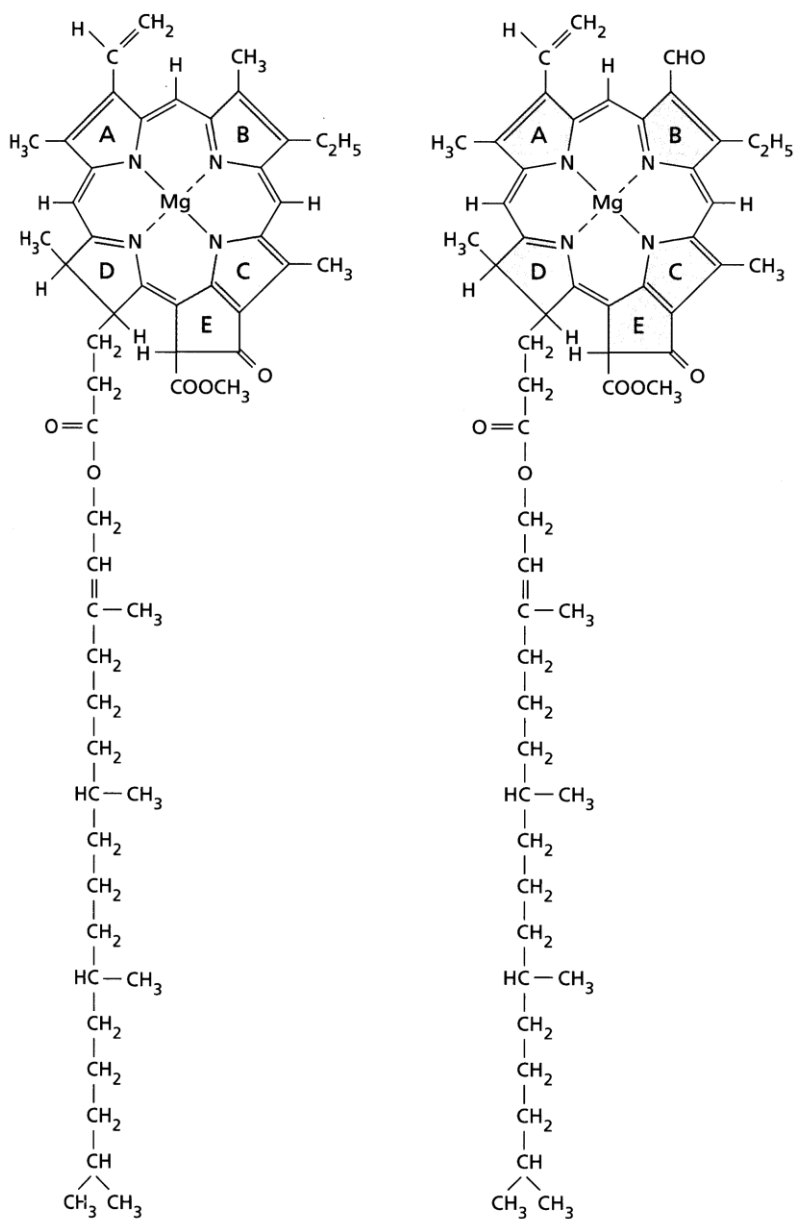
Структурные формулы хлорофиллов *a* и *b* были установлены к 1940 г. немецким химиком Гансом Фишером (H. Fischer), который в 1930 г. получил Нобелевскую премию за расшифровку структуры *гема* и выявил, что гемоглобин состоит из белка глобина и красителя гема.

В 1960 г. химики-органики Р. Б. Вудворд (R. B. Woodward, США) и М. Штрель (M. Ströll, ФРГ) завершили полный синтез молекулы хлорофилла и подтвердили правильность структурной формулы, установленной Г. Фишером. Следует отметить, что Роберт Бернс Вудворд расшифровал также структуры ряда антибиотиков (стрептомицина, тетрациклина и др.), что принесло ему в 1965 г. Нобелевскую премию.

Молекула хлорофилла состоит из *порфириновой "головки"* и *фитольного "хвоста"*. При этом порфириновая часть молекулы находится на поверхности мембраны тилакоида и связана с белками, а жирорастворимая фитольная цепь погружена в липидный слой. Хлорофилл представляет собой сложный эфир дикарбоновой кислоты *хлорофиллина*, у которой одна карбоксильная группа этерифицирована остатком *метилового спирта*, а вторая — остатком спирта *фитола* (рис. 2.2).

При разрыве сложноэфирной связи и отщеплении фитола образуется соединение, называемое *хлорофиллидом*. Четыре пиррольных кольца (A–D) соединены между собой метиновыми мостиками, формируя порфириновое ядро. Атомы азота пиррольных колец соединяются двумя координационными связями с атомом Mg. В структуре порфиринового ядра имеется также циклопентановое кольцо (E). Если

в молекуле хлорофилла атом Mg замещен на два атома водорода, образуется соединение буро-оливкового цвета — *феофитин*, выполняющий функции первичного акцептора электронов в фотосистеме II.

Хлорофилл *a*Хлорофилл *b*Рис. 2.2. Структура молекул хлорофиллов *a* и *b*

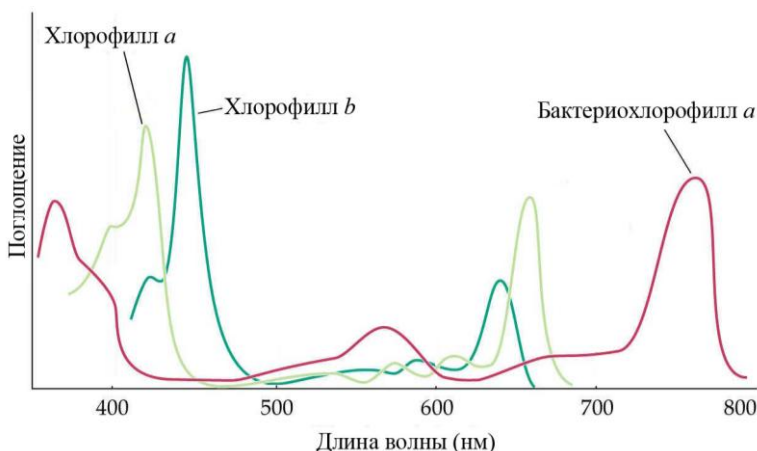


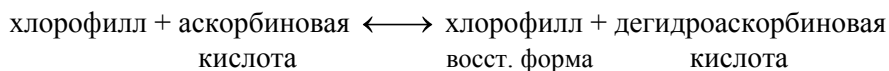
Рис. 2.3. Спектры поглощения хлорофиллов

Хлорофиллы имеют два максимума поглощения света — в синей (430—460 нм) и красной (650—700 нм) областях спектра (рис. 2.3).

Сине-фиолетовый максимум поглощения хлорофиллов обеспечивается резонансной структурой порфиринового кольца. Поглощение света в красной области спектра связано с наличием магния и гидрированием двойной связи в положении $C_7 - C_8$ D-пиррольного ядра. Поэтому у феофитина (из-за потери атома Mg) красный максимум выражен слабее. Следует отметить, что положение максимумов поглощения света хлорофиллом зависит от природы растворителя, взаимодействия молекул пигментов друг с другом, с липидами и белками. Хлорофиллы ассоциированы с гидрофобными белками и встроены в липидную фазу мембраны тилакоида.

Структура хлорофилла очень хорошо приспособлена для того, чтобы служить посредником в фотохимических процессах в ходе фотосинтеза. Хлорофилл является хорошим *сенсibilизатором* — легко возбуждается при поглощении света и обладает способностью передавать энергию (служить донором энергии) другим молекулам (акцепторам энергии). Возбужденная светом молекула хлорофилла приобретает способность участвовать в окислительно-восстановительных процессах, т. е. отдавать или принимать электроны.

Впервые представление о хлорофилле, как об оптическом сенсibilизаторе, ввел К. А. Тимирязев в 1868—1870 гг. Возможность фотоокисления хлорофилла ионами окисного железа была обнаружена в 1937 г. Е. Рабиновичем (E. Rabinowitch). Способность же молекулы хлорофилла к фотовосстановлению впервые доказал в 1948 г. А. А. Красновский. Он показал, что в анаэробных условиях хлорофилл, растворенный в пиридине, под действием света восстанавливается аскорбиновой кислотой или другими донорами электронов. После выключения света реакция идет в обратную сторону:



В свою очередь "фотовосстановленный" хлорофилл может восстанавливать такие акцепторы, как НАД⁺, хиноны, Fe³⁺ и др.:



Эти реакции получили название *реакций Красновского*.

Энергетические состояния молекулы хлорофилла. Время пребывания молекулы в возбужденном состоянии зависит от ее химического строения. В молекулах, атомы которых соединены одинарными ковалентными связями, для возбуждения электронов требуются кванты высокой энергии, например ультрафиолетовое излучение или рентгеновские лучи. Время жизни возбужденного состояния в этом случае очень мало и составляет в среднем 10^{-14} с.

Поглощая квант солнечной энергии, вещество переходит в возбужденное состояние, что уже можно рассматривать как преобразование энергии электромагнитного излучения и ее запасание. Однако энергия электронного возбуждения очень быстро (за 10^{-13} — 10^{-11} с) растрачивается на тепло или же вновь излучается в пространство. В соединениях с сопряженными двойными связями каждый π -электрон делокализован, и поэтому для их возбуждения требуются кванты тем меньшей энергии, чем более протяженной является система сопряженных двойных связей. Для сложных органических молекул типа хлорофилла этот процесс происходит за 10^{-9} — 10^{-8} с и, следовательно, в виде возбужденных состояний энергия света может быть запасена на более длительное время.

В порфириновом ядре молекулы хлорофилла имеет место чередование одинарных и двойных связей, что является причиной появления вокруг него делокализованных π -электронов, легко переходящих в возбужденное состояние при попадании квантов света видимой части спектра. Именно эта система из 18 сопряженных двойных связей выполняет функции основного хромофора и отвечает за избирательное поглощение энергии света. Поэтому время жизни возбужденного состояния у молекул хлорофилла может составлять 10^{-8} с.

Наиболее устойчивы те состояния атомов, в которых валентные электроны занимают самые низкие энергетические уровни и распределены по ним согласно принципу Паули, гласящему: если атом имеет четное количество электронов, то их *спины* (векторы магнитных моментов, равные $+1/2$ или $-1/2$) направлены противоположно друг другу (антипараллельны), т. е. суммарный спин всех электронов атома равен 0. Это состояние называют основным *синглетным* ($S = 0$). Если же число электронов в атоме четное, но спины двух электронов параллельны, то полный спин равен 1 ($S = 1$), такое состояние называется *триплетным* (рис. 2.4).

Поглощение и испускание света фотосинтетическими пигментами хорошо иллюстрирует диаграмма уровней энергии, предложенная польским физиком А. Яблонским. Запасание энергии света связано с поглощением фотона и переходом молекулы хлорофилла из основного (S_0) в возбужденное состояние (рис. 2.5).

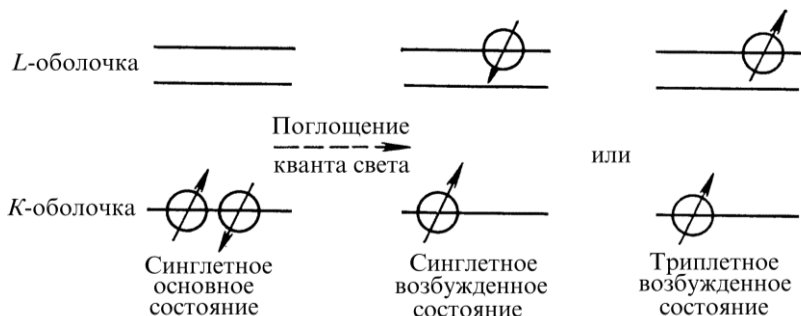


Рис. 2.4. Уровни энергии в атоме гелия (Холл, Рао, 1983)

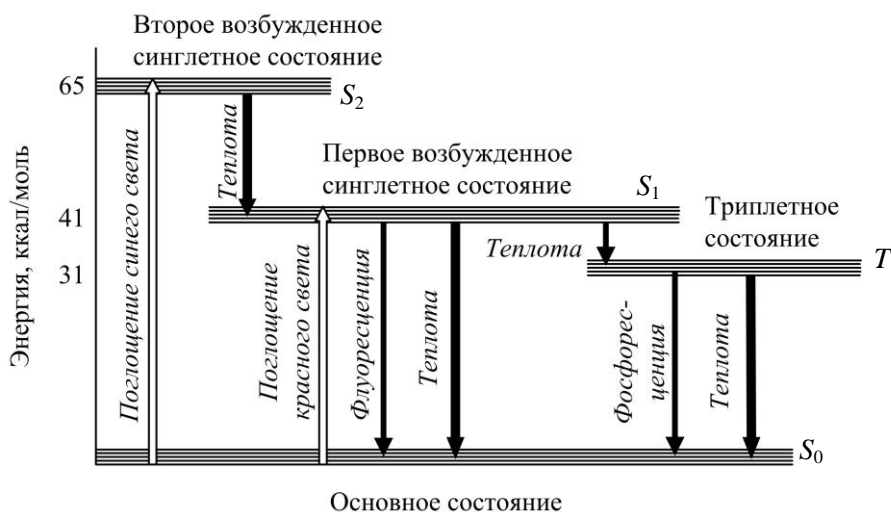


Рис. 2.5. Энергетические состояния молекулы хлорофилла

Известны два основных возбужденных состояния — синглетное и триплетное. Если при поглощении кванта света спины электронов остаются антипараллельными, молекула хлорофилла переходит в *синглетное возбужденное состояние* (S_1 или S_2). Синглетное возбужденное состояние S_2 очень нестабильно, электрон быстро (за 10^{-12} с) теряет часть энергии в виде тепла и переходит на нижний уровень (S_1), где может находиться в течение 10^{-9} — 10^{-8} с. Возвращение в исходное состояние молекулы хлорофилла может происходить несколькими путями.

Во-первых, отдав часть энергии в виде тепла и излучив квант света, молекула может перейти в основное состояние (S_0). Такое явление называется *флуоресценцией*. Согласно правилу Стокса длина волны флуоресценции больше соответствующих длин волн поглощения (рис. 2.6). Джордж Габриель Стокс (G. G. Stokes) — британский физик и математик, который занимался исследованием оптических свойств хлорофилла.

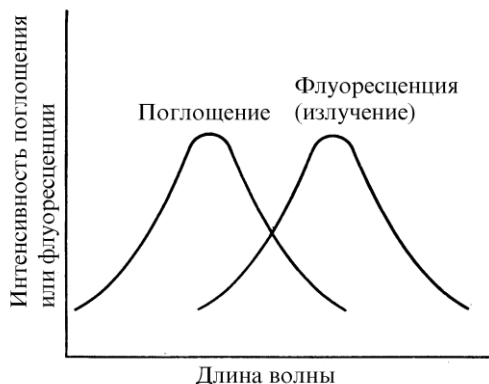


Рис. 2.6. Спектры поглощения и излучения молекул

Во-вторых, в синглетном возбужденном состоянии S_1 может произойти изменение знака спина электрона, при этом молекула хлорофилла переходит в метастабильное *триплетное состояние* (Т), имеющее гораздо большее время жизни — порядка 10^{-5} — 10^{-3} с. Это объясняется тем, что возбужденный электрон приобретает тот же знак спина, что и невозбужденный электрон, оставшийся на основном уровне (S_0). Согласно принципу Паули на одном энергетическом уровне не может быть двух электронов с одинаковыми спинами. Это не позволяет возбужденному электрону в триплетном состоянии занять электронную "дырку" на основном энергетическом уровне (S_0) до тех пор, пока не произойдет смена знака спина. Из триплетного состояния молекула может вернуться в основное энергетическое состояние, излучив квант света более длинноволновый, чем при флуоресценции. Такое свечение называют *фосфоресценцией* (см. рис. 2.5). Следует отметить, что прямой переход из основного синглетного (S_0) в триплетное возбужденное состояние маловероятен. Переход электрона в триплетное состояние осуществляется только через синглетное (S_1) возбужденное состояние.

И, в-третьих, энергия синглетного возбужденного состояния молекулы хлорофилла может быть использована в ходе фотосинтеза в фотохимических реакциях и трансформироваться в энергию химических связей органических соединений.

Механизм передачи энергии в хлоропластах. В световых реакциях фотосинтеза главную роль играет *синглетное возбужденное состояние*. Именно из синглетного возбужденного состояния хлорофилла начинается процесс миграции энергии от светособирающих комплексов к реакционным центрам фотосистем. В настоящее время обсуждаются три основных механизма передачи энергии электронного возбуждения в реакционном центре фотосистем.

Первый механизм — *индуктивного резонанса* предполагает, что передача энергии электронного возбуждения от одной молекулы пигмента к другой происходит без переноса заряда (электрона) и без излучения ее в виде кванта флуоресценции.

При возбуждении вокруг электрона создается переменное электромагнитное поле, которое может индуцировать аналогичные колебания в соседней молекуле. Именно таким способом происходит резонансный перенос энергии возбуждения пигментами в хлоропластах от молекулы донора к молекуле акцептора. Передача энергии таким путем (индуктивным резонансом) возможна лишь при условии, что спектр флуоресценции пигмента-донора перекрывается со спектром поглощения пигмента-акцептора, а расстояние между молекулами не превышает 10 нм. В гранах, как известно, среднее расстояние между пигментами не превышает 2—3 нм. Скорость передачи энергии путем индуктивного резонанса достаточно высока (10^{-9} с) и перенос идет последовательно от одной молекулы к другой.

По мере увеличения концентрации пигментов скорость миграции энергии резко возрастает, при этом начинает функционировать *второй "экситонный" механизм миграции энергии*. Понятие "экситон" означает возбужденное состояние, в котором электрон остается связанным со своим атомом, и разделения зарядов не происходит. Экситонный механизм миграции энергии предполагает одновременное возбуждение под действием света всего комплекса пигментов, а не отдельных молекул. При этом возбужденные орбиты многих молекул сливаются в одну, охватывающую всю систему пигментов. Скорость передачи энергии от такого комплекса резко возрастает (до 10^{-12} с). При таком быстром переносе энергии (экситона) между отдельными молекулами возбуждается вся система, состоящая из ориентированных определенным образом молекул пигментов одного типа.

Третий, *полупроводниковый механизм миграции энергии* в хлоропластах предполагает *перенос энергии вместе с потоком электронов* по электронтранспортной цепи тилакоидной мембраны.

Подводя краткий итог вышеизложенному, можно сделать вывод, что существуют, по крайней мере, две причины, из-за которых фотосинтезирующие организмы остановили свой эволюционный выбор на молекуле хлорофилла. Во-первых, хлорофилл способен запастись энергией света в виде энергии возбужденных электронов и быстро передавать их в реакционные центры фотосистем. Во-вторых, молекула хлорофилла способна к фотохимическому преобразованию энергии возбужденных электронов в химическую энергию путем окислительно-восстановительных реакций.

Биосинтез молекулы хлорофилла. Синтез молекулы хлорофилла представляет собой сложный процесс, включающий более чем 10 реакций. Некоторые из них требуют АТФ, НАДН и идут на свету (рис. 2.7).

Синтез хлорофилла начинается с глутаминовой кислоты, которая превращается в 5-аминолевулиновую кислоту. Далее две молекулы последней конденсируются и образуют порфобилиноген. Затем четыре молекулы порфобилиногена связываются и формируют протопорфирин IX. После этого происходит встраивание магния и светозависимое формирование кольца E; образующееся при этом соединение называют моновинилпротохлорофиллидом *a*. На заключительной стадии синтеза происходит восстановление кольца D (хлорофиллид *a*) и присоединение фитила (хлорофилл *a*).

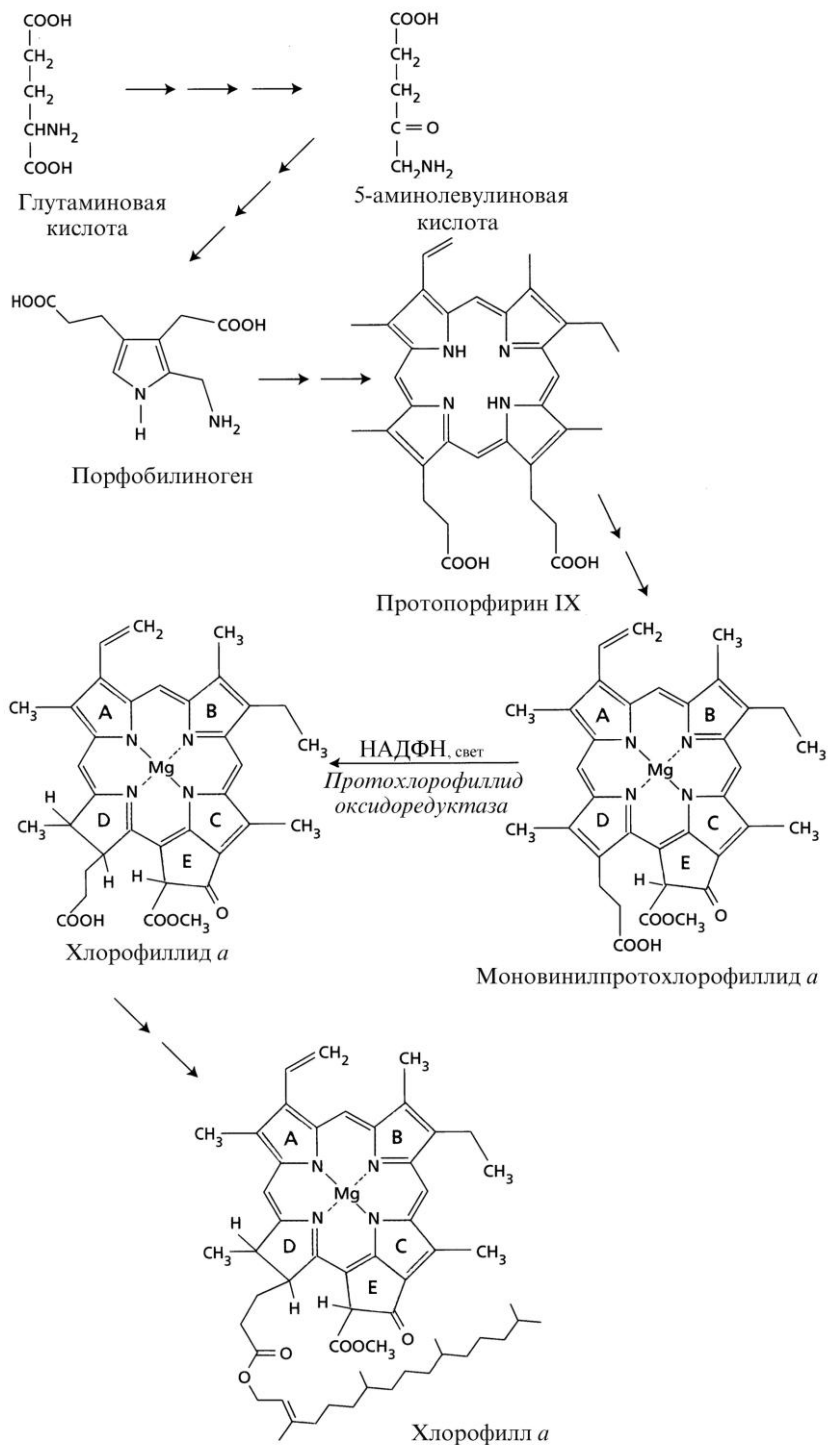


Рис. 2.7. Биосинтез молекулы хлорофилла

2.2.2. Каротиноиды

Каротиноиды — это желтые, оранжевые или красные пигменты, найденные во всех фотосинтезирующих клетках растений. В зеленых листьях каротиноиды обычно незаметны из-за наличия в листьях хлорофилла. При разрушении хлорофилла осенью именно каротиноиды придают листьям характерную желто-оранжевую окраску.

Каротиноиды образуют 40-углеродную цепь, построенную из 8 остатков изопрена, которая у большинства из них замыкается в два иононовых кольца (рис. 2.8).

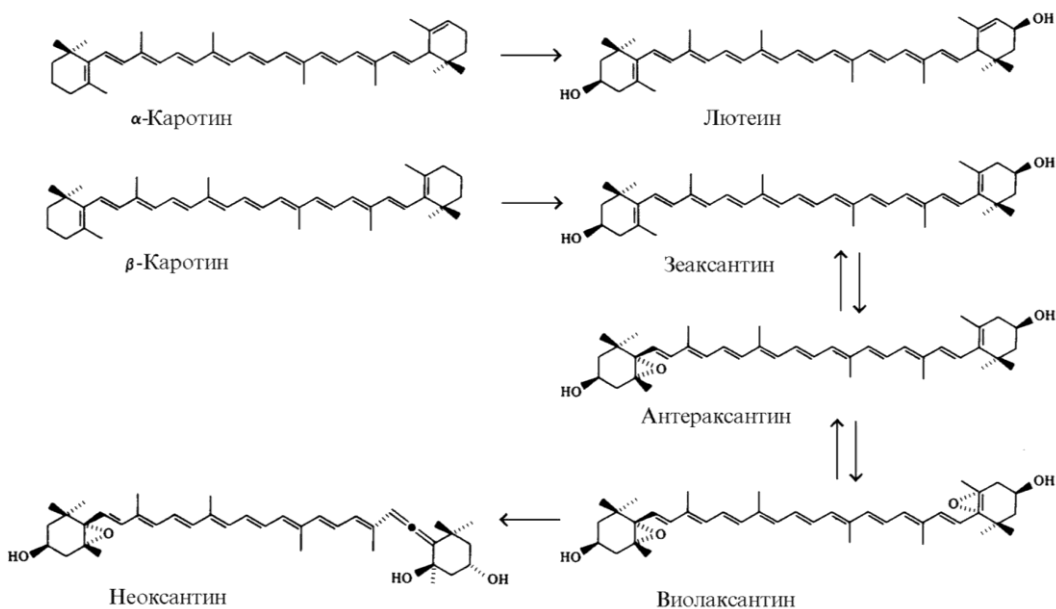


Рис. 2.8. Структура и превращения ряда каротиноидов

Функции хромофора выполняет центральная часть молекулы, состоящая из 18 атомов углерода и формирующая систему сопряженных двойных связей. Спектр поглощения каротиноидов характеризуется наличием полос в области от 400 до 500 нм (рис. 2.9). Каротиноиды нековалентно связаны с белками и липидами внутри тилакоидной мембраны.

Выявлено более 600 модификаций молекулярной структуры каротиноидов, различающихся по числу двойных связей, пространственной конфигурации, содержанию кислорода. Пространственные стереоизомеры (*цис* и *транс*) каротиноидов существенно различаются по физико-химическим свойствам и выполняют различные функции. По содержанию кислорода каротиноиды делят на два класса: *каротины* ($C_{40}H_{56}$) — пигменты, не содержащие кислорода (α -, β - и γ -каротины), и *ксантофиллы* — пигменты, которые содержат кислород. Среди ксантофиллов выделяют

гидроксильные производные $C_{40}H_{54}(OH)_2$ — *лютеин* и *зеаксантин* и эпоксидные производные, например *виолаксантин* и *неоксантин* ($C_{40}H_{56}O_4$), которые содержат и гидроксильные, и эпоксидные группы. Наиболее распространенными каротиноидами растений являются β -каротин и ксантофиллы: лютеин, виолаксантин и неоксантин. На ярком свете в хлоропластах накапливаются *антероксантин* и *зеаксантин*. Интересно отметить, что *витамин А* представляет собой половину молекулы β -каротина.

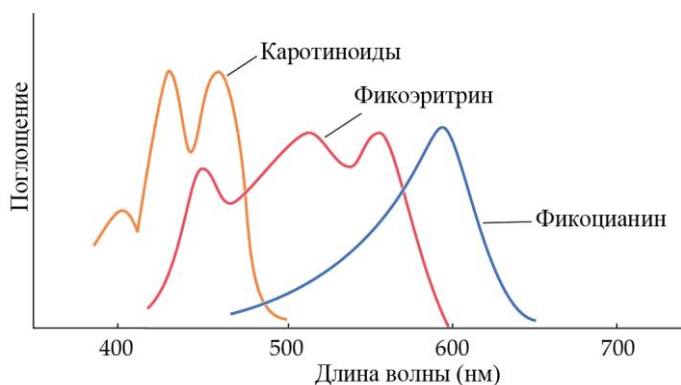
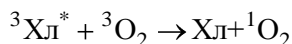


Рис. 2.9. Спектры поглощения каротиноидов и фикобилипротеинов

Функции каротиноидов в фотосинтезе. Каротиноиды являются обязательным компонентом пигментных систем всех фотосинтезирующих организмов. Мутантные растения, лишённые каротиноидов, быстро погибают. Выделяют три основные функции, которые каротиноиды выполняют в процессе фотосинтеза: антенная, антиоксидантная и фотопротекторная.

Антенная функция проявляется в светособирающих комплексах и обусловлена возможностью каротиноидов под действием света переходить в синглетное возбужденное состояние. Затем энергия возбуждения каротиноидов резонансным путем передается на близлежащую молекулу хлорофилла. Обязательным условием для передачи энергии от возбужденных светом каротиноидов на хлорофилл является частичное перекрывание электронных облаков молекул пигментов. Это достигается близким расположением хлорофиллов и каротиноидов в светособирающем комплексе. Каротиноиды способны играть роль дополнительных *светособирающих пигментов* в той части солнечного спектра (450—570 нм), где слабо поглощают хлорофиллы. Функции таких дополнительных пигментов выполняют виолаксантин, лютеин и неоксантин. Эффективность переноса энергии от возбужденных каротиноидов к хлорофиллу достигает 85%. Антенная функция каротиноидов особенно важна для водных экосистем, куда хорошо проникают кванты синего и зеленого света, но наблюдается дефицит квантов красного света, необходимых для возбуждения хлорофилла.

Антиоксидантная функция заключается в том, что каротиноиды способны тушить триплетное состояние хлорофилла и синглетный кислород. Хорошо известно, что избыток света может приводить к повреждениям фотосинтетического аппарата активными формами кислорода, особенно синглетным кислородом ($^1\text{O}_2$), который образуется при взаимодействии триплетной формы ($^3\text{O}_2$) кислорода с триплетно-возбужденным ($^3\text{Хл}^*$) хлорофиллом:



Кислород при этом переходит в высокореакционное синглетное состояние ($^1\text{O}_2$) и приобретает способность вызывать окислительный распад ненасыщенных жирных кислот, ароматических и многих других соединений. Особенно активно эти процессы протекают в реакционных центрах фотосистем. Механизм защитного действия каротиноидов заключается в том, что энергия возбуждения триплетного хлорофилла и синглетного кислорода резонансным путем передается на каротиноиды, а затем рассеивается в виде тепла.

Каротиноиды также выполняют функции фотопротекторов — защищают фотосинтетический аппарат от фотоокисления на слишком ярком свете. Переключение функций каротиноидов с аккумуляирования энергии света на ее рассеивание происходит в виолаксантиновом (ксантофилловом) цикле. На сильном свете виолаксантин превращается вначале в антраксантин, а затем в зеаксантин. Этот процесс происходит на внутренней стороне тилакоидной мембраны и катализируется ферментом виолаксантин-деэпоксидазой, активность которой при высокой освещенности возрастает за счет снижения рН в полости (люмене) тилакоида до 5,2. Именно зеаксантин способен рассеивать излишек световой энергии в форме тепла.



Обратное превращение зеаксантина в виолаксантин происходит на слабом свете или темноте с помощью фермента зеаксантин-эпоксидазы. Реакция эпоксидации осуществляется на внешней стороне мембраны тилакоида при рН 7,5 и требует присутствия НАДФН и кислорода. Один из атомов кислорода включается в зеаксантин, а второй идет на образование H_2O . Взаимодействие со второй молекулой кислорода приводит к образованию виолаксантина. Таким образом, в виолаксантиновом цикле, в зависимости от интенсивности освещения, образуется или виолаксантин или зеаксантин, которые, соответственно, аккумулируют или рассеивают энергию света.

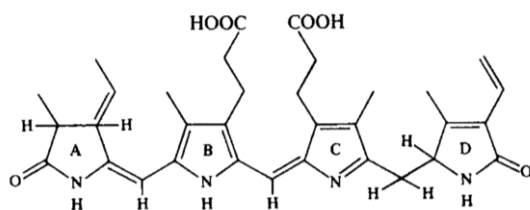
Следует отметить, что первое сообщение о том, что в процессе фотосинтеза происходит взаимопревращение ксантофиллов с выделением или поглощением кислорода

сделал Д. И. Сапожников (Сапожников и др., 1957). Однако он полагал, что на сильном свете виолаксантин превращается в лютеин, а не в зеаксантин, как вскоре выяснил Г. Ямамото (Yamamoto et al., 1962).

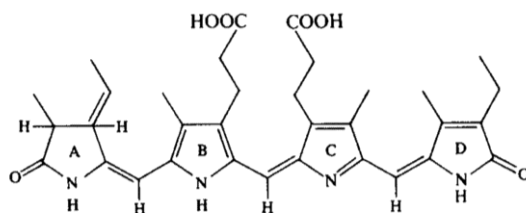
2.2.3. Фикобилипротеины

Цианобактерии (*Cyanobacteria*), красные морские водоросли (*Rhodophyceae*) и криптофиты (*Cryptophyceae*) содержат группу пигментов, называемых *фикобилипротеинами*. Выявлено более 10 типов фикобилипротеинов — фикоэритробилины, фикоцианобилины, аллофикоцианобилины, фикоэритроцианобилины и др. Впервые эти фотосинтетические пигменты (фикоцианин и фикоэритрин) были выделены из водорослей в 1894—1896 гг. австрийским физиологом растений Гансом Молишем (H. Molisch). Фикобилипротеины (как и каротиноиды) являются вспомогательными фотосинтетическими пигментами.

Фикобилины представляют собой *тетрапиррольные структуры* с открытой цепью, имеющие систему конъюгированных двойных связей (рис. 2.10).



Фикоэритробилин



Фикоцианобилин

Рис. 2.10. Строение фикобилинов

Фикобилины являются хромофорной частью *фикобилипротеинов* — глобулин-подобных белков, с которыми они связаны ковалентными тиоэфирными связями (см. приложение 2. Фикобилипротеин). Следует отметить, что хотя фикобилины называют обычно "незамкнутыми тетрапирролами" и изображают в виде линейных структурных формул, истинную форму молекулы правильнее представлять "незамкнутым кольцом" (рис. 2.11).

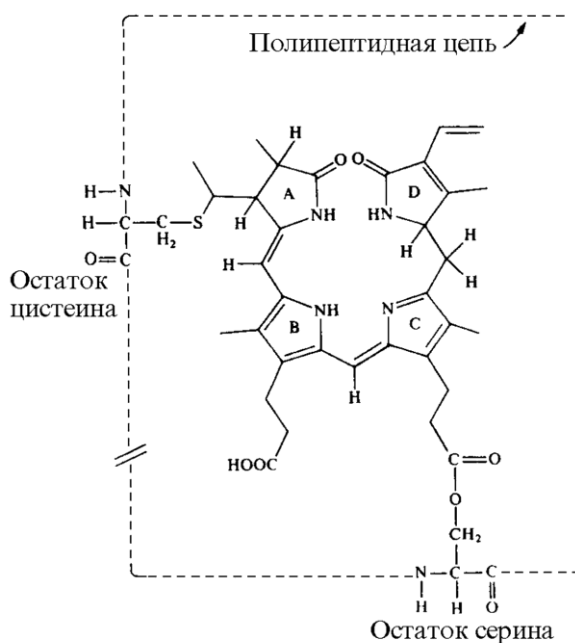


Рис. 2.11. Строение молекулы фикоэритробилина

Фикобилипротеины имеют один максимум поглощения в желто-зеленой области спектра (500—650 нм) между двумя максимумами поглощения света хлорофиллами (см. рис. 2.9). Эта особенность позволяет, например, красным водорослям, живущим в глубине моря, осуществлять фотосинтез, используя только слабый голубовато-зеленый свет, прошедший сквозь толщу воды. Чем глубже обитают красные водоросли, тем больше они содержат пигментов красного цвета фикоэритробилинов по сравнению с хлорофиллом. Пигменты синего цвета — фикоцианобилины и аллофикоцианобилины чаще встречаются у цианобактерий, живущих в поверхностных слоях воды и на суше. Для фикобилипротеинов характерна яркая флуоресценция — оранжевая (с максимумом 575 нм) у фикоэритрина и красная (с максимумом 660 нм) у аллофикоцианина.

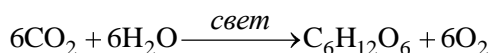
Фикобилипротеины агрегируют друг с другом, образуя белковые комплексы, называемые *фикобилисомами*. Фикобилисомы являются основными светособирающими комплексами цианобактерий, красных водорослей и криптофитов. На поверхности тилакоидных мембран фикобилисомы образуют упорядоченные ансамбли, которые примыкают к элементам фотосистем. Фикобилисомы устроены таким образом, что до 90% энергии, поглощенной фикобилипротеинами, мигрирует на хлорофилл *a* и используется в фотохимических реакциях. На поверхности фикобилисомы расположены фикоэритрины, поглощающие свет в коротковолновой области (570 нм), затем следуют фикоцианины (максимум поглощения (630 нм), ближе к тилакоидной мембране расположены аллофикоцианины (650 нм) и аллофикоцианины В (670 нм).

Известно, что вода хорошо поглощает красные лучи, которые, как правило, не проникают глубже 34 м. Желтая часть спектра задерживается на глубине 177 м, а зеленая — 322 м. Глубже 500 м уже не проникают даже синяя и фиолетовая части спектра. Поэтому у водной поверхности обитают преимущественно зеленые водоросли, глубже — цианобактерии, еще глубже — водоросли с красной окраской. Немецкий естествоиспытатель Теодор Вильгельм Энгельман (Th. W. Engelmann) назвал это явление *хроматической комплементарной адаптацией* водорослей. У водорослей, имеющих различные формы фикобилипротеинов, это явление проявляется при изменении спектрального состава света: при выращивании на красном свете преобладает фикоцианин, а на зеленом — фикоэритрин.

2.3. Общее уравнение фотосинтеза

Первое сообщение о том, что "в качестве питательного вещества, необходимого для роста, растения используют главным образом воздух" было сделано в 1727 г. английским священником и натуралистом Стивеном Хейлсом (Stephen Hales). Началом же экспериментальных работ в области фотосинтеза считают работы одного из первооткрывателей кислорода, английского священника, химика и философа Джозефа Пристли (Joseph Priestley), проведенные в 1771—1780 гг. Он обнаружил, что растения способны восстанавливать "хорошие качества" воздуха, "испорченного" дыханием животных или горящей свечой, и делать его вновь пригодным для дыхания или горения. В 1779 г. голландский врач и физик Ян Ингенхауз (J. Ingen-Housz) повторяет опыты Пристли и приходит к выводу, что, во-первых, "улучшение" воздуха растения способны осуществлять только на солнечном свете, а, во-вторых, кислород выделяют только их зеленые части. В темноте же растения "ухудшают" воздух, как и животные. Дальнейшие исследования, проведенные в 1782 г. швейцарским священником и ботаником Жаном Сенебье (Jean Senebier), подтвердили данные Ингенхауза и показали, что для выделения чистого воздуха (как потом оказалось, кислорода) растения в качестве питательного вещества используют двуокись углерода, "растворенную в воде". В процессе фотосинтеза Сенебье видел не столько средство "очистки" воздуха, сколько источник углеродного питания растений. Его соотечественник, химик Никола Соссюр (Nicolas-Théodore de Saussure) в 1804 г. не только экспериментально доказал, что при фотосинтезе происходит накопление углерода, но и установил, что при ассимиляции CO_2 растениями потребляется вода.

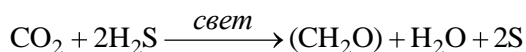
Точное количественное определение газообмена растений при фотосинтезе было проведено в 1864 г. французским химиком Жаном-Батистом Буссенго (Jean-Baptiste Boussingault), который предложил известное уравнение фотосинтеза, используемое до сих пор:



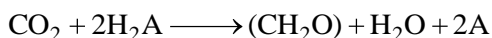
2.3.1. Источник выделения кислорода при фотосинтезе

Прямую связь между выделением кислорода и хлоропластами впервые установил в 1880 г. немецкий исследователь Теодор Вильгельм Энгельман (Theodor Wilhelm Engelmann). Он же выявил корреляцию между красным и синим максимумами поглощения хлорофилла и интенсивностью фотосинтеза.

Голландский микробиолог Ван-Ниль (С.V. van Niel) изучал *бактериальный фотосинтез* (фоторедукцию) и сравнивал его с фотосинтезом у растений. Он обнаружил виды бактерий, способные к ассимиляции CO_2 на свету, но не выделяющие при этом O_2 . Оказалось, что пурпурные и зеленые серные бактерии при ассимиляции CO_2 в качестве донора водорода используют не воду, а сероводород (H_2S):

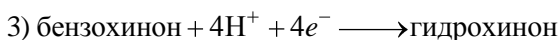
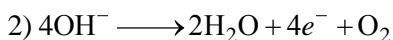
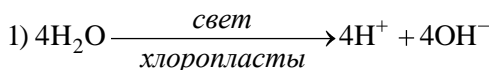


На основании этих опытов Ван-Ниль приходит к выводу, что первичная фотохимическая реакция заключается не в разложении CO_2 , а в диссоциации H_2O , и предложил уравнение, которое подходило и для фотосинтеза, и для фоторедукции:



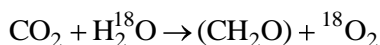
В зависимости от того, что представляет собой элемент А, может осуществляться или фотосинтез (если А — кислород), или фоторедукция (если А — например, сера). Это уравнение Ван-Ниль сыграло важную роль в утверждении, что при фотосинтезе кислород образуется из воды.

Классические опыты, доказывающие точку зрения Ван-Ниль, были выполнены профессором Кембриджского университета Робинот Хиллом (R. Hill) в 1937 г. Он показал, что изолированные хлоропласты под действием света начинают разлагать воду и выделять кислород, если в среде имеются необходимые окислители — акцепторы электрона (феррицианид, бензохинон и т. п.). Процесс разложения воды хлоропластами с выделением кислорода в присутствии акцепторов электрона (*реакция Хилла*) идет в три этапа:



Прямые данные, доказывающие, что O_2 при фотосинтезе освобождается из воды, были получены в 1940 г. американцами Сэмюэлем Рубеном и Мартином Каменом (S. Ruben, M. D. Kamen). Американские исследователи проводили свои эксперименты с тяжелым изотопом ^{18}O . Они метили воду (H_2^{18}O) или углекислоту (C^{18}O_2), а затем давали их водорослям. Оказалось, что изотопный состав

кислорода, выделяемого фотосинтезирующими клетками, соответствовал составу воды, но не CO_2



Следует отметить, что Камен и Рубен открыли также радиоактивный изотоп ^{14}C , который впоследствии использовали Дж. Бассэм, Э. Бенсон и М. Кальвин (J. Bassham, A. Benson, M. Calvin) при изучении превращения углерода в фотосинтезе (см. разд. 2.5.1). В 1941 г. отечественные ученые А. П. Виноградов и Р. В. Тейс с помощью масс-спектрометра выявили, что отношение $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ в кислороде, выделяющемся при фотосинтезе, соответствует отношению $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ в воде.

2.3.2. Темновые и световые реакции фотосинтеза

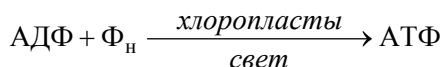
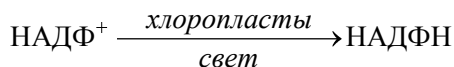
Еще в 1905 г. английский физиолог растений Ф. Блэкман (F. F. Blackman) на основании анализа кривой насыщения фотосинтеза высказал предположение, что фотосинтез представляет собой двухстадийный процесс, включающий фотохимические (световые) процессы и темновые химические реакции.

Поскольку темновые ферментативные процессы протекают медленнее, чем световые, при высоких интенсивностях света скорость фотосинтеза целиком будет определяться скоростью темновой реакции. Световые же реакции либо вообще не зависят от температуры, либо эта зависимость выражена очень слабо, тогда как темновые реакции, как и все ферментативные процессы, в значительной степени зависят от температуры. Следует отметить также, что реакции, называемые темновыми, могут протекать как в темноте, так и на свету.

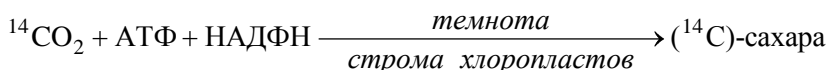
Экспериментальные доказательства наличия световой и темновой фаз фотосинтеза были получены в опытах со вспышками света, длящимися доли секунды. Вспышки света длительностью меньше одной миллисекунды можно получить либо механически с помощью непрозрачного диска со щелью, вращающегося на пути пучка света, либо электрически, заряжая конденсатор и разряжая его через вакуумную или газоразрядную лампу.

В 1914 г. А. А. Рихтером в России и в 1932 г. Р. Эмерсоном (R. L. Emerson) и У. Арнольдом (W. Arnold) в США была изучена зависимость фотосинтеза от соотношения светового и темнового периодов. Во-первых, было выявлено, что фотосинтез лучше идет при прерывистом освещении. Во-вторых, оказалось, что если оптимальное время световой вспышки составляло 10^{-5} с, то наиболее эффективная продолжительность темнового периода была $(4-6) \cdot 10^{-2}$ с. Эти явления были названы "*эффектом Эмерсона I*". Эмерсон и Арнольд сделали вывод, что максимальный выход фотосинтеза определяется не числом молекул хлорофилла, поглощающего свет, а числом молекул ферментов, катализирующих темновые реакции. Они также рассчитали, что среднее время, характеризующее скорость темновой реакции, составляет около $2 \cdot 10^{-2}$ с.

Окончательные доказательства наличия светового и темнового этапов в процессе фотосинтеза были получены в США Д. Арноном (D. I. Arnon), М. Алленом (M. V. Allen) и Ф. Уотли (F. R. Whatley). В 1954 г. они установили, что хлоропласты из листьев шпината под действием света способны восстанавливать НАДФ⁺ и синтезировать АТФ:



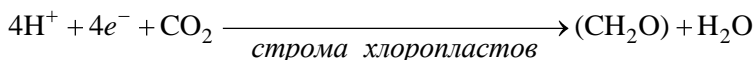
Несколько позднее им удалось показать, что гомогенат, полученный из стромы хлоропластов, способен синтезировать углеводы в темноте в присутствии АТФ и НАДФН:



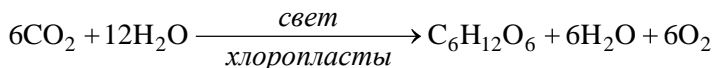
Таким образом, в фотосинтезе есть световые и темновые этапы. В ходе световых реакций, локализованных на мембране тилакоида, идет фотоокисление воды, выделяется кислород, синтезируются АТФ и НАДФН:



В темновых реакциях происходит связывание углекислоты и образование углеводов:



Суммарное уравнение фотосинтеза имеет вид:



2.4. Световые реакции фотосинтеза

Начальные стадии фотосинтеза иногда называют "энергетическими воротами жизни", поскольку именно в этом процессе происходит трансформация энергии электронного возбуждения атомов, индуцируемого видимым светом, в энергию химических связей органических соединений. Основная форма запасаания энергии света — организация потока электронов по направленной цепи переносчиков, локализованных в фотосинтетических мембранах.

Световая стадия фотосинтеза состоит из трех этапов и включает фотофизические и фотохимические процессы. *На первом этапе* энергия света поглощается, переходит в энергию электронного возбуждения пигментов и передается в реакционный

Большая часть фотосинтетических пигментов тилакоидных мембран находится в форме пигмент-белковых комплексов, образуя так называемые *фотосинтетические единицы* (ФСЕ). Фотосинтетическая единица включает антенный (светособирающий) комплекс, функционально сопряженный с реакционным центром. Именно ФСЕ являются структурной основой первичных процессов фотосинтеза, обеспечивая эффективное поглощение энергии фотонов и передачу ее в реакционные центры фотосистем. В мембранах тилакоидов выявлено пять типов интегральных белковых комплексов (рис. 2.12). Это пигмент-белковые комплексы фотосистем II и I, комплекс цитохромов b_6/f , АТФ-синтаза и мобильная антенна светособирающего комплекса II (ССК II).

2.4.1. Асимметрия распределения белковых комплексов в тилакоидных мембранах

Белковые комплексы имеют строго определенную локализацию и асимметричную ориентацию в мембранах тилакоидов. Различают трансмембранную и латеральную асимметрию (гетерогенность) внутренних мембран хлоропластов. *Трансмембранная асимметрия* выражается в неоднородности структуры и состава внешнего и внутреннего липидных слоев тилакоидной мембраны. Поэтому фотоокисление воды происходит внутри тилакоида, а восстановление НАДФ⁺ до НАДФН — в строме хлоропласта. За счет электрохимического градиента ионов H⁺, накапливающихся в полости тилакоида, в строме идет синтез АТФ.

Латеральная асимметрия заключается в том, что мембраны тилакоидов гран и мембраны тилакоидов стромы существенно различаются по химическому составу, структуре и функциям. Помимо этого, свойства тилакоидных мембран зависят от их расположения в грани. В гранях различают *торцевые* (концевые), *маргинальные* (боковые) и *стэковые* (внутригранальные, спаренные) области тилакоидных мембран (рис. 2.13).

Фотосистема I находится в тилакоидах стромы, а также в маргинальных и торцевых областях гран. Фотосистема II, в основном, локализована в области так называемого "*стэкинга*" — плотного контакта тилакоидов, формирующих грану (см. рис. 2.13). Цитохромный комплекс распределен относительно равномерно между стромальными и гранальными тилакоидами. Комплекс АТФ-синтазы локализуется главным образом в мембранах тилакоидов стромы, а также в маргинальных и торцевых областях гран.

Неоднородное распределение белковых комплексов в тилакоидах является основой функциональной гетерогенности мембраны и обеспечивает возможность мембранной регуляции процессов фотосинтеза. Например, распределение белковых компонентов фотосинтетических мембран изменяется при изменении условий освещения. Так, при возбуждении светом высокой интенсивности мобильная антенна ССК II может фосфорилироваться, отделяться от фотосистемы II, мигрировать по тилакоидной мембране и связываться с фотосистемой I. Это приводит к повышению

притока энергии в реакционный центр фотосистемы I. Активность протеинкиназ и, соответственно, фосфорилирование белков мобильной антенны ССК II зависит от редокс состояния пластохинонов и комплекса цитохромов b_6/f . Таким образом, перераспределение световой энергии между фотосистемами может регулироваться путем связывания ССК II с фотосистемой II или фотосистемой I, что зависит от редокс состояния отдельных элементов электрон-транспортной цепи и активности протеинкиназы.

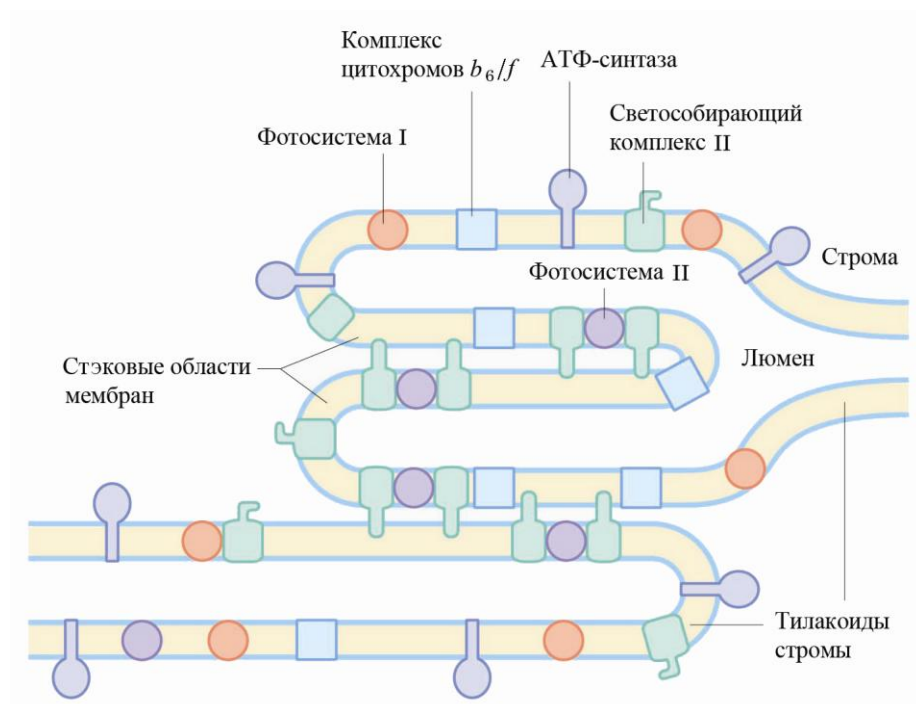


Рис. 2.13. Асимметрия распределения белковых комплексов в тилакоидных мембранах (Nelson, Cox, 2004)

2.4.2. Строение фотосистем I, II и комплекса цитохромов b_6/f

Впервые идею о существовании в хлоропластах *двух фотосистем* высказал Роберт Эмерсон (R. L. Emerson), изучая зависимость эффективности фотосинтеза от длины волны света. У хлореллы он анализировал влияние света на *квантовый выход фотосинтеза*, т. е. количество молекул O_2 , выделяющихся при фотосинтезе, в расчете на 1 квант поглощенной энергии. Величину, обратную квантовому выходу, называют *квантовым расходом*. Он показывает, сколько квантов света необходимо, чтобы выделилась одна молекула кислорода. Обычно величина квантового расхода не ниже 8.

Эффект усиления Эмерсона. Р. Л. Эмерсон с сотрудниками (R. L. Emerson et al., 1957) установили, что у хлореллы наиболее эффективным для фотосинтеза был красный свет в диапазоне 650—680 нм и синий свет в диапазоне 400—460 нм, т. е. тот свет, который наиболее интенсивно поглощается хлорофиллом. Они также вычислили, что фотосинтетическая эффективность красного света была в среднем на 36% больше, чем синего.

В последующих опытах было показано, что если клетки освещать красным светом длиной волны 650—680 нм, квантовый выход достаточно высок (рис. 2.14).

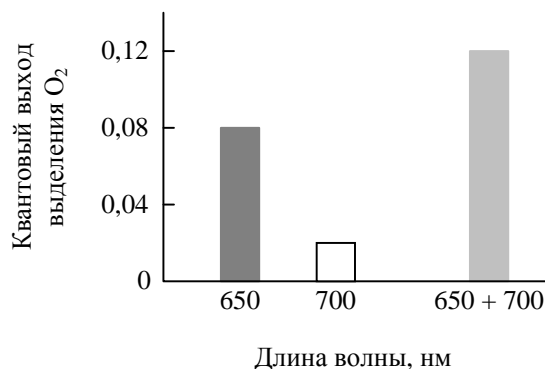


Рис. 2.14. Эффект усиления Эмерсона

Однако при дальнейшем увеличении длины волны света (свыше 685 нм) квантовый выход фотосинтеза резко падает. Если же хлореллу освещать и коротковолновым (650 нм), и длинноволновым (700 нм) красным светом одновременно, суммарный эффект будет выше, чем при действии каждого вида лучей в отдельности. Это явление получило название *эффекта усиления Эмерсона* или *эффекта Эмерсона 2*. Именно эти опыты послужили Эмерсону основанием предположить, что для световых процессов фотосинтеза необходимо взаимодействие двух фотосистем. В дальнейшем удалось выделить и изучить комплексы, входящие в состав фотосистемы I и фотосистемы II.

Строение фотосистемы II высших растений и зеленых водорослей показано на рис. 2.15. Реакционный центр фотосистемы II включает первичный донор электронов — димер хлорофилла *a* с максимумом поглощения 680 нм (P_{680}); два первичных акцептора электронов феофитина *a* (Phe); вторичные акцепторы — молекулы пластохинона (Q_A и Q_B). Ядро реакционного центра фотосистемы II составляют два мембранных белка, известных как D_1 и D_2 . Оба этих белка служат основой для связывания большинства простетических групп реакционного центра, выполняющих функции переносчиков электронов. Другие белки формируют внутренний светособирающий комплекс (43 и 47 кДа), участвуют в выделении кислорода при фотоокислении воды (33, 23 и 16 кДа) или выполняют иные функции. В кислород-

выделяющий центр входят Mn-содержащий кластер и, как кофакторы, — кальций и хлор. Посредником между кислород-выделяющим центром и хлорофиллом P_{680} является остаток аминокислоты тирозина (Y_Z) белка D_1 .

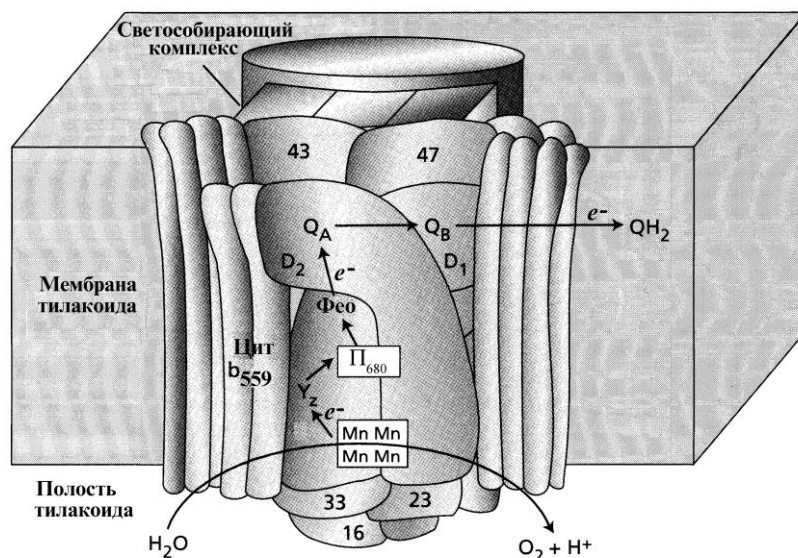


Рис. 2.15. Схематическое строение фотосистемы II (Barber et al., 1997)

Строение фотосистемы II цианобактерий изучено более детально (см. фотосистему II в приложении 2). Во многом оно оказалось сходным со строением фотосистемы II растений. Рентгеноструктурный анализ фотосистемы II термофильной цианобактерии *Thermosynechococcus elongatus*, проведенный группой Джеймса Барбера (K. Ferreira et al., 2004), показал, что фотосистема II функционирует как димер с молекулярной массой 650 кДа, каждый из мономеров которого включает 19 белков. Реакционный центр (также как и у высших растений) организован на двух мембранных белках с молекулярной массой 32 и 34 кДа (D_1 и D_2 , соответственно). "Люменальный" домен полипептида D_1 формирует Mn-содержащий кластер кислород-выделяющего комплекса. Каждый мономер фотосистемы II содержит 36 молекул хлорофилла *a* и 7 молекул β -каротина в конфигурации все-*транс*. Пигменты внутреннего антенного комплекса (14 и 16 молекул хлорофиллов *a*) связаны с белками CP43 и CP47.

В состав *реакционного центра* фотосистемы II цианобактерий входят 6 молекул хлорофиллов *a*, две молекулы феофетина, две молекулы β -каротина, пластохинон в комплексе с негеминовым железом ($Q_A \cdot Fe^{2+}$) и пластохинон Q_B . Две молекулы хлорофилла реакционного центра с максимумом поглощения 680 нм (называемые P_{680}) образуют *димер*, две другие, называемые *дополнительными*, расположены

между P_{680} и феофетином, еще две (X_{LZ} и X_{LD}) с максимумами поглощения 672 и 678 нм, называемые *сопровождающими*, связаны с белками CP43 и CP47. Две молекулы бикарбоната, входящие в состав реакционного центра, участвуют в регуляции потока электронов от пластохинона Q_A к пластохинону Q_B и способствуют протонированию Q_B . В реакционный центр фотосистемы II также входят цитохром b_{559} (состоящий из α - и β -субъединиц) и белки водоокисляющего комплекса с молекулярными массами 33, 23 и 17 кДа, а также белок I (4,8 кДа), необходимый для его сборки. Посредником между кислород-выделяющим центром и хлорофиллом P_{680} является остаток аминокислоты тирозина (Y_Z) белка D1.

Фотосистема I высших растений и водорослей представляет собой интегральный пигмент-белковый комплекс молекулярной массой около 340 кДа, состоящий из 13 пептидов. В структуре комплекса выделяют центральную часть из двух крупных белков (A и B) и два периферийных домена — со стороны стромы (белки C, D и E) и стороны люмена (белки F и N) (рис. 2.16).

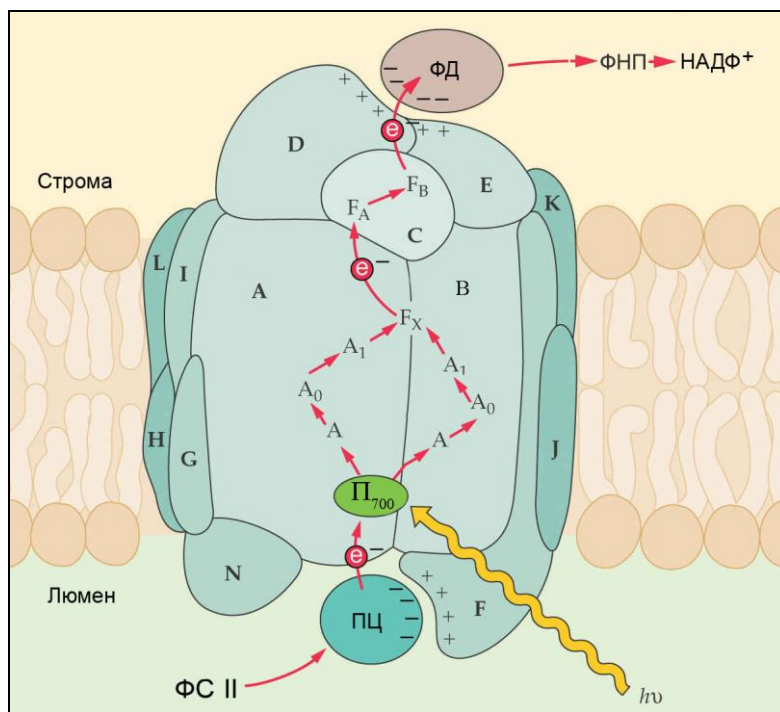


Рис. 2.16. Схематическое строение фотосистемы I (Не, 1998, с изменениями)

К комплексу белков фотосистемы I примыкают белки внешней антенны ССК I (на рисунке не показано, см. рис. 2.12). Белки A, B и C включают первичный донор электронов — димер хлорофиллов a с максимумом поглощения 700 нм (P_{700}); по одному дополнительному хлорофиллу a (A); по одной молекуле первичного

акцептора — мономера хлорофилла a (A_0); по одной молекуле вторичного акцептора — витамина K_1 , филлохинона (A_1); терминальные акцепторы — белки, содержащие железосерные (Fe_4S_4) кластеры — F_X , F_A , F_B . От терминальных акцепторов электроны поступают на водорастворимый железосерный (Fe_2S_2) белок ферредоксин (ФД), а затем на растворимый флавопротеин — ферредоксин-НАДФ-редуктазу (ФНП). Двойной набор дополнительных хлорофиллов (A), первичных акцепторов (A_0) и филлохинонов (A_0) формируют две практически симметричные ветви транспорта электронов от P_{700} к F_X .

Строение фотосистемы I цианобактерий (см. фототосистему I в приложении 2). Рентгеноструктурный анализ фотосистемы I термофильной цианобактерии *Synechococcus elongates* (Jordan *et al.*, 2001) показал, что она функционирует как тример. Каждый мономер фотосистемы I имеет молекулярную массу 356 кДа и состоит из 12 пептидов, девять из которых (PsaA, PsaB, PsaF, PsaI, PsaJ, PsaK, PsaL, PsaM, PsaX) имеют трансмембранные α -спирали (т. е. локализованы в тилакоидной мембране), а три субъединицы — PsaC, PsaD и PsaE находятся в строме. В состав фотосистемы I также входят три фосфолипида и один галактолипид. Наиболее крупные белки PsaA (83 кДа) и PsaB (82,4 кДа) составляют ядро фотосистемы, а белок PsaC (8,9 кДа) вместе с другими низкомолекулярными белками PsaD (15,6 кДа), PsaE (8,0 кДа) и PsaH (10 кДа) образуют периферийный домен и участвуют в связывании ферредоксина. Основные элементы электротранспортной цепи фотосистемы I связаны с белками PsaA, PsaB и PsaC. Большинство пигментов внутренней антенны фотосистемы I (хлорофиллы a и β -каротины) связаны с белками PsaA и PsaB. Внутренний антенный комплекс фотосистемы I включает 90 молекул хлорофиллов и 22 молекулы β -каротина (16 из которых в конфигурации *все-транс*, пять — в различных вариантах *цис*-конфигурации и одна молекула неполного β -каротина).

Комплекс цитохромов b_6/f состоит из цитохрома b_6 (цит b_6), цитохрома f (цит f), железосерного белка Риска (Fe_2S_2)_R и субъединицы IV (рис. 2.17 и приложение 2). Цитохром b_6 и субъединица IV являются наиболее гидрофобными элементами комплекса. Основная часть молекулы цитохрома f расположена в полости тилакоида, в то время как ее С-концевой участок находится на его поверхности. Простетическая группа цитохрома f представлена гемом c -типа. Простетическую группу цитохрома b_6 составляют два гема b -типа, ковалентно связанные с остатками гистидина. Эти два гема называют низкопотенциальным (L) и высокопотенциальным (H) (соответственно от англ. *low* и *high potential*). От комплекса цитохромов b_6/f электроны передаются на пластоцианин (Пц) — водорастворимый белок, содержащий два атома меди, который восстанавливает окисленную форму хлорофилла P_{700} . Комплекс цитохромов b_6/f функционирует в тилакоидной мембране в виде димера.

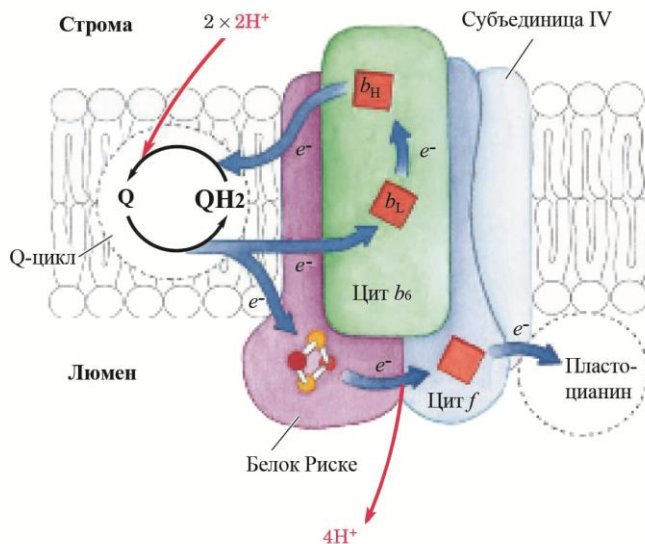


Рис. 2.17. Транспорт электронов и протонов через комплекс цитохромов b_6/f (по Nelson, Cox, 2004): Q — пластохинон, QH_2 — пластохинол, цит b_6 и цит f — цитохромы b_6 и f , b_L и b_H — низкопотенциальный (L) и высокопотенциальный (H) гемы цитохрома b_6

2.4.3. Антенные (светособирающие) комплексы

Если бы в процессе преобразования световой энергии в химическую принимала участие каждая молекула хлорофилла, то такая система была бы крайне не эффективна, поскольку даже на ярком свете одна молекула поглощает в среднем 1 квант в 0,1 с. Еще в 1932 г. Р. Эмерсон (R. L. Emerson) и Д. Арнон (D. I. Arnon) высказали предположение, что в процессе фотосинтеза большинство молекул пигментов выполняет лишь обслуживающую роль "сборщиков квантов света", передающих энергию на реакционные центры, где и происходят фотохимические превращения.

В хлоропластах пигменты организованы в *светособирающие комплексы* (ССК), в которых осуществляется процесс "сбора" и переноса энергии от антенн на особый тип молекул хлорофилла, входящих в состав реакционного центра и являющихся *ловушкой энергии возбуждения*. Такая организация процесса "сбора" и передачи световой энергии обеспечивает более интенсивное функционирование реакционных центров. В результате до 95—99% поглощенной пигментами энергии, попадая в реакционные центры, используется на фотохимическую работу.

Размеры светособирающих комплексов у различных организмов могут широко варьировать. Один реакционный центр могут обслуживать десятки и сотни молекул пигментов, которые поглощают свет и передают энергию возбужденного состояния. У водорослей количество "обслуживающих" пигментов иногда достигает нескольких тысяч. Роль светособирающих комплексов у цианобактерий и красных водорослей выполняют фикобилисомы, в состав которых входят фикобилипротеины.

Во всех антенных комплексах эукариот хлорофиллы *a* и *b*, а также каротиноиды связаны с белками.

Выделено 4 типа светособирающих комплексов (ССК) растений. Два из них локализованы в реакционных центрах (*внутренние антенны* фотосистем II и I) и связывают только молекулы хлорофилла *a* и β -каротина. Два других выполняют функции *внешних светособирающих антенн* и связывают хлорофиллы *a* и *b*, β -каротин и другие каротиноиды (лютеин, неоксантин, зеаксантин, антераксантин и виолаксантин).

Внутренняя антенна фотосистемы II организована на пигмент-содержащих белках CP43 и CP47, которые связывают около 30 молекул хлорофилла *a* и 2—3 молекулы β -каротина. На рис. 2.18 показан димер фотосистемы II и его внешний антенный комплекс.

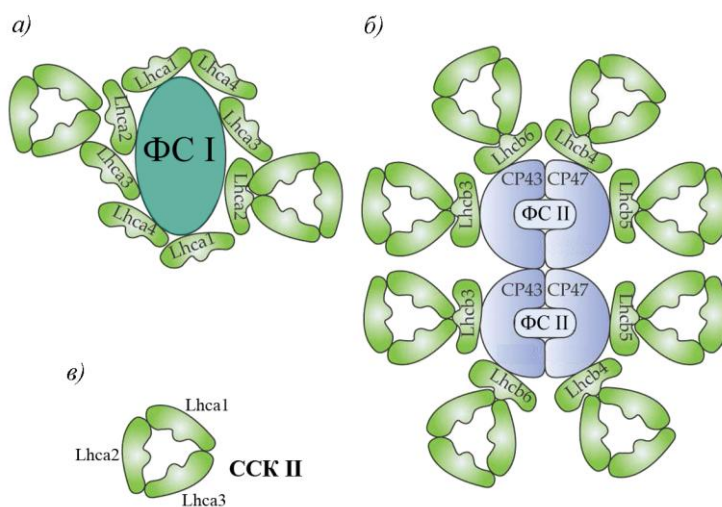


Рис. 2.18. Антенные комплексы: *a* — фотосистема I (ФС I); *б* — димер фотосистемы II (ФС II); *в* — светособирающий комплекс II (ССК II) (Jansson, 1994). CP43 и CP47 — белки фотосистемы II; Lhca (light-harvesting complex 1—6) — пигмент-связывающие белки 1—6

В состав *внешней светособирающей антенны* фотосистемы II входят шесть типов полипептидов (Lhca1—Lhca6) (Standfuss et al., 2005). Три из них (Lhca1, Lhca2 и Lhca3) образуют тример (см. рис. 2.18, *в*) и формируют мобильную антенну — светособирающий комплекс II (ССК II). Каждый мономер ССК II содержит 14 молекул хлорофиллов и 4 молекулы каротиноидов (две молекулы лютеина, одну молекулу неоксантина и одну молекулу виолаксантина) (см. приложение 2. Светособирательный комплекс). Мобильная антенна ССК II способна "обслуживать" не только реакционные центры фотосистемы II, но и фотосистемы I. Остальные пептиды антенного комплекса, называемые "минорными", занимают промежуточное положение между ядром фотосистем и ССК II.

В состав *внутренней антенны фотосистемы I* входят около 90 молекул хлорофилла *a* и 22 молекулы β -каротина. Светособирающий комплекс фотосистемы I (ССК I), *образующий внешнюю антенну*, содержит четыре типа пигмент-связывающих белков — Lhca1, Lhca2, Lhca3 и Lhca4 и включает 80—120 молекул хлорофиллов *a* и *b* и каротиноиды (см. рис. 2.18). Белки ССК I (в отличие от ССК II) менее подвижны и прочно связаны с ядром фотосистемы I.

В антенном комплексе пигменты достаточно жестко структурированы и ориентированы относительно друг друга. Помимо этого в ССК имеется большой набор различных спектральных форм пигментов с широким и перекрывающимся спектром поглощения. В результате происходит быстрое (в течение долей пикосекунд) уравнивание энергии, поглощенной светособирающим комплексом, внутри антенны. В процессах миграции энергии в антенных комплексах участвуют синглетные возбужденные состояния пигментов, которые в виде *синглетных экситонов* быстро мигрируют от светособирающих молекул к реакционному центру. Так, перенос энергии возбуждения между молекулами хлорофилла в антенне происходит за 0,3—0,5 пс, а от антенны к реакционному центру за 50—100 пс. Благодаря такой высокой скорости передача энергии возможна без флуоресценции. В антенных комплексах энергия передается от каротиноидов к хлорофиллам *b*, далее к хлорофиллам *a* и, наконец, в реакционный центр к димерам хлорофиллов P_{680} или P_{700} , служащим ловушками энергии возбуждения "светособирающих" пигментов. В реакционных центрах энергия возбуждения фотосинтетических пигментов используется для разделения зарядов.

2.4.4. Разделение зарядов в фотосистемах

Реакционными центрами фотосистем называют хлорофилл-белковые комплексы, способные к первичному фотохимическому разделению зарядов. При этом хлорофилл P_{680} служит первичным донором электрона в реакционном центре фотосистемы II, а хлорофилл P_{700} — в реакционном центре фотосистемы I.

Обычно время жизни возбужденных электронов ароматических соединений (в том числе и хлорофилла) составляет около 5 нс ($5 \cdot 10^{-9}$ с). За такое время энергия возбужденного состояния молекулы либо переходит в тепло, либо испускается в виде кванта флуоресценции. Для того чтобы эта энергия могла использоваться для разделения зарядов и преобразования физической формы энергии в химическую, скорость передачи энергии возбуждения должна быть больше, чем испускание квантов флуоресценции. Поэтому время передачи энергии в реакционных центрах фотосистем должно составлять несколько пикосекунд. Главная особенность первичных процессов фотосинтеза как раз и заключается в том, что отрыв электрона от хлорофилла (первичное разделение зарядов) и восстановление первичного акцептора (феофетина) происходит очень быстро — за 3 пикосекунды (3×10^{-12} с)!!! Именно поэтому эффективность передачи энергии возбужденного электрона в реакционных центрах фотосистем близка к 100%. Образующаяся при этом окисленная

форма хлорофилла P_{680}^+ приобретает способность "отнимать" электроны у белков кислород-выделяющего комплекса, а те, в свою очередь, — у воды (см. рис. 2.15). *Разделение зарядов* в реакционном центре фотосистемы II условно можно разделить на три этапа.

На первом этапе под действием света происходит возбуждение молекулы хлорофилла (P_{680}^*). *На втором этапе* электрон передается первичному акцептору феофитину (за 3 пс). При этом хлорофилл переходит в окисленную форму (P_{680}^+), а феофитин восстанавливается (феофитин⁻). Появление неспаренного электрона в молекуле хлорофилла (P_{680}^+) инициирует переход на нее (за 20—260 нс) электрона от кислород-выделяющего центра. Посредником между Mn-кластером кислород-выделяющего центра и P_{680}^+ служит редокс-активный остаток тирозина (Y_Z) белка D_1 . *На заключительном этапе* электрон от восстановленной формы феофитина поступает на первичный хинон Q_A (за 200 пс), а затем на вторичный хинон Q_B (за 100 пс). После этого электроны уже выходят за пределы реакционного центра фотосистемы II и идут на восстановление липидорастворимого пула пластохинонов (1 мс).

Процесс *первичного разделения зарядов* в фотосистеме I происходит аналогичным путем (рис. 2.16). От возбужденного под действием света P_{700}^* электроны вначале переносятся (за 3 пс) на первичный акцептор хлорофилл A_0 , затем (за 40—200 пс) на вторичный акцептор филлохинон (A_1) и на белок F_X (за 15—200 нс). Дефицит электронов у окисленного P_{700}^+ восполняется за счет их поступления из фотосистемы II через медь-содержащий белок — пластоцианин (за 200 пс). Затем электроны от белков, содержащих железосерные кластеры F_A/F_B фотосистемы I, переносятся на ферредоксин (за 15—200 нс). Перенос электрона по фотосинтетической цепи приводит к восстановлению переносчиков и к появлению конечных продуктов — АТФ и НАДФН, которые вступают в ферментативные реакции, средняя скорость которых находится в миллисекундном (10^{-3} с) диапазоне.

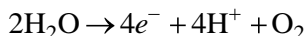
Под *вторичным разделением зарядов* понимают процесс генерации на мембране тилакоида градиента протонов. Следует подчеркнуть, что электрохимический градиент ионов водорода, формируемый в процессе разделения зарядов на тилакоидной мембране, представляет собой уже электрическую форму энергии, которая с помощью АТФ-синтазы может быть трансформирована в химическую энергию макроэргической связи АТФ.

Необходимо отметить очень высокую эффективность разделения зарядов в фотосистемах. Так, квантовая эффективность разделения зарядов (т. е. доля поглощенных квантов, вызвавших перенос электрона в фотосистемах) близка к 100%. Эффективность же энергетическая (т. е. доля энергии возбуждения, запасенная в результате фотохимического акта) составляет 50—90%.

2.4.5. Фотоокисление воды

Одним из важнейших эволюционных "приобретений" живой природы является способность фотосинтезирующих организмов окислять воду с выделением молекулярного кислорода за счет энергии солнечного света. Именно кислородный фотосинтез привел к появлению в атмосфере значительных (21%) количеств молекулярного кислорода, что привело к переходу биоэнергетики с анаэробного на качественно новый и более эффективный аэробный тип метаболизма.

В результате разделения зарядов в реакционном центре фотосистемы II образуется самый сильный биологический окислитель — хлорофилл P_{680}^+ , окислительно-восстановительный потенциал которого (+1,1 В) достаточен для окисления воды. Для объяснения механизма фотоокисления (фотолиза) воды наиболее часто используют "гипотезу Кока" (В. Kok et al., 1970). В основе этой гипотезы лежит представление об "S-системе", которая осуществляет одновременное 4-электронное окисление двух молекул воды без образования каких-либо промежуточных продуктов:



В кислород-выделяющий центр входят Mn-содержащий кластер белка D_1 и, как кофакторы — кальций и хлор. Согласно модели Кока "S-система" окисления воды, в зависимости от уровня окисления ионов марганца, может находиться в пяти функционально различных состояниях — S_0 , S_1 , S_2 , S_3 и S_4 (рис. 2.19).

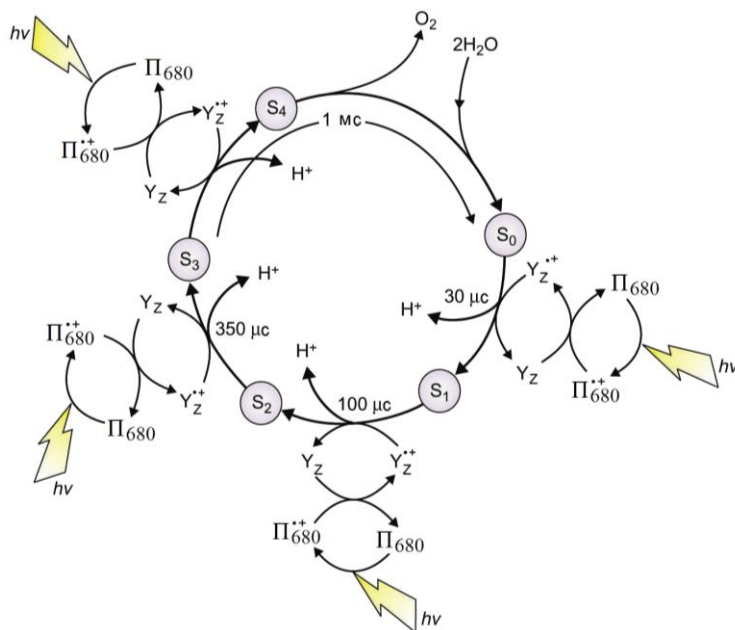


Рис. 2.19. S-цикл фотоокисления воды (Tommos, Babcock, 2000):

P_{680} — реакционный центр фотосистемы II хлорофилл a ; Y_z — остаток аминокислоты тирозина белка D_1 ; S_0 — S_4 — уровни окисления ионов марганца

В ходе так называемого "S-цикла" происходит последовательное изменение валентности составляющих кластер атомов марганца. Переход из одного состояния в последующее происходит при попадании одного кванта света и удалении одного из электронов из системы через остаток аминокислоты тирозина (Y_Z) белка D_1 . Выделение молекулярного кислорода из двух молекул воды происходит лишь при переходе из состояния S_3 в состояние S_4 , причем, поскольку состояние S_4 нестабильно, оно сразу же переходит в S_0 . При окислении двух молекул воды в 4-тактном процессе окисления также совершается последовательное выделение 4-х протонов в люмен тилакоида.

Четырехтактная цикличность процесса окисления воды и выделения кислорода при фотосинтезе была подтверждена в работе P. Joliot et al. (1969). Растения освещались серией микросекундных вспышек света. За такое время каждый реакционный центр фотосистемы II успевает получить только один квант света и, следовательно, каждый марганцевый комплекс окисляется лишь однажды. Было установлено, что максимальное выделение кислорода наблюдается на каждую четвертую по счету вспышку света, отражая четырехтактное накопление окислительных эквивалентов в Mn-содержащей системе окисления воды.

Следует отметить, что приобретенная более 2 млрд лет назад способность фотосинтезирующих организмов к выделению молекулярного кислорода привела к революционным преобразованиям на Земле. В этот момент происходит окисление соединений железа, серы и марганца. До появления кислород-выделяющих фотосинтезирующих организмов атмосфера Земли была разреженной и состояла главным образом из CO_2 и аммиака. По мере увеличения содержания кислорода возрастает окисление аммиака и в атмосфере значительно увеличивается содержание молекулярного азота. Фотосинтез, сопровождающийся образованием органических соединений, приводит к резкому снижению (более чем в 100 раз) содержания CO_2 в атмосфере. В результате первичная разреженная атмосфера превращается в плотную азот-кислородную, а в верхних слоях атмосферы формируется слой озона, задерживающий опасную для живых организмов ультрафиолетовую радиацию.

2.4.6. Z-схема фотосинтеза и транспорт электронов в фотосистемах I и II

Z-схема фотосинтеза. Последовательность расположения отдельных элементов электронтранспортной цепи (ЭТЦ) в тилакоидных мембранах хорошо иллюстрирует так называемая *Z-схема фотосинтеза* (см. рис. 2.20). На этой схеме представлена последовательность переноса электронов в ЭТЦ у фотосинтетических организмов. Вертикальными длинными стрелками показан процесс поглощения света в реакционном центре и переход молекул хлорофиллов P_{680} и P_{700} в возбужденное состояние (соответственно P_{680}^* и P_{700}^*). Сплошными стрелками отмечен *нециклический перенос электронов* по цепи. Стрелками с точками и пунктиром

показан *циклический путь электронов* в фотосистеме I и *реакция Мелера*. При нециклическом транспорте электрона в фотосистемах I и II синтез АТФ сопряжен с образованием НАДФН и выделением O_2 . В случае циклического переноса электрона по замкнутому участку цепи в фотосистеме I в качестве единственного продукта образуется АТФ. Следует отметить также, что отдельные элементы электрон-транспортной цепи расположены в соответствии с величиной их окислительно-восстановительного (редокс) потенциала. При фотосинтезе окислительно-восстановительные потенциалы реакций переноса электронов обычно лежат в диапазоне от +0,82 В (H_2O/O_2) до -0,42 В (ферредоксин).

Транспорт электронов в фотосистеме II. При поглощении энергии фотосистемой II хлорофилл P_{680} переходит в возбужденное состояние (P_{680}^*) и передает электроны феофитину. Окисленная форма хлорофилла (P_{680}^+) восстанавливается электронами, поступающими от тирозинового остатка (Y_Z) белка D1 реакционного центра фотосистемы II (см. рис. 2.15 и 2.20). Восстановление окисленной формы Y_Z осуществляется электронами, выделяющимися при фотоокислении воды. От феофитина электроны идут на пластохиноны. Вначале происходит восстановление молекулы "первичного" хинона Q_A , а затем — терминального акцептора электронов "вторичного" хинона Q_B . Далее через пул липидорастворимых пластохинонов (Q) и комплекс цитохромов b_6/f электроны передаются на водорастворимый белок пластоцианин, который восстанавливает окисленную форму хлорофилла P_{700}^+ .

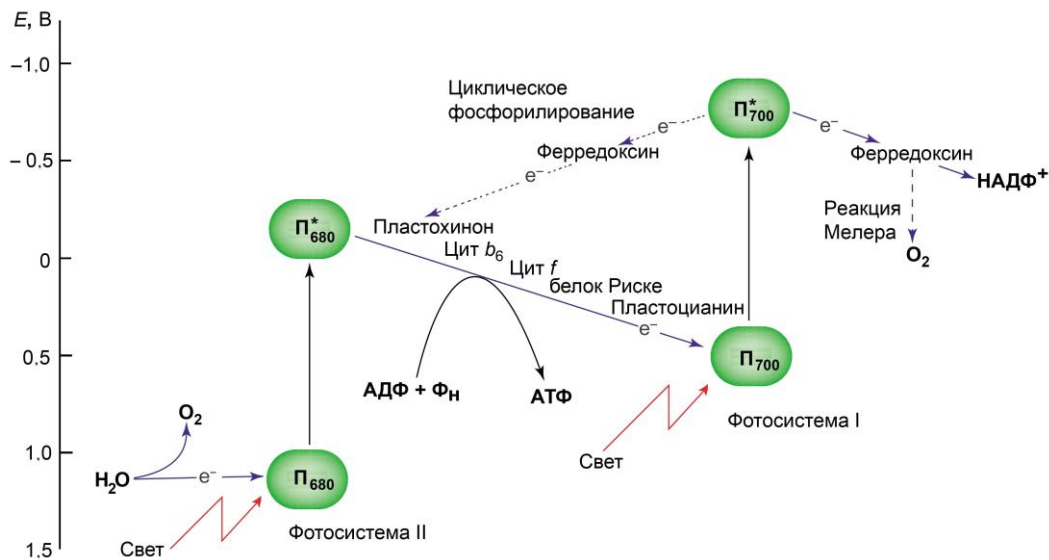


Рис. 2.20. Z-схема переноса электронов в фотохимических реакциях у фотосинтетических организмов (по Allen, 2004, с дополнениями)

Следует отметить, что наиболее уязвимыми звеньями фотосинтетического аппарата, которые в первую очередь повреждаются при действии таких стрессовых факторов, как повышенная и пониженная температура, высокая интенсивность видимого света, ультрафиолетовое излучение и тяжелые металлы, являются фотосистема II и система фотосинтетического окисления воды. Ингибирующий эффект более 50% гербицидов основан на их способности подавлять потоки электронов в фотосистеме II, что приводит к остановке всего процесса фотосинтеза.

Транспорт электронов в фотосистеме I. При поглощении энергии света фотосистемой I хлорофилл P_{700} переходит в возбужденное состояние (P_{700}^*) и передает электрон первичному акцептору — хлорофиллу a (A_0), а затем филохинону (A_1) (см. рис. 2.16 и 2.20). Далее следует серия мембранно-связанных железосерных белков (F_X , F_A , F_B), через которые электроны поступают на ферредоксин. От ферредоксина через флавопротеин — ферредоксин-НАДФ-редуктазу электроны идут на восстановление $НАДФ^+$ до НАДФН.

2.4.7. Механизм транспорта электронов и протонов в комплексе цитохромов b_6/f

В процессе транспорта электронов в комплексе цитохромов b_6/f происходит формирование пластосемихинона ($Q^{\cdot-}$) и последующее его восстановление до пластохинола (рис. 2.21). Липидорастворимые пластохиноны работают как "двухэлектронные ворота", поскольку в ходе окисления пластохинола (QH_2) один из двух электронов по линейной цепи направляется в фотосистему I, а второй электрон поступает в цикл цитохромов b_6/f (рис. 2.22).

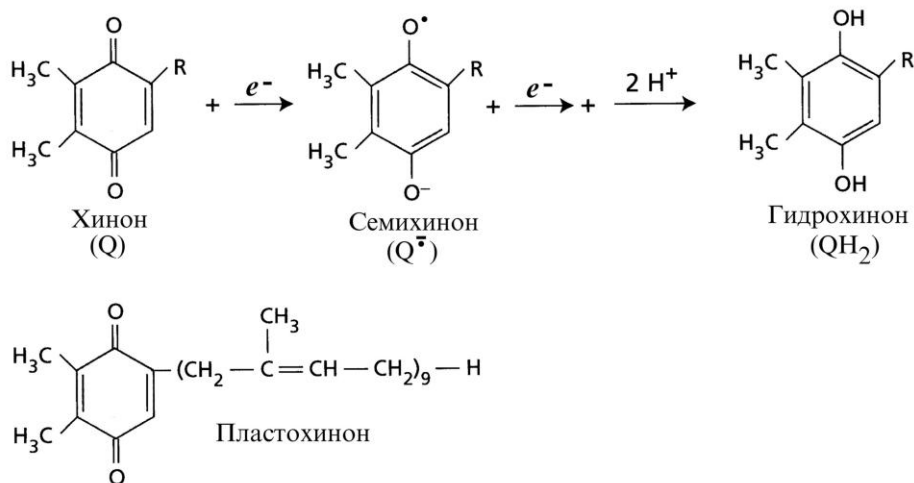


Рис. 2.21. Восстановление хинона в семихинон и гидрохинон.
Строение пластохинона

Таким путем достигается увеличение количества протонов, перекачиваемых через мембрану внутрь тилакоида. В цитохроме b_6 имеются два отдельных сайта для связывания восстановленной (QH_2) и окисленной (Q) форм пластохинона.

На первом этапе (*a*) после окисления пластохинола (QH_2) один из электронов передается на белок Риске (FeS_R) и далее на цитохром *f*, пластоцианин (Пц) и хлорофилл P_{700} (рис. 2.22, *a*). Второй электрон идет на низкопотенциальный (*L*) гем цитохрома b_6 . От восстановленного гема *L* электроны поступают на высокопотенциальный гем (*H*) цитохрома b_6 и далее на пластохинон (Q), который восстанавливается в пласто-семихинон (Q^\bullet). В итоге два протона выкачиваются внутрь тилакоида.

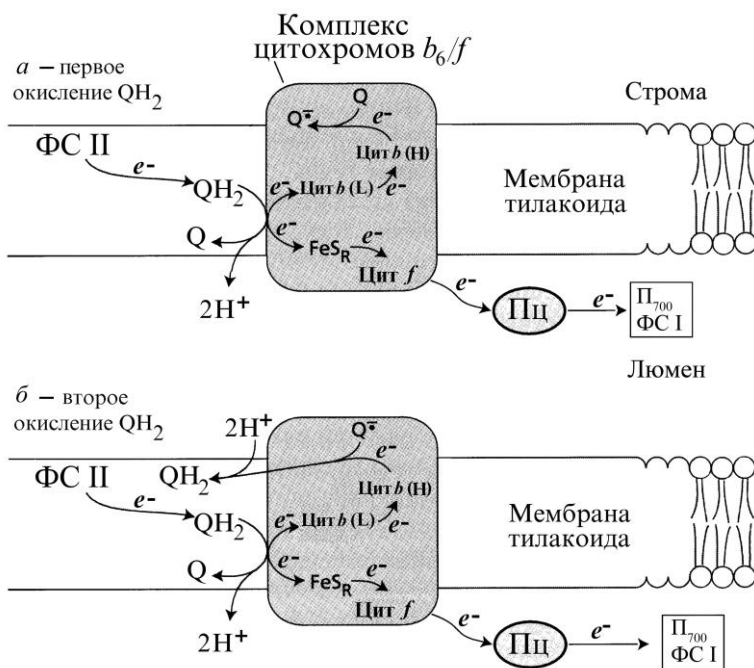


Рис. 2.22. Механизм транспорта электронов и протонов комплексом цитохромов b_6/f (Taiz, Zeiger, Blankenship, 1998)

На втором этапе (рис. 2.22, *б*) происходит окисление еще одной молекулы пластохинола (QH_2). Один из электронов идет по линейной цепи от белка Риске (FeS_R) через цитохром *f*, на пластоцианин и фотосистему I. Второй же электрон через низкопотенциальный (*L*) и высокопотенциальный (*H*) гемы цитохрома b_6 поступает на пласто-семихинон (Q^\bullet) и восстанавливает его до пластохинола (QH_2), при этом происходит связывание двух протонов из стромы. В результате еще два протона попадают в полость тилакоида. Таким образом, в процессе транспорта электронов

через комплекс цитохромов b_6/f на каждые 2 электрона, поставляемые в фотосистему I, через тилакоидную мембрану переносится 4 протона. Формируемый градиент ионов H^+ далее используется на синтез АТФ.

2.4.8. Циклический транспорт электронов и реакция Мелера

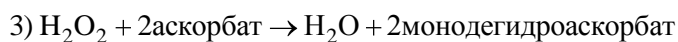
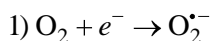
Помимо линейного, или нециклического пути электронов от воды к окисленному ферредоксину, в хлоропластах существуют альтернативные пути транспорта электрона, не приводящие к восстановлению НАДФ⁺ — циклический поток электронов в фотосистеме II, циклический транспорт электронов в фотосистеме I, а также поток электронов от фотосистемы I на кислород (реакция Мелера).

Циклический поток электронов в фотосистеме II связан с транспортом электронов от восстановленных пластохинонов (Q_A и Q_B) обратно в реакционный центр к окисленному пигменту P_{680}^+ . В этом процессе участвуют цитохром b_{559} , β -каротин и сопровождающие молекулы хлорофиллов ($Хл_Z$ или $Хл_D$). Циклический поток электронов в фотосистеме II является защитным механизмом, который включается, когда электронтранспортная цепь тилакоидов не справляется с утилизацией световой энергии или при повреждении системы фотоллиза воды.

В циклическом транспорте электронов фотосистемы I участвуют комплекс цитохромов b_6/f , пул пластохинонов и фермент ферредоксин-хиноноксидоредуктаза (см. рис. 2.20). В этом случае электроны от восстановленного ферредоксина идут не на восстановление НАДФ⁺, а переносятся на пластохиноны (с помощью ферредоксин-хиноноксидоредуктазы), далее на комплекс цитохромов b_6/f , а затем к окисленному P_{700}^+ . Единственным результатом такого циклического пути транспорта электрона является создание протонного градиента на тилакоидной мембране, который используется на синтез АТФ. Циклический поток электронов обычно незначителен, однако его активность, например, в клетках обкладки C_4 -растений, может существенно возрастать. Циклический поток электронов может быть альтернативным путем использования энергии света при его избытке.

В реакции Мелера (Alan Mehler, 1951) высокий восстановительный потенциал, генерируемый на акцепторной стороне фотосистемы I, расходуется не на восстановление НАДФ⁺, а используется для восстановления кислорода с образованием воды. Поэтому этот процесс называют также *циклом "вода—вода"* (рис. 2.23).

Перенос электронов на кислород может осуществляться как с ферредоксина, так и с железосерных кластеров белков F_A и F_B . Этот процесс идет в несколько этапов:



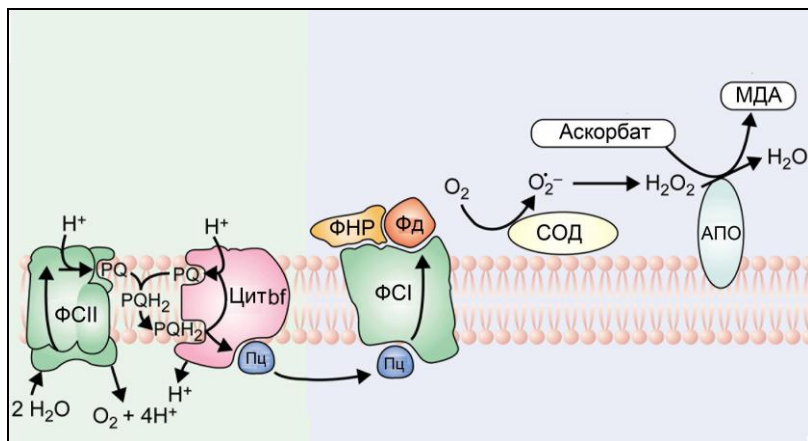


Рис. 2.23. Цикл "вода—вода" — реакция Мелера (Ort, Baker, 2002, с изменениями):
 ФСII — фотосистема II; ФСI — фотосистема I; Q — пластохинон;
 QH₂ — пластохинол; Цитbf — комплекс цитохромов b₆/f; Пц — пластоцианин;
 ФНР — ферредоксин-НАДФН редуктаза; Фд — ферредоксин;
 СОД — Cu-Zn-супероксиддисмутаза; МДА — монодегидроаскорбат;
 АПО — аскорбатпероксидаза

Вторую и третью реакции катализируют, соответственно, Cu-Zn-супероксиддисмутаза и аскорбатпероксидаза. Поэтому этот процесс иногда называют (*аскорбат*)пероксидазный путь Мелера. Активные формы кислорода ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2), образующиеся в пероксидазном пути Мелера, могут повреждать фотосинтетический аппарат, а также играть важную роль в процессах редокс-сигналикации. При наличии достаточного количества окисленного НАДФ⁺ практически весь поток электронов идет на его восстановление. При дефиците НАДФ⁺ происходит переключение потока электронов на кислород и запуск реакции Мелера.

2.5. Фотофосфорилирование

В цепи фотосинтетического транспорта электронов имеются два участка, на которых процесс переноса электронов сопровождается транспортом ионов H^+ внутрь тилакоидов. Один из них связан с фотолизом воды водоокисляющим комплексом фотосистемы II, другой — с окислением молекулы пластохинола b_6/f -комплексом. Энергия, выделяющаяся при окислении, трансформируется в электрохимический градиент ионов H^+ на мембране тилакоида. Дальнейшие энергетические превращения осуществляются АТФ-синтазным комплексом, который осуществляет трансформацию электрохимического градиента протонов в энергию макроэргической связи АТФ.

2.5.1. Хемиосмотический механизм синтеза АТФ

Механизм фосфорилирования АДФ, сопряженный с работой электрон-транспортной цепи на сопрягающих мембранах, объясняет *хемиосмотическая теория*, разработанная в 1961—1966 гг. применительно к митохондриям английским биохимиком, нобелевским лауреатом Питером Митчеллом (P. Mitchell). Он ввел понятие *сопрягающей мембраны*, т. е. мембраны, на которой процесс транспорта протонов сопряжен с процессом синтеза АТФ. Такие мембраны, по его мнению, должны быть непроницаемы для протонов и иметь электрон-транспортную цепь, в которой переносчики электронов и протонов чередуются с переносчиками только электронов. Сущность теории Митчелла можно свести к двум положениям: во-первых, электрон-транспортная цепь функционирует таким образом, что на мембране возникает электрохимический градиент ионов H^+ , а во-вторых, обратный ток ионов H^+ через протонный канал сопровождается образованием энергии фосфатной связи АТФ.

В 1967 г. Андре Ягендорф (A. T. Jagendorf) использовал теорию Митчелла для объяснения процессов *фотофосфорилирования* на тилакоидной мембране.

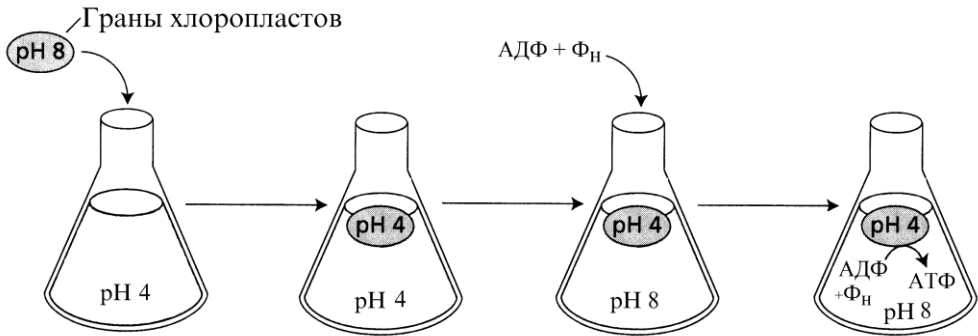


Рис. 2.24. Схема экспериментов Ягендорфа (Jagendorf, 1967)

На рис. 2.24 представлена схема его экспериментов. Изолированные из хлоропластов граны с pH 8 помещали в буферный раствор с pH 4. После инкубации pH в гранах выравнивался до 4. Затем граны с pH 4 переносились в буферный раствор с pH 8. Таким образом на тилакоидных мембранах искусственно задавался градиент протонов, который обычно формируется при фотохимических процессах (внутри тилакоида — pH 4, а снаружи — pH 8). В этих условиях, после добавления в среду АДФ и Ф_Н, в темноте синтезировалась АТФ. Эти эксперименты являются хорошим подтверждением применимости хемиосмотической теории Митчелла для объяснения процессов, происходящих при фотофосфорилировании в хлоропластах.

2.5.2. Структура и функционирование АТФ-синтазного комплекса

Синтез АТФ при фосфорилировании осуществляет *АТФ-синтаза* (АТФаза). Этот фермент (рис. 2.25) молекулярной массой около 400 кДа состоит из 2 крупных частей: гидрофобной, расположенной в тилакоидной мембране (CF_0), и гидрофильной, находящейся в строме (CF_1). Протоны проходят через канал, формируемый белками, входящими в состав (CF_0), попадают в комплекс белков CF_1 , где процесс транспорта ионов H^+ сопрягается с процессом фосфорилирования АДФ и образования АТФ. В CF_1 -комплекс входит 5 типов полипептидов: β (три), α (три), γ (один), δ (один) и ϵ (один). Каталитический центр располагается на β -субъединицах. Другие пептиды выполняют обслуживающие функции. В CF_0 -комплекс входят 4 типа пептидов (a , b , b' и c_{12}), которые формируют протонный канал.

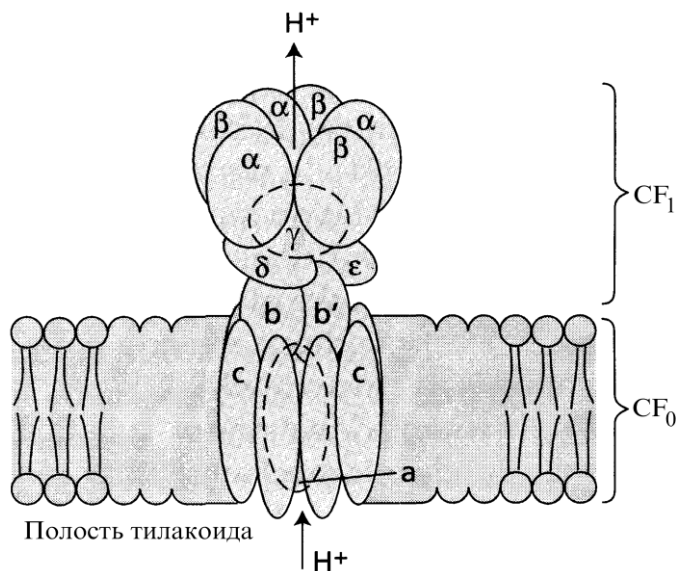


Рис. 2.25. Структура АТФ-синтазы хлоропластов (Бойер, 1997)

АТФ-синтаза играет ключевую роль в процессах трансформации световой энергии в хлоропластах и запасания ее в форме макроэргической связи АТФ. Для объяснения механизма функционирования АТФ-синтазного комплекса применяют гипотезу, предложенную Полем Бойером (Р. Boyer, 1993). Наиболее принципиальным моментом этой гипотезы является энергозависимое высвобождение АТФ от фермента. Предполагается, что в ходе катализа происходит вращение большей части CF_1 -комплекса на γ -субъединице. γ -субъединица при этом работает как стержень-

эксцентрик, который попеременно вращается то против β -, то против α -субъединиц. Энергия конформационных изменений трансформируется в энергию фосфатной связи АТФ.

Процесс синтеза АТФ условно разделяют на три этапа. На первом этапе происходит присоединение АДФ и Φ_H к активному центру фермента без затраты энергии. На втором этапе ионы H^+ , перемещаясь по протонному каналу по градиенту электрохимического потенциала, вызывают конформационные изменения фермента, в результате чего из АДФ и Φ_H синтезируется АТФ. В течение третьего этапа за счет энергии, выделяющейся при транспорте протонов, происходит высвобождение АТФ и возврат АТФ-синтазного комплекса в исходное состояние. Более подробно механизм работы АТФ-синтазного комплекса будет изложен в *разд. 3.8.4*.

2.6. Пути связывания углекислоты (темновые реакции фотосинтеза)

В предыдущих разделах мы выяснили, что продуктами световых реакций фотосинтеза являются АТФ и НАДФН. Далее происходят темновые процессы фиксации CO_2 , в которых используется "ассимиляционная сила" молекул АТФ и НАДФН. В этом разделе мы рассмотрим реакции, связанные с восстановлением CO_2 до углеводов.

Эксперименты по выяснению пути фиксации углекислоты при фотосинтезе удалось провести группе американских ученых во главе с Мелвином Кальвином (M. E. Calvin) благодаря трем обстоятельствам. Во-первых, в 1940 г. американскими биохимиками Сэмюэлем Рубеном (S. Ruben) и Мартином Каменом (M. D. Kamen) был получен долгоживущий изотоп углерода ^{14}C с периодом полураспада 5770 лет. Во-вторых, в 1944 г. два английских биохимика Арчер Мартин (A. Martin) и Рихард Синг (R. Sing) разработали метод двумерной хроматографии на бумаге, который позволял эффективно разделять и идентифицировать органические соединения (за это изобретение в 1952 г. они были удостоены Нобелевской премии по химии). И, наконец, к этому времени в руках исследователей оказался еще один очень удобный метод — автордиографии.

2.6.1. C_3 -путь фотосинтеза (Цикл Кальвина)

Американские биохимики М. Кальвин, А. Бенсон, Дж. Бассэм (M. Calvin, A. Benson, J. Bassham) и их коллеги для выяснения пути связывания CO_2 при фотосинтезе использовали одноклеточные зеленые водоросли *Chlorella* и *Scenedesmus*. Водоросли на определенное время помещали в среду, содержащую $^{14}CO_2$, затем клетки быстро фиксировали, экстрагировали из них различные соединения, разделяли их хроматографически и прослеживали включение радиоактивности. Оказалось, что

через 1 мин ^{14}C включается в C_3 – C_7 -сахара, фосфосахара, органические кислоты (яблочную, щавелевоуксусную, фосфоенолпировиноградную) и аминокислоты (аланин, аспарагиновую). Если же время экспозиции уменьшить до 0,1—2,0 с, то большая часть метки оказывается в фосfogлицириновой кислоте (ФГК), в ее карбоксильной группе: $\text{POH}_2\text{C} - \text{CHON} - ^{14}\text{COOH}$.

Следовательно, первичным продуктом при фиксации CO_2 при фотосинтезе является ФГК. Поэтому такой способ связывания углекислоты называли C_3 -путем фотосинтеза. Далее стали выяснять, что же является первичным акцептором углекислоты. Вначале в среду с хлореллой вводили различные C_2 -соединения, но это не приводило к увеличению включения ^{14}C в ФГК. Тогда схема опыта была изменена: сначала вводили 1% CO_2 , а затем резко снижали содержание углекислоты до 0,003%. Предполагалось, что при этом будет накапливаться именно то соединение, которое является первичным акцептором CO_2 . Оказалось, что в клетках резко увеличивается содержание рибулозо-1,5-бисфосфата (РубФ), который, вероятно, и является первичным акцептором углекислоты. Справедливость этого предположения была подтверждена в экспериментах с использованием меченого по ^{32}P РубФ. Если клеткам хлореллы давать ^{32}P -РубФ, то метка обнаруживается в составе фосfogлицириновой кислоты — $^{32}\text{POH}_2\text{C} - \text{CHON} - \text{COOH}$:



Следовательно, первичным акцептором углекислоты является 5-углеродный сахар — рибулозобисфосфат (РубФ).

Помимо этих экспериментов, определяли положение ^{14}C в молекулах других меченых соединений, что позволяло выяснить подробности их взаимопревращений. В итоге работы, которая длилась с 1946 по 1956 г., была расшифрована последовательность реакций, в ходе которых CO_2 превращается в углеводы. Исследования проводились большой группой ученых во главе с М. Кальвином и А. Бенсоном из университета Беркли (Berkeley, Калифорния). Этот процесс часто называют *циклом Кальвина* (или циклом Кальвина—Бенсона—Бассэма). В 1961 г. Мелвину Кальвину за эту работу была присуждена Нобелевская премия.

Процессы, осуществляющие фиксацию CO_2 и синтез углеводов в цикле Кальвина, условно делят на четыре стадии (рис. 2.26).

Стадия карбоксилирования. На этой стадии происходит присоединение CO_2 к диенольной форме рибулозобисфосфата (РубФ) и образование двух молекул фосfogлицириновой кислоты. Эта реакция катализируется ферментом рибулозобисфосфат-карбоксилазой (РубФ-карбоксилазой). Помимо карбоксилазной активности этот фермент может проявлять также активность оксигеназы (см. разд. 2.6.4). Поэтому его полное название — *рибулозобисфосфат-карбоксилаза/оксигеназа*, сокращенно называемая *РУБИСКО* (RuBisCO).

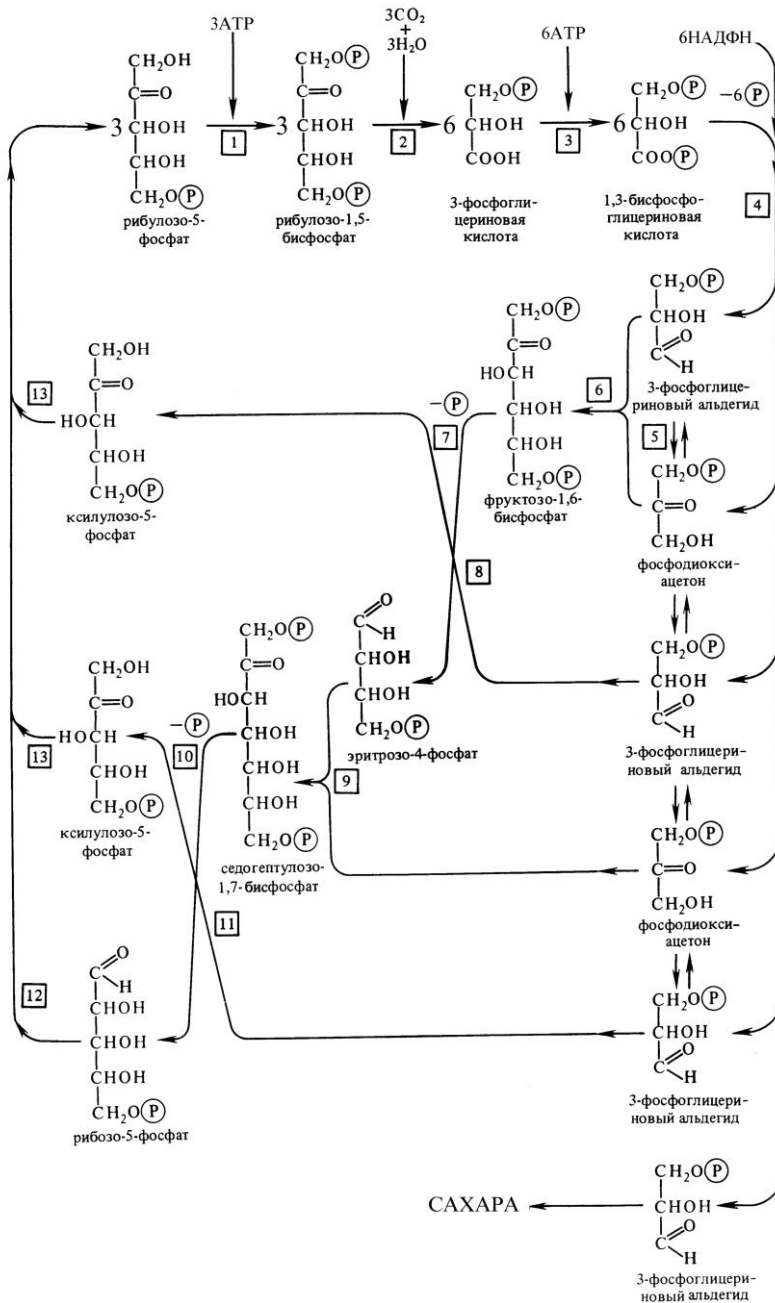


Рис. 2.26. C₃-путь фотосинтеза (цикл Кальвина). Ферменты: 1 — рибулозо-5-фосфаткиназа; 2 — рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа; (РУБИСКО); 3 — фосфоглицераткиназа; 4 — НАДФ-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; 5 — триозофосфатизомераза; 6 — альдолаза; 7 — фруктозо-1,6-бисфосфатфосфатаза; 8 — транскетолаза; 9 — альдолаза; 10 — седогептулозо-1,7-бисфосфатфосфатаза; 11 — транскетолаза; 12 — рибозо-5-фосфатизомераза; 13 — рибулозо-5-фосфатэпимераза

Молекулярная масса этого фермента очень высока — 540 кДа, он состоит из 8 больших (55 кДа) и 8 малых (13 кДа), кодируемых как геномом хлоропластов, так и ядерным геномом. Этот этап фотосинтеза наиболее важен для биосферы. РУБИСКО является наиболее распространенным ферментом в биосфере — его количество на нашей планете составляет около 10 млн. т, или около 2 кг на каждого жителя Земли. С участием этого фермента фотосинтезирующие организмы Земли ежегодно ассимилируют около 200 млн т CO_2 , превращая его в органические соединения, используемые всеми живыми организмами планеты.

Стадия восстановления ФГК. На этой стадии 3-фосфоглицериновая кислота восстанавливается до 3-фосфоглицеринового альдегида. Процесс идет в два этапа. Вначале под действием фермента фосфоглицераткиназы от молекулы АТФ на 3-ФГК переносится еще одна фосфатная группа и образуется 1,3-дифосфоглицериновая кислота (1,3-ФГК). На втором этапе происходит восстановление 1,3-ФГК в 3-фосфоглицериновый альдегид (3-ФГА) за счет НАДФН. Этот процесс катализируется ферментом *триозофосфатдегидрогеназой*. Восстановление 1,3-ФГК до 3-ФГА — единственный восстановительный процесс цикла Кальвина, в котором используется НАДФН, образуемый в фотохимических реакциях фотосинтеза. Последующие процессы цикла Кальвина необходимы для того, чтобы регенерировать (синтезировать) первичный акцептор CO_2 — рибулозо-1,5-бисфосфат для того, чтобы он вновь участвовал в фиксации CO_2 .

Стадия регенерации рибулозо-1,5-бисфосфата (РубФ). Основной итог этой стадии состоит в том, что пять молекул триозофосфата ФГА (что соответствует 15 атомам углерода) подвергаются перегруппировке, в результате которой образуются три молекулы 5-углеродного сахара — 1,5-рибулозобисфосфата. Этот процесс происходит в результате альдолазных и транскетолазных реакций с участием фосфатов трех-, четырех-, пяти-, шести- и семиуглеродных сахаров. В результате процессов альдольной конденсации, катализируемых соответствующими альдолазами, и транскетолазных реакций из 5 молекул 3-углеродных сахаров образуются 3 молекулы 5-углеродных сахаров, которые превращаются в РубФ.

Стадия синтеза углеводовных продуктов фотосинтеза. Как показано на рис. 2.26, вовлечение шести молекул CO_2 в цикл Кальвина приводит к образованию шести молекул ФГА, из которых пять молекул используются для регенерации РубФ, а одна покидает цикл и используется на синтез углеводовных продуктов фотосинтеза. На этом этапе из фосфоглицеринового альдегида и фосфодиоксиацетона под действием альдолазы синтезируется фруктозо-1,6-дифосфат, который затем может превращаться в сахарозу или крахмал.

Легко подсчитать, что для синтеза 1 молекулы глюкозы в цикле Кальвина необходимо 12 молекул НАДФН и 18 молекул АТФ. Цикл Кальвина функционирует у всех высших растений и водорослей, а также у большинства фототрофных и хемолитотрофных бактерий.

Система регуляции цикла Кальвина включает генетический, метаболический и энергетический уровни. Важнейшим фактором регуляции цикла является транс-

порт метаболитов из хлоропластов. Регулируемыми ферментами в цикле Кальвина, как правило, являются те, которые катализируют "необратимые" реакции, в ходе которых происходит значительный отрицательный перепад свободной энергии (от -41 до $-15,9$ кДж). Необратимыми в цикле Кальвина являются следующие процессы: реакция карбоксилирования, две реакции, связанные с работой фосфатаз, а также работа фосфорibuлозокиназы. Пять ферментов Кальвина активируются светом — РУБИСКО, триозофосфатдегидрогеназа, фруктозобисфосфатаза, седогептулозобисфосфатаза и фосфорibuлозокиназа.

2.6.2. C_4 -путь фотосинтеза

Листья таких растений, как сахарный тростник, кукуруза, сорго, амарант и многих других видов, способны фиксировать CO_2 не только в реакциях цикла Кальвина, но и другим путем, в ходе которого появляются C_4 -кислоты — щавелевоуксусная, яблочная и аспарагиновая. Такой способ связывания углекислоты получил название *C_4 -пути фотосинтеза*. Его осуществляют многие виды *Poaceae*, некоторые виды *Superaceae*, а также представители таких семейств двудольных растений, как *Acanthaceae*, *Aizoaceae*, *Amaranthaceae*, *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Chenopodiaceae*, *Caryophyllaceae*, *Euphorbiaceae*, *Nictaginaceae*, *Portulacaceae*, *Scrophulariaceae*, *Zygophyllaceae*.

Впервые возможность связывания углекислоты у растений в C_4 -кислотах была продемонстрирована в 1956—1957 гг. Л. А. Незговоровой. Ей удалось показать включение $^{14}CO_2$ в аспарагиновую кислоту и образование ^{14}C -аспартата. В исследованиях Ю. С. Карпилова с сотр. (1960) было установлено, что после инкубации в атмосфере с $^{14}CO_2$ на свету в листьях кукурузы до 70—80% метки вначале включается в малат и аспартат. В 3-фосфоглицериновой кислоте и сахарах ^{14}C выявляется много позже. Сходные результаты на листьях сахарного тростника в 1965 г. были получены Х. П. Корчаком с коллегами (Н. Р. Kortschak, С. Е. Hartt, G. O. Burr).

Впервые о том, что в растениях имеется еще один, отличный от цикла Кальвина C_4 -путь связывания CO_2 , заявили в 1966 г. австралийцы М. Д. Хэтч (M. D. Hatch) и К. Р. Слэк (C. R. Slack). Поэтому нередко C_4 -путь фотосинтеза называют *путем Хэтча и Слэка*. Однако, говоря о приоритетности открытия этого пути фотосинтеза, в последнее время чаще пишут (Govindjee, Krogmann, 2004): " C_4 -путь фиксации углекислоты был открыт в 1965—1966 гг. Корчаком, Хэтчем и Слэком с коллегами". При этом не забывают также цитировать более ранние работы Ю. С. Карпилова (Карпилов и др., 1960). К настоящему времени C_4 -путь фотосинтеза выявлен более чем у 10 000 видов растений.

Для листьев C_4 -растений характерно анатомическое строение *кранц-типа* (от нем. *kranz* — венец, корона), впервые описанное в 1884 г. немецким ботаником Готлибом Габерландтом (G. Haberlandt). Проводящие пучки у таких растений окружены двумя слоями зеленых клеток ассимиляционной паренхимы. Внешний

слой образуют *клетки мезофилла*, а внутренний слой составляют *клетки обкладки сосудистого пучка* (см. рис. 2.1). Обязательным признаком Kranz-обкладки является наличие в ее клетках хлоропластов. Клетки мезофилла и обкладки у C_4 -растений отличаются структурно и функционально. Хлоропласты клеток обкладки, как правило, содержат много зерен крахмала и не имеют гран. В клетках мезофилла хлоропласты имеют обычную гранальную структуру.

Для листьев C_4 -растений характерны многочисленные воздушные полости, по которым воздух из атмосферы подходит непосредственно к большому числу фотосинтезирующих клеток мезофилла, обеспечивая эффективное поглощение углекислоты. Особенностью строения листа C_4 -растений является наличие не более 2—3 слоев клеток мезофилла от ближайших клеток обкладки. Клетки обкладки, которые легко обмениваются продуктами фотосинтеза с клетками мезофилла с помощью большого числа плазмодесм, плотно упакованы вокруг проводящих пучков.

Фиксация углекислоты в этих клетках происходит в результате присоединения CO_2 к фосфоенолпировиноградной кислоте (ФЕП) и образования 4-углеродной щавелевоуксусной кислоты, которая затем превращается в яблочную или аспарагиновую кислоты (рис. 2.27).

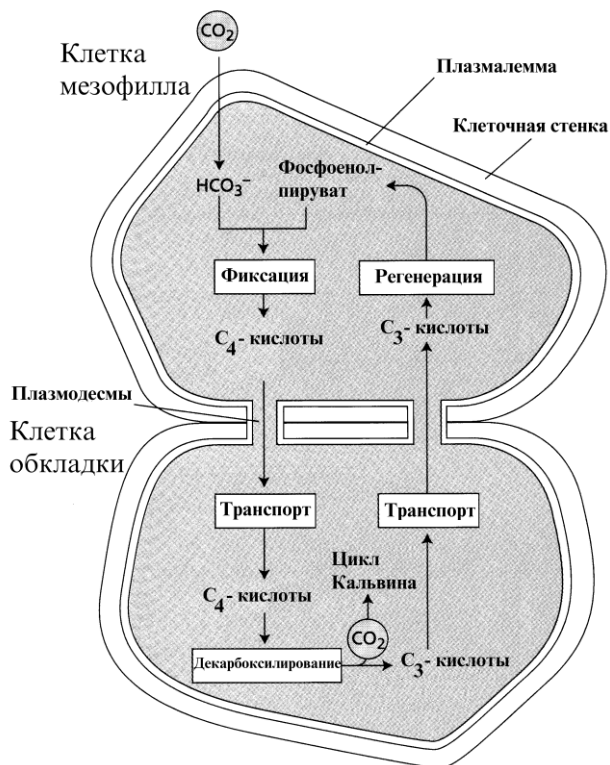


Рис. 2.27. C_4 -путь фиксации углекислоты (Taiz, Zeiger, 1998)

Необходимо особо отметить, что ФЭП-карбоксилаза, в отличие от РУБИСКО (которая связывает только CO_2), ассимилирует HCO_3^- в условиях очень низкого парциального давления CO_2 и высокого — O_2 . Затем C_4 -кислоты (малат или аспартат) транспортируются в клетки обкладки, где происходит их декарбоксилирование и образование C_3 -кислот. После этого C_3 -кислоты возвращаются в клетки мезофилла, а углекислота попадает в цикл Кальвина. C_4 -путь фотосинтеза иногда сравнивают с *углекислотным насосом*, поставляющим CO_2 в хлоропласты клеток обкладки для цикла Кальвина.

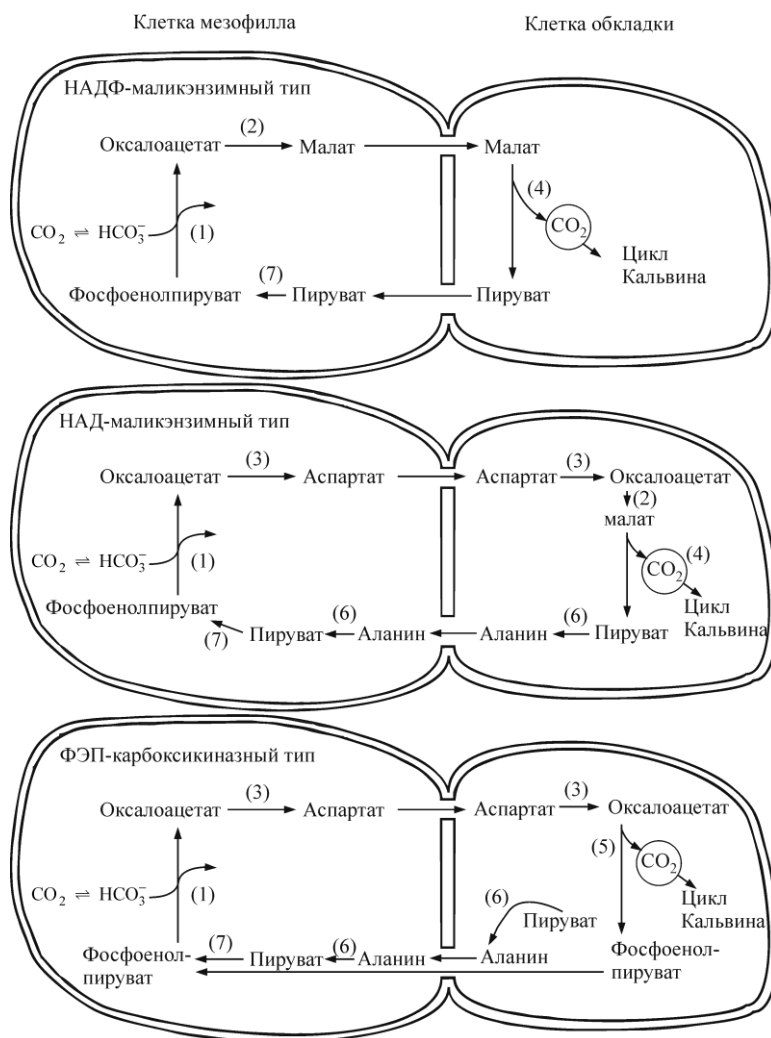
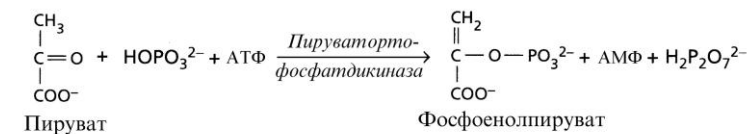
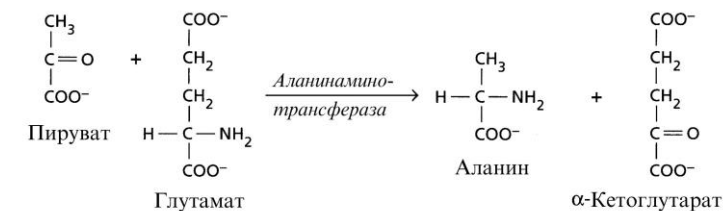
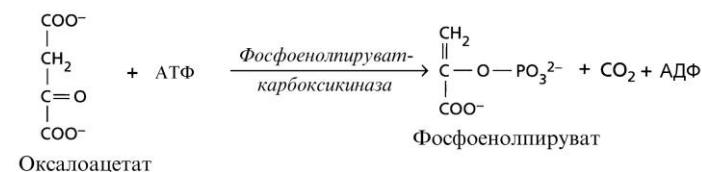
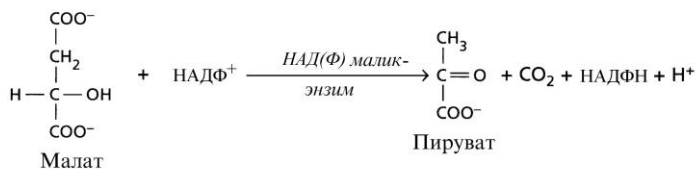
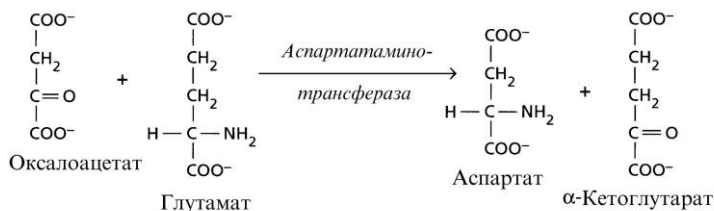
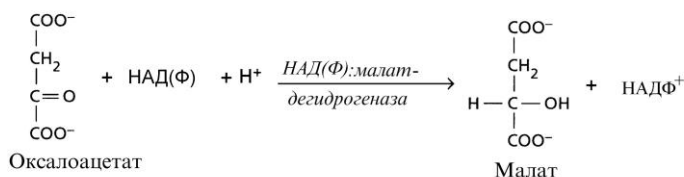
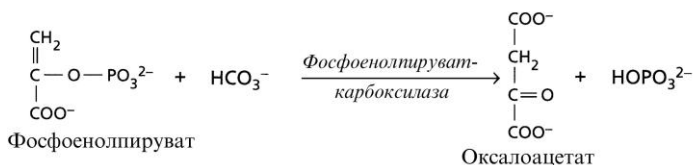


Рис. 2.28. Три варианта C_4 -пути фотосинтеза (Taiz, Zeiger, 1991). Ферменты:

- 1 — фосфоенолпируваткарбоксилаза; 2 — НАДФ-малатдегидрогеназа;
 3 — аспаргатаминотрансфераза; 4 — НАД(Ф)-маликэнзим; 5 — фосфоенолпируват-
 карбоксикиназа; 6 — аланинаминотрансфераза; 7 — пируватортофосфатдикиназа

Рис. 2.29. Отдельные реакции различных типов C₄-пути фотосинтеза

В хлоропластах клеток обкладки очень низка активность фотосистемы II и поэтому не происходит фотолиза воды и выделения кислорода. То есть в клетках обкладки, где функционирует РУБИСКО, поддерживается высокая концентрация CO_2 и низкая — O_2 . В этих хлоропластах энергия света идет только на синтез АТФ в результате работы фотосистемы I и циклического транспорта электронов. НАДФН, необходимый для синтеза углеводов в цикле Кальвина в хлоропластах обкладки, образуется при окислении маликэнзимом яблочной кислоты, поступающей из клеток мезофилла.

Различают три варианта C_4 -пути фотосинтеза — *НАДФ-маликэнзимный*, *НАД-маликэнзимный* и *ФЕП-карбоксиказный* (рис. 2.28).

Эти варианты отличаются по типу C_4 -кислоты, которая транспортируется в клетки обкладки (аспартат или малат), по типу C_3 -кислоты (пируват или аланин), которая возвращается в клетки мезофилла для регенерации, и, наконец, по типу декарбоксилирования в клетках обкладки. У кукурузы, сорго и сахарного тростника функционирует НАДФ-маликэнзимный тип фотосинтеза, у иван-чая, мари и амаранта — НАД-маликэнзимный, а у баклажанов — ФЕП-карбоксиказный. Отдельные реакции различных типов C_4 -пути фотосинтеза приведены на рис. 2.29.

C_4 -путь фотосинтеза чаще имеет место у растений засушливых и тропических районов, которые более устойчивы к засухе и засолению. Эти растения лучше растут при высоких интенсивностях света и дневной температуре 30—35 °С. Для C_4 -растений характерны более высокие скорости фотосинтеза [40—80 мг CO_2 /(дм² · ч)]; у C_3 -растений эти параметры составляют 15—40 мг CO_2 /(дм² · ч). У C_4 -растений меньше потери воды при транспирации, чем у C_3 -растений, соответственно 250—350 г и 450—950 г при увеличении сухого веса растения на 1 г. У растений с C_4 -путем фиксации углекислоты более высокие скорости роста (4—5 г сухого веса на 1 дм² поверхности листа в день по сравнению с 0,5—2,0 г у C_3 -растений).

2.6.3. Фотосинтез по типу толстянковых (САМ-метаболизм)

Для многих суккулентных растений, как, например *Kalanchoe spp.*, *Sedum spp.*, обитающих в засушливых и безводных условиях, характерен особый тип C_4 -фотосинтеза. Реакции, свойственные C_4 -пути фотосинтеза, у них идут ночью: за счет активности ФЕП-карбоксилазы происходит связывание CO_2 и накопление C_4 -кислот. Днем же C_4 -кислоты декарбоксилируются, а выделяющийся при этом CO_2 фиксируется РУБИСКО в C_3 -пути фотосинтеза. Поскольку это явление впервые было обнаружено у растений семейства *Crassulaceae* (толстянковых), данный тип обмена углерода был назван *метаболизмом кислот по типу толстянковых*

(*Crassulaceae acid metabolism*). Чаще этот тип фотосинтеза называют сокращенно — САМ-метаболизм. Термин САМ впервые ввел Беннет-Кларк (Bennet-Clark, 1933), анализируя суточные взаимопревращения органических кислот в листьях бриофиллума и очитка. В 1949 г. Томас и Биверс (Thomas, Beevers) применили его к процессу фотосинтеза у суккулентов.

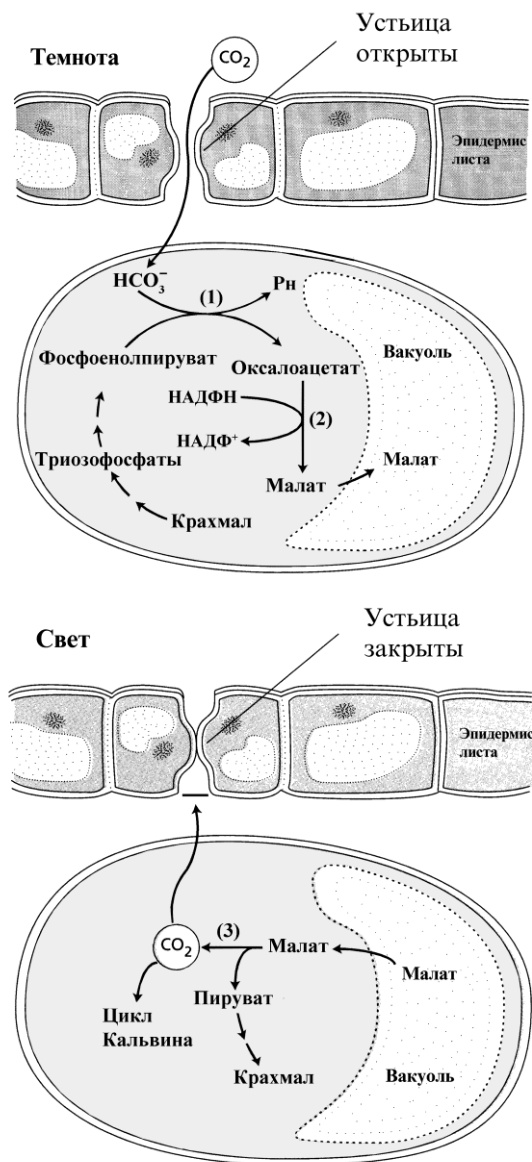


Рис. 2.30. Метаболизм кислот по типу толстянковых (Taiz, Zeiger, 1998). Ферменты: 1 — фосфоенолпируваткарбоксилаза; 2 — НАДФ:малатдегидрогеназа; 3 — НАДФ-маликэнзим

У суккулентов процесс фотосинтеза происходит в специализированной зеленой ткани — *хлоренхиме*, которая окружена водоносной тканью — *гидрэнхимой*. На долю водозапасающей гидрэнхимы может приходиться до 50% и более массы САМ-растений. При дефиците влаги именно гидрэнхима в течение длительного времени служит единственным источником воды для ассимилирующих тканей.

САМ-тип углеродного метаболизма распространен у представителей семейств однодольных растений — *Agavaceae*, *Bromeliaceae*, *Liliaceae*, *Orchidaceae*, двудольных — *Aizoaceae*, *Asclepiadaceae*, *Bataceae*, *Cactaceae*, *Caryophyllaceae*, *Chenopodiaceae*, *Compositiae*, *Convolvulaceae*, *Crassulaceae*, *Euphorbiaceae*, *Plantaginaceae*, *Portulacaceae*, *Vitaceae* и даже у папоротникообразных семейства *Polipodiaceae*. Выявлено около 20 000 видов растений, для которых характерен САМ-тип углеродного обмена.

У этих растений днем устьица обычно закрыты, что предотвращает потерю воды. Ночью устьица открываются, CO_2 начинает проникать в клетки листа и при участии фермента ФЕП-карбоксилазы взаимодействует с фосфоенолпируватом, образуя щавелевоуксусную кислоту (ЩУК). ЩУК под действием малатдегидрогеназы восстанавливается в яблочную кислоту (малат), которая начинает накапливаться в вакуолях клеток листа (рис. 2.30).

В течение дня, когда устьица закрыты, малат переносится в цитоплазму и декарбоксилируется при участии маликэнзима, образуя пируват и CO_2 . Высвободившаяся углекислота проникает в хлоропласты и фиксируется там РУБИСКО с образованием сахаров в цикле Кальвина.

Таким образом, у растений с метаболизмом кислот по типу толстянковых фиксация CO_2 с образованием малата (ночью) и декарбоксилирование малата с высвобождением углекислоты и образованием пирувата (днем) разделены во времени. В C_4 -растениях эти же процессы разделены пространственно: первый из них протекает в хлоропластах мезофилла, а второй — в хлоропластах обкладки.

2.6.4. Фотодыхание и метаболизм гликолевой кислоты

В 1948 г. О. В. Заленский писал: "Очень высокие интенсивности „дыхания“ листьев, часто определяющие отрицательный дневной баланс CO_2 и резко отличающиеся от величин, известных для других органов растений, заставляют сомневаться в возможности отождествления этих процессов... с настоящим дыханием". Он пришел к выводу, что выделение CO_2 листьями на свету необходимо рассматривать, "как самостоятельный физиологический процесс, связанный, но не идентичный происходящим в листе процессам фотосинтеза и дыхания". С другой стороны, еще Отто Варбургом (O. Warburg, 1920) было замечено, что интенсивность фотосинтеза водорослей резко возрастает, если снизить концентрацию кислорода во внешней среде. Это означает, что одновременно с фотосинтезом происходят какие-то окислительные реакции, сопровождающиеся выделением CO_2 и снижающие эффективность фотосинтеза.

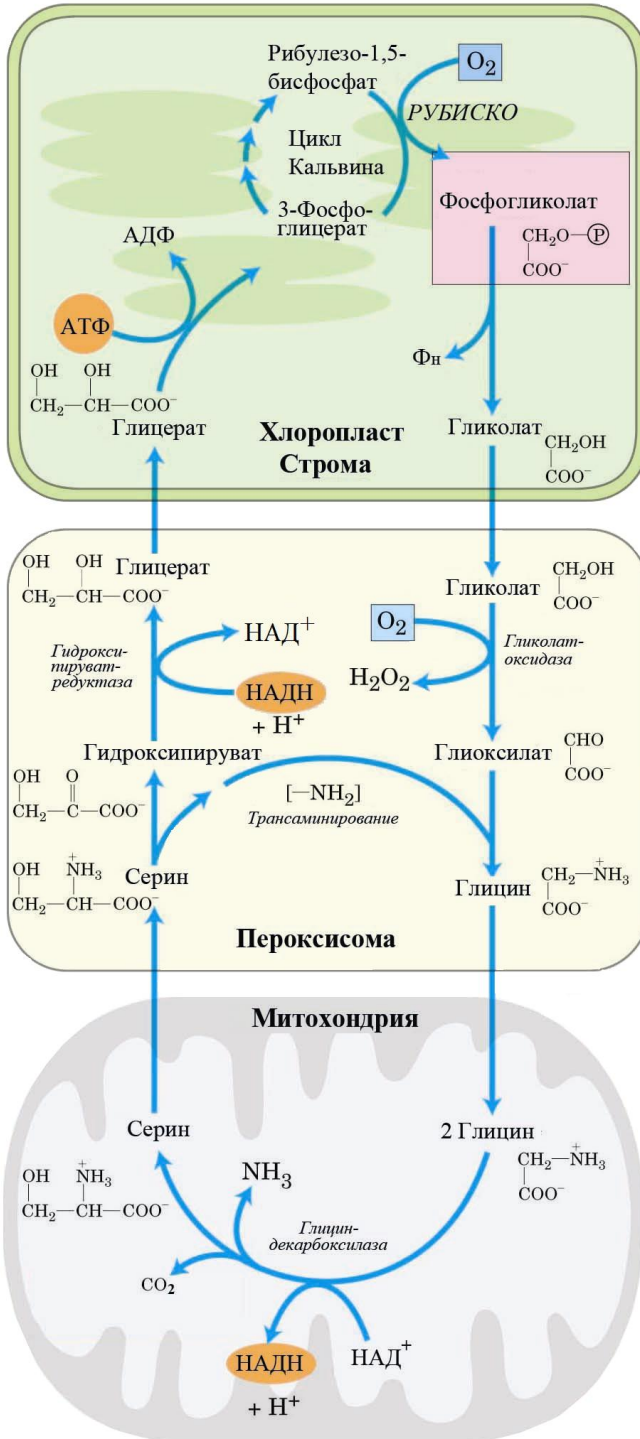
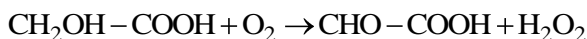


Рис. 2.31. Фотодыхание и метаболизм гликолевой кислоты (по Nelson, Cox, 2004)

Впоследствии стало известно, что молекулы CO_2 и O_2 конкурируют друг с другом в каталитическом центре РУБИСКО, и этот фермент может функционировать не только как карбоксилаза, но и как *оксигеназа* и катализировать окислительное расщепление 1,5-рибулозобисфосфата (РубФ) до фосфоглицериновой (ФГК) и фосфогликолевой кислоты (рис. 2.31).

В ходе дальнейших превращений гликолевой кислоты происходит выделение CO_2 и образование аминокислот. Поскольку в результате оксигеназной реакции РУБИСКО образуется C_2 -кислота — *гликолат*, этот процесс получил название C_2 -*путь фотосинтеза* или *фотодыхание* (т. к. в нем происходит поглощение O_2 и выделение CO_2).

Потери органических соединений при фотодыхании у некоторых растений могут достигать 50%. C_2 -путь фотосинтеза осуществляется с участием трех органелл — хлоропластов, пероксисом и митохондрий. Расщепление РубФ до гликолевой и фосфоглицериновой кислот происходит в хлоропластах. Затем гликолат поступает в пероксисомы и там окисляется гликолатоксидазой до глиоксильной кислоты:



Впервые этот процесс был описан П. А. Колесниковым (1948), а также Клагеттом с коллегами (С. О. Clagett, N. E. Tolbert, R. H. Burris, 1949). Появляющаяся при этом перекись водорода (H_2O_2) расщепляется каталазой, а глиоксилат аминируется и превращается в глицин, который поступает в митохондрии. Здесь из двух молекул глицина образуется аминокислота серин и выделяется CO_2 (рис. 2.31). Серин далее транспортируется в пероксисому и превращается вначале в гидроксипироват, затем в глицериновую кислоту и, наконец, в фосфоглицериновую кислоту (ФГК).

Таким образом, происходит замыкание C_2 -пути фотосинтеза, который часто называют C_2 -циклом фотоокисления углерода. Однако C_2 -путь фотосинтеза не всегда является циклом, т. к. иногда процесс идет только в одну сторону и завершается образованием серина и CO_2 в митохондриях. Фотодыхание усиливается, когда синтезируется слишком много углеводов продуктов фотосинтеза, а транспортные системы и потребление ассимилятов органами-акцепторами не справляются с их оттоком и утилизацией. В этих условиях углеводы начинают окисляться с образованием аминокислот, которые используются в самой ассимилирующей клетке.

У РУБИСКО способность связывать CO_2 значительно выше, чем кислород. Поэтому при естественных концентрациях этих газов в атмосфере (кислорода 21%, а углекислоты 0,036%) доля фотодыхания в фотосинтетическом газообмене листа составляет 25—30%. Однако если концентрация CO_2 уменьшается, а кислорода увеличивается, то роль фотодыхания в газообмене листа возрастает. В экстремальной ситуации (полное отсутствие CO_2 и 21% концентрации кислорода) фотодыхание превышает фотосинтез и на свету наблюдается не поглощение, а выделение CO_2 .

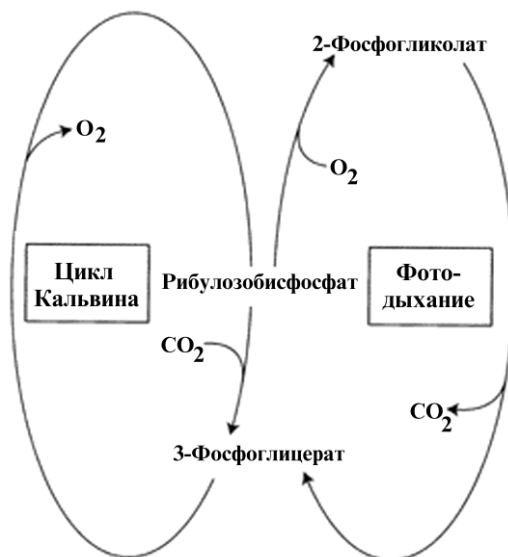


Рис. 2.32. Взаимодействие между C_3 - и C_2 -путями фотосинтеза

Суммарный поток углерода в листе у C_3 -растений определяется балансом между двумя этими циклами (рис. 2.32): в цикле Кальвина наблюдается связывание CO_2 и прирост биомассы растения, в цикле фотоокисления углерода (фотодыхании) происходит поглощение O_2 , выделение CO_2 и потеря фиксированного в фотосинтезе углерода. В обычных условиях эти два цикла работают одновременно в приблизительном соотношении 3 : 1.

У C_4 -растений и у САМ-растений процессы фотодыхания идут не так активно, как у C_3 -растений, поскольку концентрация HCO_3^- у них в тканях, содержащих РУБИСКО, гораздо выше, чем в атмосфере, и поэтому процессы карбоксилирования преобладают над окислением.

2.7. Синтез крахмала и сахарозы

Конечными, химически стабильными продуктами фотосинтеза, которые накапливаются в листьях в больших количествах, являются сахароза и крахмал. Впервые образование зерен крахмала при фотосинтезе продемонстрировал в 1864 г. немецкий ботаник Юлиус Сакс (J. Sachs). Он помещал зеленые листья на несколько часов в темноту для того, чтобы они израсходовали накопленный в них крахмал. Затем он выносил листья на свет, но при этом освещал только половину каждого листа, оставляя другую половину листа в темноте. Спустя некоторое время весь лист обрабатывался парами йода. В результате освещенная часть листа становилась темно-фиолетовой (в результате образования комплекса крахмала с йодом), в то время как окраска другой половины листа не изменялась.

новая кислота и глутамин, производные мочевины — аллантиин и цитруллин. В процессах оттока синтезируемых в ходе фотосинтеза органических соединений и их распределения по растению основная роль принадлежит флоэме.

2.8.1. Строение флоэмы

На рис. 2.34 приведено схематическое строение фрагмента флоэмы покрытосеменных растений, включающего ситовидные трубки и клетки-спутники. *Ситовидные элементы* отделяются друг от друга перегородкой, называемой *ситовидной пластинкой*.

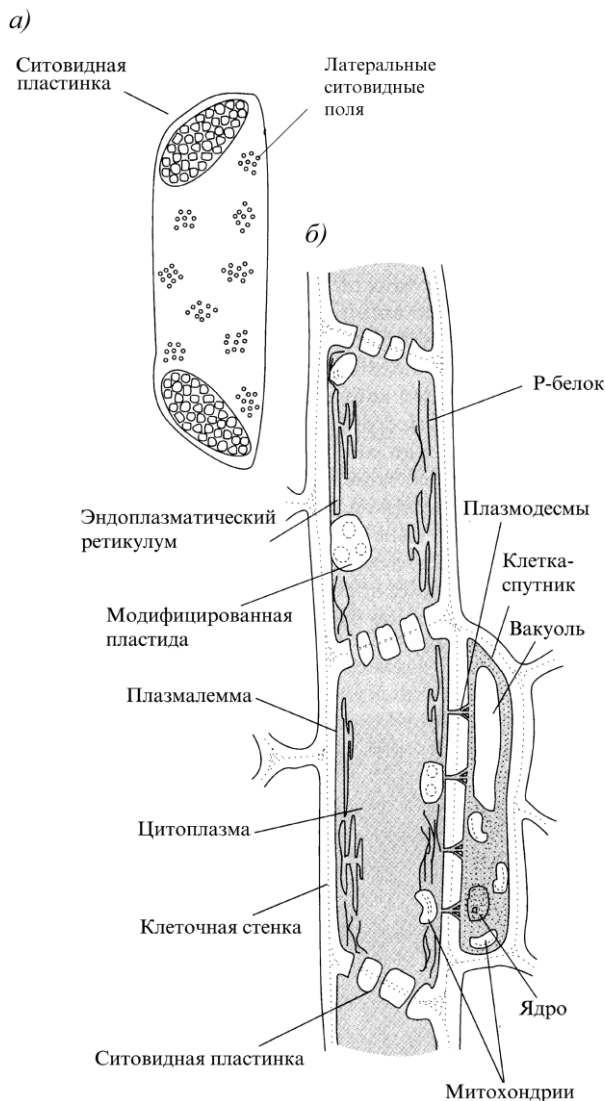


Рис. 2.34. Схематическое строение флоэмы (Dunford et al., 1998):

а — членик ситовидной трубки; б — строение ситовидной трубки и клеток-спутников

В зрелых *ситовидных трубках* имеется небольшое число редуцированных митохондрий и пластид, отсутствуют ядро и тонопласт и содержится большое количество *P-белков*. Эти белки обнаружены во многих растениях в тубулярной, фибриллярной, гранулярной и кристаллической формах. Выявлено, что *P-белки* состоят из 2 больших белков — флоэмного филаментного белка (PP_1) и флоэмного лектина (PP_2). Эти два белка синтезируются отдельно друг от друга в клетках-спутниках и через плазмодесмы попадают в ситовидные трубки, где ассоциируют в один белковый комплекс.

P-белки выполняют главным образом защитные функции, запечатывая поры ситовидных пластинок при ранениях. Когда происходит механическое повреждение, *P-белки* и некоторые другие соединения образуют пробку в порах ситовидных пластинок, предотвращая таким способом потерю флоэмного сока при поранениях. При длительном повреждающем воздействии и к наступлению зимы ситовидные элементы запечатываются полисахаридом *каллозой*, которая откладывается между плазматической мембраной и клеточной стенкой. Молекула каллозы содержит около 100 остатков D-глюкозы, соединенных между собой $\beta(1\rightarrow3)$ -гликозидными связями. Весной или при устранении повреждения каллоза гидролизуется до глюкозы и поры ситовидных пластинок открываются.

Клетки-спутники, или сопровождающие клетки, имеют большое количество оргanelл, особенно митохондрий и рибосом. Эти небольшие вытянутые вдоль ситовидных трубок клетки имеют крупное ядро и многочисленные выросты плазмалеммы, что резко увеличивает их поверхность. Они связаны с члениками ситовидных трубок многочисленными плазмодесмами. Транспорт ассимилятов в листе ориентирован от клеток мезофилла по клеткам-спутникам в ситовидные трубки и далее по всему растению. Транспорт идет от малых пучков в сторону более крупных со средней скоростью 50—100 см/ч. Тот факт, что сахароза концентрируется именно в ситовидных трубках, хорошо демонстрирует поведение тли — ее стилет точно попадает в клетки флоэмы.

2.8.2. Механизм флоэмного транспорта

Процесс загрузки сахарозы в клетки-спутники и ситовидные элементы схематически представлен на рис. 2.35. В плазмалемме клеток функционирует *протонный насос*, выкачивающий ионы H^+ наружу. Закисление апопласта способствует транспорту сахарозы и ионов K^+ из клеток мезофилла. Одновременно на мембране клеток-спутников активируется переносчик, который в режиме симпорта переносит внутрь клеток сахарозу и ионы H^+ . Этот процесс осуществляется белками, сродство которых к сахарам возрастает при их протонировании.

Вода и растворенные в ней вещества передвигаются в растении в соответствии с градиентом водного потенциала (рис. 2.36). Поэтому возрастание концентрации сахарозы будет приводить к притоку воды по градиенту осмотического потенциала и созданию высокого тургорного давления в полости ситовидных трубок.

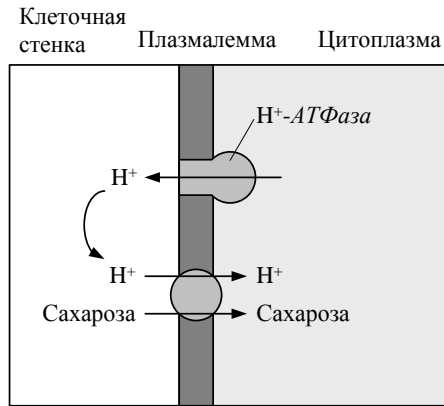


Рис. 2.35. Процесс загрузки сахаразы во флоэмные окончания (Dunford et al., 1998)

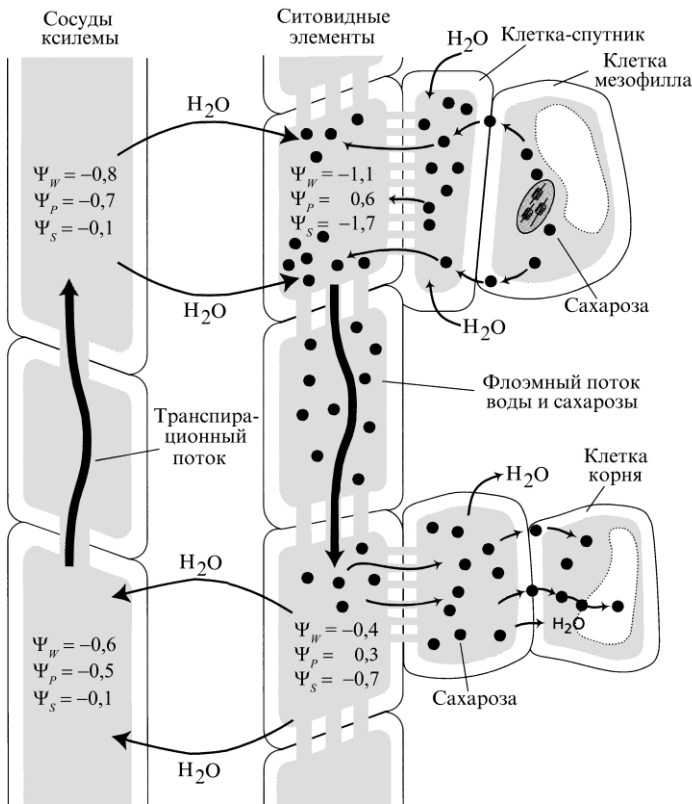


Рис. 2.36. Схема дальнего транспорта веществ в растении (Nobel, 1991): Ψ_w — водный потенциал (термодинамический показатель состояния воды в системе, градиент Ψ_w определяет направление водного тока в растении), МПа; Ψ_s — осмотический потенциал (зависит от концентрации осмотически активных веществ), МПа; Ψ_p — потенциал давления, отражает влияние на активность воды механического (гидростатического) давления, МПа

Процесс разгрузки сахаров происходит в обратном порядке. Сахароза в симпорте с протоном активным путем выводится из клеток флоэмы. Поскольку при этом происходит падение осмотического потенциала, вода выходит из клеток. Таким образом, движущей силой для потока ассимилятов от мест синтеза к гетеротрофным тканям служит градиент осмотического потенциала, формируемый вдоль ситовидной трубки.

2.9. Зависимость фотосинтеза от факторов внешней среды

В интактном листе три главных метаболических элемента определяют оптимальные параметры процесса фотосинтеза: активность РУБИСКО, регенерация 1,5-рибулозобисфосфата (РубФ) и метаболизм триозофосфатов. Первые два элемента в значительной степени зависят от внешних условий и в первую очередь от концентрации CO_2 и освещенности. На продуктивность фотосинтеза также влияют температура, обеспеченность растения водой и минеральными элементами.

2.9.1. Свет

Лист высших растений поглощает свет в красной и синей областях спектра, а отражает зеленые лучи. Большая часть (60%) попадающего на лист солнечного излучения не может участвовать в фотохимических процессах, поскольку имеет длину волны, которая не поглощается пигментами листа. Из оставшихся 40% фотосинтетически активных лучей солнечного спектра длиной волны 400—700 нм, часто называемых *фотосинтетически активной радиацией* (ФАР), 8% отражается поверхностью и проходит через лист, 8% рассеивается в виде тепла, 19% тратится (как тепловая энергия) на процессы, непосредственно не связанные с фотосинтезом, и только 5% попадающей на лист солнечной энергии превращается в энергию химических связей углеводов.

Анализ зависимости интенсивности фиксации CO_2 от мощности светового потока может дать очень полезную информацию о фотосинтетических свойствах листа. Выделяемый в темноте CO_2 является показателем интенсивности дыхания в условиях темноты.

При низкой освещенности на световой кривой можно выделить точку, когда количества углекислоты, поглощаемой при фотосинтезе и выделяемой в результате дыхания равны. Эта точка называется *световым компенсационным пунктом* (рис. 2.37). Увеличение освещенности выше светового компенсационного пункта вызывает постепенное возрастание интенсивности фотосинтеза. На этом участке интенсивность фиксации CO_2 лимитируется только мощностью светового потока. При дальнейшем увеличении интенсивности света кривая выходит на плато, что свидетельствует о насыщении процесса связывания углекислоты. В этих условиях процесс фотосинтеза уже лимитируется только содержанием CO_2 .

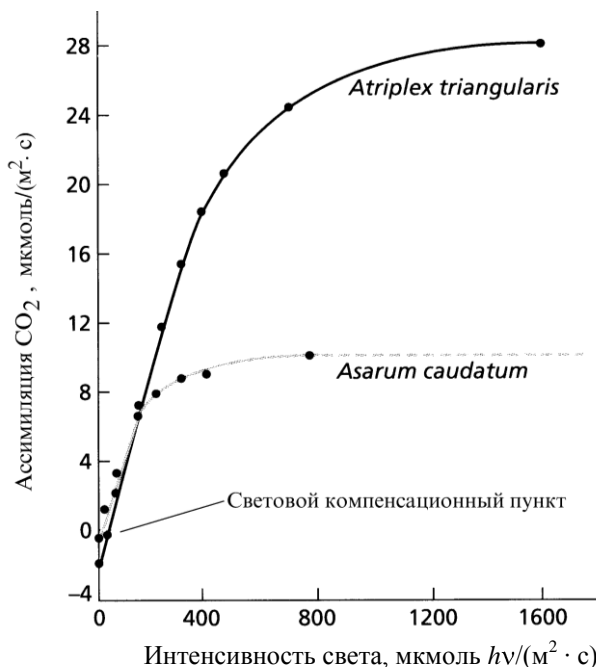


Рис. 2.37. Зависимость фотосинтеза от интенсивности света у лебеды (*Atriplex triangularis*) (светолюбивое растение) и у копытня (*Asarum caudatum*) (теневыносливое растение) (Harvey, 1979)

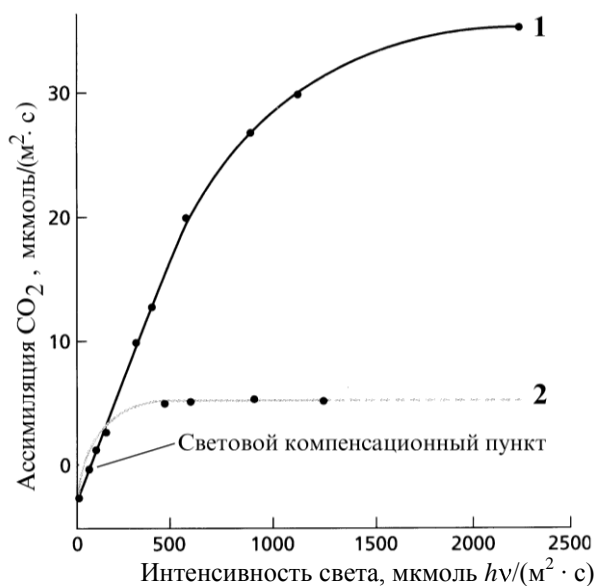


Рис. 2.38. Изменение интенсивности фотосинтеза листьев у лебеды (*Atriplex triangularis*), выращенной при различной освещенности (Bjorkman, 1981): 1 — растения выращены при освещении 920 мкмоль $hv/(m^2 \cdot c)$; 2 — при освещении 92 мкмоль $hv/(m^2 \cdot c)$

У светолюбивых видов насыщение происходит при более высокой освещенности (10—40 тыс. люкс), чем у теневыносливых (1 тыс. люкс). У некоторых высокогорных растений Памира, где освещенность достигает 180 тыс. люкс, насыщение наступает при 60 тыс. люкс. Если же светолюбивое растение, например *Atriplex triangularis*, вырастить при низкой освещенности (рис. 2.38), то насыщение будет происходить гораздо раньше.

На рис. 2.39 приведена фотография листа бобового растения *Thermopsis montana*, выращенного при различном освещении. Видно, что при сильном освещении лист толще и клетки его палисадной паренхимы длиннее, чем у листа, выращенного в затененных условиях. Поведение хлоропластов также зависит от мощности светового потока. На ярком свете хлоропласты концентрируются по периметру клетки, при затенении же они располагаются равномерно.

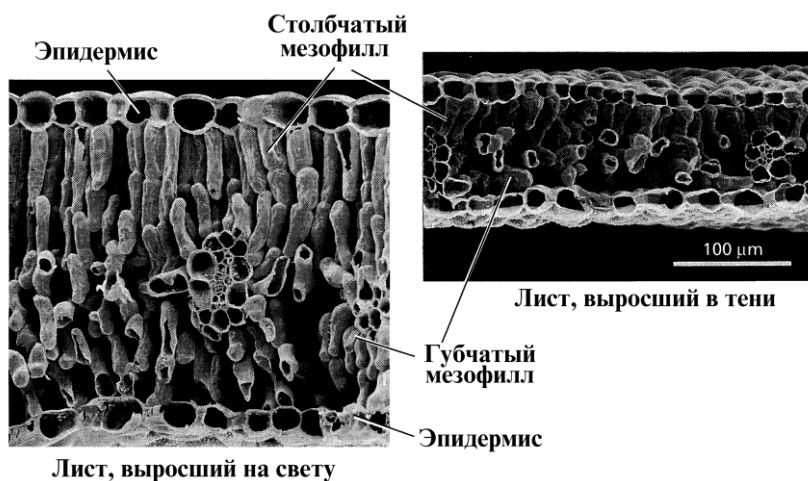


Рис. 2.39. Сканирующая электронная фотография листа термопсиса *Thermopsis montana*, выращенного при различном освещении (Vogelmann, Martin, 1993)

Активность фотосинтеза в области насыщающей интенсивности света лимитируется концентрацией CO_2 и зависит от мощности системы поглощения и восстановления углекислоты. Чем выше способность растения к восстановлению CO_2 , тем выше световая кривая фотосинтеза. Поэтому у растений с C_3 -путем фиксации CO_2 насыщение происходит при более низкой освещенности, чем у C_4 -растений, которые имеют более эффективную систему связывания углекислоты.

При фотохимических процессах важен спектральный состав падающего света. Для фотосинтеза наиболее эффективны красные и синие лучи, поскольку именно они соответствуют максимуму поглощения хлорофилла. Энергия кванта красного света составляет 41 ккал/моль, а энергия кванта синего света — 57 ккал/моль. Достигаемые же ими фотохимические эффекты одинаковы.

2.9.2. Углекислота

Содержание CO_2 в атмосфере составляет 0,036% или 360 ppm (*part per million*, частей на миллион). Содержание водяных паров в атмосферном воздухе обычно около 2%, а уровень O_2 — 21%. Основной же объем атмосферного воздуха (около 80%) приходится на азот.

Следует отметить, что многие биологические процессы, в которых участвуют газы (например, функционирование РУБИСКО), определяются не концентрацией, а парциальным давлением газа (CO_2 или O_2). В таких случаях необходимо знать не концентрацию, а парциальное давление, которое вычисляется умножением молярного содержания газа на общее атмосферное давление. Например, на уровне моря, где атмосферное давление составляет 0,1 МПа, парциальное давление CO_2 составит 36 Па.

Атмосферный CO_2 содержит изотопы углерода ^{12}C , ^{13}C и ^{14}C в количествах 98,9, 1,1 и 10^{-10} % соответственно. Поскольку содержание изотопа ^{14}C очень мало, он не имеет значимой физиологической роли. Химические свойства $^{13}\text{CO}_2$ идентичны $^{12}\text{CO}_2$, но из-за различий в массе (2,3%) большая часть растений предпочитает использовать более легкий $^{12}\text{CO}_2$, а не $^{13}\text{CO}_2$.

Растения с различными путями фиксации CO_2 отличаются по способности связывать тяжелый изотоп углерода. Так, например, содержание ^{13}C в тканях C_4 -растений всегда выше, чем у C_3 -растений. Эти различия объясняются тем, что РУБИСКО предпочтительнее связывает $^{12}\text{CO}_2$, чем $^{13}\text{CO}_2$. Эффективность же фиксации $^{12}\text{CO}_2$ и $^{13}\text{CO}_2$ ФЕП-карбоксилазой практически одинакова. Эти особенности C_3 - и C_4 -растений послужили основой для определения времени появления C_4 -пути фотосинтеза.

В 1993 г. Т. Церлинг (Т. Cerling) с коллегами анализировали динамику изменения содержания изотопа ^{13}C в ископаемых почвах и зубной эмали ископаемых животных (рис. 2.40). Они выявили резкое повышение содержания ^{13}C в образцах ископаемых остатков в период от 5 до 7 млн лет назад. На этом основании исследователи пришли к выводу, что появление C_4 -растений можно отнести к периоду позднего Миоцена.

За последние 200 лет содержание CO_2 в атмосфере возросло почти вдвое, что связано, в первую очередь, со сжиганием ископаемого топлива, а также с интенсивной вырубкой лесов. На рис. 2.41 приведены результаты систематических измерений концентрации CO_2 в атмосфере, проводимых на Гавайях начиная с 1958 г. Можно видеть, что содержание CO_2 в атмосфере Земли ежегодно возрастает в среднем на 1 ppm. Наибольшая концентрация CO_2 в атмосфере отмечается в мае, перед началом вегетационного сезона в северном полушарии, а наименьшая — в октябре.

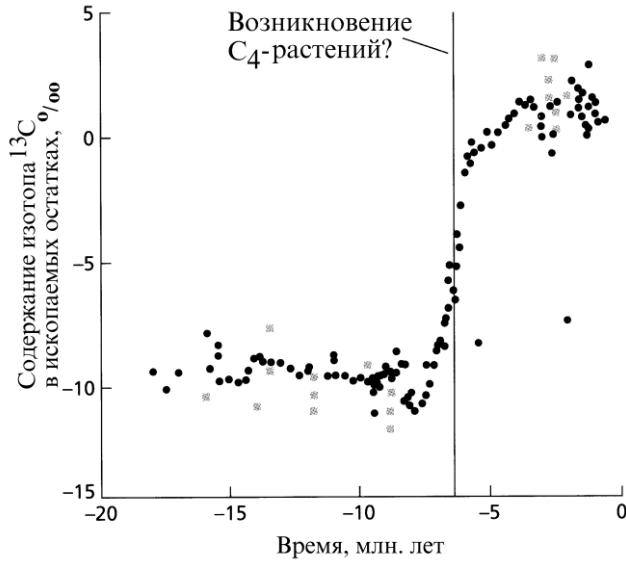


Рис. 2.40. Изменение содержания изотопа ^{13}C в ископаемых почвах и зубной эмали ископаемых животных (Cerling et al., 1997). Темные кружки и квадратики — соответственно ископаемые почвы и зубная эмаль ископаемых животных из Пакистана; светлые кружки — зубная эмаль ископаемых лошадей из Северной Америки

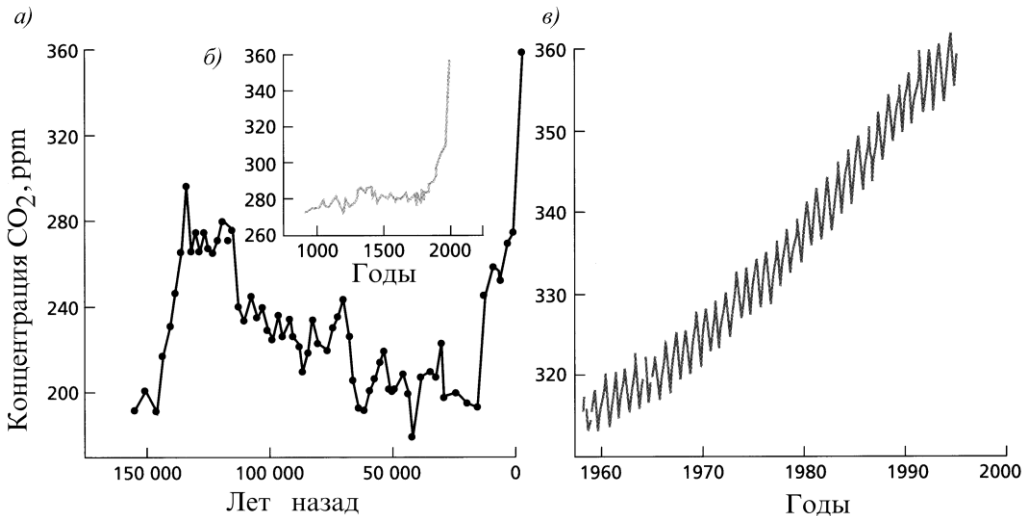


Рис. 2.41. Изменение содержания CO_2 в атмосфере Земли (Keeling et al., 1994; Keeling et al., 1995; Neftel et al., 1994): *a* — в течение 150 000 лет; *б* — в течение последних 1000 лет; *в* — с 1958 г.

Если содержание CO_2 в воздухе будет возрастать такими темпами, то к 2020—2030 гг. оно достигнет 600 ppm и будет составлять около 0,06% (Климов, 1996). Последствия этого явления интенсивно обсуждаются в связи с *парниковым эффектом*, которым обладают CO_2 и метан. Эти газы, так же как и стекло в теплице, задерживают распространение длинноволновой радиации, что приводит к сохранению тепла. Поэтому из-за возрастания концентрации CO_2 в атмосфере температура на поверхности Земли должна постепенно возрастать. Причем это повышение температуры будет минимальным в тропической зоне и максимальным в высоких широтах. Такое повышение температуры вызовет таяние льдов, что может привести к повышению уровня моря и затоплению значительной части суши. При этом двукратное повышение содержания CO_2 в атмосфере приведет к 60%-му повышению интенсивности фотосинтеза на Земле.

На рис. 2.42 показана зависимость интенсивности фотосинтеза от содержания (парциального давления) CO_2 в атмосфере.

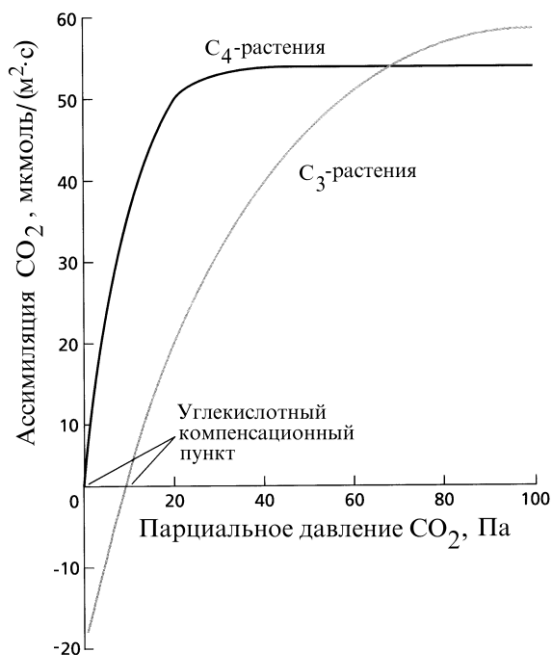


Рис. 2.42. Зависимость фотосинтеза от парциального давления CO_2 у C_4 -растения таволги арizonской (*Tidestromia oblongifolia*) и C_3 -растения креозотового куста (*Larrea divaricata*) (Berry, Björkman, 1980)

При низких концентрациях углекислоты у C_3 -растений количество CO_2 , фиксированное при фотосинтезе, меньше, чем количество CO_2 , выделяемое при дыхании. При повышении содержания CO_2 в воздухе можно зафиксировать точку, в которой

суммарное поглощение углекислоты в фотосинтезе (соответственно и выделение при дыхании) равно 0. Эта концентрация CO_2 называется *углекислотным компенсационным пунктом*. Этот параметр характеризует соотношение между процессами фотосинтеза и дыхания в зависимости от содержания CO_2 в атмосфере. У C_3 -растений, например *Larrea divaricata*, возрастание концентрации CO_2 выше углекислотного компенсационного пункта вызывает пропорциональную активацию фотосинтеза. У C_4 -растения *Tidestromia oblongifolia* насыщение фотосинтетической активности наступает при более низкой концентрации (около 0,02%), чем среднее содержание CO_2 в атмосфере.

2.9.3. Температура

Для большинства C_3 -растений умеренной климатической зоны оптимальная температура фотосинтеза находится в диапазоне 20—25 °С. Для растений с C_4 -путем фотосинтеза температурный оптимум приходится на 30—35 °С. Зависимость интенсивности фотосинтеза от температуры имеет вид параболы с максимумом от 25 до 35 °С. Однако при более высоких концентрациях CO_2 (насыщающих процесс фотосинтеза) температурный оптимум может смещаться до 35—38 °С. Именно при этих температурах хорошо идут многие ферментативные реакции. На рис. 2.43 показано влияние температуры на квантовый выход фотосинтеза у C_3 - и C_4 -растений. Можно видеть, что квантовый выход фотосинтеза у C_4 -растений не меняется в диапазоне температур от 12 до 40 °С. Совсем другая зависимость наблюдается у C_3 -растений, у которых квантовый выход фотосинтеза снижается с повышением температуры. Это снижение является результатом активации у C_3 -растений при повышенных температурах фотодыхания. Поэтому продуктивность C_4 -растений выше в южных регионах, а C_3 -растений — в северных.

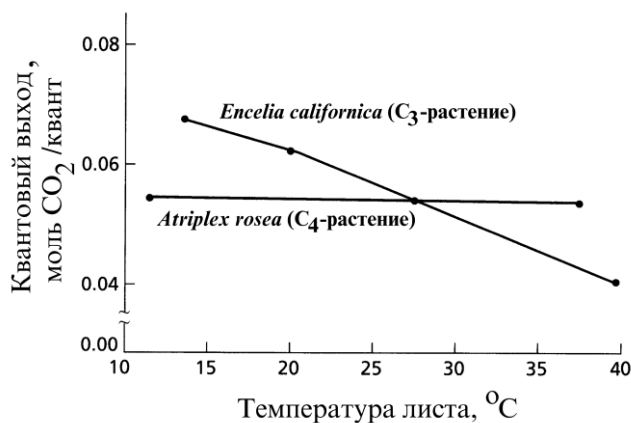


Рис. 2.43. Квантовый выход фотосинтеза у C_3 -растения *Encelia californica* и C_4 -растения лебеды (*Atriplex rosea*) в зависимости от температуры (Ehleringer, Björkman, 1977)

Оптимальные температурные условия для процесса фотосинтеза определяются, прежде всего, генотипом и условиями обитания растения. Растения, обитающие в условиях низких температур, как правило, имеют более высокие скорости реакций, чем растения, произрастающие в условиях высоких температур.

Высокая радиация опасна не только для животных, но и для растительных организмов. В полуденные часы (12—14 ч) температура листьев может становиться на 5—10 °С выше температуры воздуха. В этот период, который иногда называют *полуденной депрессией фотосинтеза*, клетки переполняются крахмалом, нарушается отток ассимилятов, активизируются процессы, приводящие к накоплению свободных радикалов.

У растений имеется несколько уровней защиты от повреждения солнечной радиацией. Первая линия защиты связана с рассеиванием энергии света, поглощенной листом, в виде тепла. Воска и кутин, а также волоски, покрывающие лист (особенно у растений засушливых зон с повышенной инсоляцией) защищают лист от избытка света. Отражение света от гладких глянцевых поверхностей листа преимущественно зеркальное, а от волосков, чешуек и других образований эпидермиса — диффузное. На втором уровне начинает функционировать система утилизации образующихся токсических продуктов (активных форм кислорода, перекисей, свободных радикалов), которая включает каротиноиды, аскорбиновую кислоту и различные формы супероксиддисмутаза. Если же второй уровень защиты не справляется, токсические продукты вызывают повреждение в первую очередь тех молекул, которые особенно чувствительны к свету, например белок D₁, входящий в состав фотосистемы II.



Клеточное дыхание растений

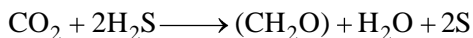
Хорошую теорию можно отличить от плохой по тому признаку, что первая ведет к новым перспективам и увлекательным экспериментам, тогда как вторая большей частью рождает только новые теории, цель которых спасти породившие их теории.

А. Сент-Дьёрдьи

Клеточное дыхание — это окислительный распад органических соединений, происходящий с участием кислорода, который приводит к генерации трансмембранного электрохимического градиента ионов водорода ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$) и синтезу химически активных метаболитов, используемых как источники энергии или восстановители (АТФ, конденсированные неорганические фосфаты, НАД(Ф)Н и др.). Клеточное дыхание однотипно у животных и растений и складывается из гликолиза, цикла Кребса и процесса окислительного фосфорилирования. В гликолизе сахара расщепляются до пировиноградной кислоты с образованием двух молекул АТФ. В цикле Кребса пировиноградная кислота подвергается окислительному декарбоксилированию с формированием пула восстановленных коферментов дегидрогеназ — НАДН и ФАДН₂. На заключительном этапе дыхания в процессе окислительного фосфорилирования происходит окисление НАДН и ФАДН₂ с участием кислорода, сопряженное с генерацией трансмембранного градиента ионов водорода ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$) и синтезом АТФ.

Древняя атмосфера была прозрачна для ультрафиолетового излучения, и поэтому первые организмы жили в глубинах океана под защитой толщи воды. Для связывания углекислоты в ходе фоторедукции эти организмы могли использовать только бедное энергией инфракрасное излучение и сероводород:

инфракрасное излучение



Интенсивно размножаясь, окрашенные серобактерии постепенно истощили запасы веществ, служивших донорами водорода. На смену им появляются цианобактерии, способные в качестве источника протонов использовать Н₂О. Однако фотосинтез

с участием воды требует в 7 раз больше энергии, чем фоторедукция. Цианобактерии приобрели способность осуществлять фотоокисление воды за счет квантов красного и синего света:



При этом вода была нужна только как поставщик электронов и H^+ . Кислород же, как побочный продукт, выделялся в атмосферу. В результате жизнь на Земле начала радикально изменяться. Появился слой озона, поглощающий ультрафиолетовое излучение. Живые организмы под защитой озона постепенно начали завоевывать сушу. Однако в атмосфере происходило увеличение содержания O_2 , который является сильнейшим окислителем. И на Земле стали появляться организмы, способные использовать кислород для получения энергии в процессе дыхания.

3.1. История представлений о дыхании растений

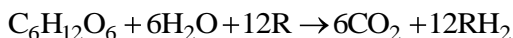
Первые количественные измерения дыхания растений были проведены швейцарским химиком Н.-Т. Соссюром (N.-T. de Saussure, 1804). Он помещал листья на ночь в сосуд, наполненный воздухом. При этом наблюдалось поглощение кислорода и выделение углекислого газа. Если на следующий день листья выставлялись на солнечный свет, то они выделяли почти такое же количество кислорода, какое поглотили ночью. Затем свои исследования Соссюр распространил и на незеленые части растений и показал, что дыхание наблюдается также в прорастающих семенах, стеблях, корнях, плодах и цветках. Он доказал также, что потеря в весе растения при дыхании равна весу выделенного углерода.

Одним из классиков, заложивших современные представления о химизме дыхания, является В. И. Палладин. В 1907—1912 гг. он создал теорию дыхания, согласно которой универсальным путем окисления является отнятие от веществ (субстратов) водорода с участием специальных ферментов. После этого водород может передаваться или на молекулу кислорода с образованием воды, или на другие молекулы, восстанавливая их.

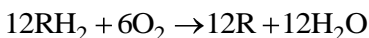
В своих экспериментах В. И. Палладин использовал краситель метиленовый синий и зародыши пшеницы. Если в пробирку с метиленовым синим поместить зародыши пшеницы и выкачать воздух, то краситель через некоторое время обесцветится. Если же открыть пробирку (дать кислород), то метиленовый синий синееет. Обнаруженные эффекты он объяснял тем, что живые ткани в анаэробных условиях способны восстанавливать метиленовый синий (обесцвечивая его) за счет присоединения водорода. При контакте с кислородом краситель окисляется и приобретает исходный синий цвет.

Согласно теории В. И. Палладина дыхание представляет собой окислительно-восстановительный процесс, состоящий из двух этапов — анаэробного и аэробного. *На первом, анаэробном этапе* происходит окисление органических субстратов за счет отнятия водорода с участием воды. При этом водород с помощью фермен-

тов (дегидраз) передается на "окрашенный дыхательный пигмент" (R), который превращается в "бесцветный дыхательный хромоген" (RH₂):



На втором, аэробном этапе "бесцветный дыхательный хромоген" (RH₂) окисляется оксидазами, активирующими кислород. При этом O₂ восстанавливается до воды, а дыхательный хромоген (RH₂) превращается в дыхательный пигмент (R):



Из двух уравнений, предложенных В. И. Палладиным, вытекают ряд очень важных положений:

- весь выделяющийся при дыхании CO₂ анаэробного происхождения;
- неизменным участником дыхания является вода;
- вода, наряду с окисляемым субстратом, играет роль донора водорода;
- в процессе дыхания участвуют специфические ферменты, отнимающие водород от субстрата;
- первый анаэробный этап дыхания не требует молекулярного кислорода;
- молекулярный кислород используется на заключительном этапе дыхания для регенерации акцепторов водорода с образованием воды.

Следует отметить, что точка зрения В. И. Палладина на процесс дыхания не была им достаточно хорошо обоснована экспериментально и явилась в значительной мере плодом научной интуиции автора. Тем не менее *все положения* теории В. И. Палладина в дальнейшем были полностью подтверждены и на растительных, и на животных объектах и легли, как мы увидим далее, в основу современных представлений о процессе дыхания. Ферменты, принимающие непосредственное участие в "отнятии" водорода от субстратов, в настоящее время называются дегидрогеназами, а ферменты, участвующие в восстановлении O₂ до воды — оксидазами.

В 1875 г. немецкий физиолог Э. Пфлюгер (E. F. W. Pflüger) показал, что лягушка, помещенная в среду без кислорода, некоторое время остается живой и при этом выделяет CO₂. Он назвал такой тип "дыхания" *интрамолекулярным*. Его точку зрения поддержал немецкий физиолог растений В. Пфеффер (W. Pfeffer), который распространил эти представления на растения. Предполагалось, что в анаэробных условиях происходит расщепление глюкозы до этилового спирта и CO₂. На втором этапе спирт окисляется кислородом с образованием углекислого газа и воды. Представления Э. Пфлюгера и В. Пфеффера длительное время оказывали определяющее влияние на представления о химизме дыхания (и брожения), но так и не получили экспериментального подтверждения.

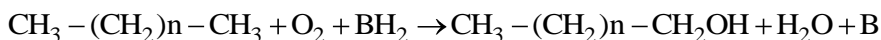
Фундаментальное значение в понимании связи между дыханием и брожением имели исследования (1907—1911) ученика В. И. Палладина — С. П. Костычева.

Анализируя выводы, сделанные В. Пфедфером и Э. Пфлюгером, С. П. Костычев пришел к выводу, что этанол не может быть промежуточным продуктом нормального аэробного дыхания по двум причинам. Во-первых, этанол ядовит, а во-вторых, он окисляется хуже, чем глюкоза. Он сделал вывод, что при анаэробном распаде сахаров образуются промежуточные продукты, общие и для дыхания, и для брожения. В дальнейшем эти продукты при наличии свободного кислорода окисляются (в результате дыхания) до углекислоты и воды, а при отсутствии кислорода (при брожении) образуют углекислоту и спирт. В ходе дальнейших работ С. П. Костычеву и его ученику С. В. Солдатенкову удалось доказать, что таким промежуточным продуктом является *пировиноградная кислота*.

Перекисная теория, сформулированная в 1893—1897 гг. русским ученым А. Н. Бахом, в сущности, была первой теорией биологического окисления. А. Н. Бах исходил из представлений, что, хотя молекулярный кислород — достаточно инертное соединение, он способен выступать в качестве окислителя, если происходит разрыв двойной связи между его атомами. Расщепление двойной связи между атомами кислорода осуществляют соединения (А), которые Бах назвал *оксигеназами*. Бах предполагал, что процесс "перекисного" окисления начинается с того, что соединение А взаимодействует с кислородом и, разрывая двойную связь, образует пероксид (AO_2) обладающий высокой реакционной способностью. Активированный таким образом кислород (AO_2) приобретает способность непосредственного присоединения к молекуле окисляемого вещества.

Тем не менее долгое время биологическое окисление ассоциировалось только с отщеплением от окисляемого субстрата ионов водорода и (или) электронов. При этом подразумевалось, что кислород, входящий в состав органических соединений при окислении, попадает туда только из воды. И только в 1955 г. О. Хайяши (О. Hayashi) и Х. Мэсоном (Н. Mason) независимо друг от друга были получены доказательства перекисной теории окисления Баха. Ими было установлено, что ^{18}O может включаться в ряд органических веществ непосредственно из $^{18}\text{O}_2$.

В настоящее время выявлено большое число ферментов с оксигеназными функциями, которые принимают участие как в процессах синтеза, так и катаболизма органических соединений. Оксигеназы подразделяются на *диоксигеназы* и *монооксигеназы*. Монооксигеназы называют также *гидроксилазами*. Диоксигеназы катализируют включение в молекулу двух атомов кислорода, тогда как монооксигеназы осуществляют включение только одного атома. Другой атом кислорода молекулы O_2 переходит в состав воды. Типичной монооксигеназной реакцией является гидроксилирование алкана в спирт:



Характерным свойством монооксигеназ является потребность в дополнительном восстановленном субстрате (ВН_2), который восстанавливает второй атом молекулы O_2 в H_2O . В качестве такого косубстрата наиболее эффективна аскорбиновая

кислота. К монооксигеназам (или гидроксилазам) относятся цитохром P₄₅₀, эпоксидаза, ряд ферментов, участвующих в синтезе стероидов, гиббереллинов и алкалоидов. К классу диоксигеназ причисляют липоксигеназы — ферменты, принимающие участие в окислении ненасыщенных жирных кислот.

3.2. Типы окислительно-восстановительных реакций

Мы живем в среде, содержащей мощный окислитель — O₂. В процессе дыхания, идущего в клетках, кислород восстанавливается до H₂O — слабого восстановителя. На другом конце шкалы окислителей находится H⁺ — очень слабый окислитель, который отдельные бактерии способны превращать в сильный восстановитель H₂. O₂ – H₂O и H⁺ – H₂ — это две очень важные в биологическом отношении окислительно-восстановительные системы. Между ними находится множество других пар соединений, которые участвуют в окислительно-восстановительных реакциях, протекающих внутри клетки и имеющих большое значение для метаболизма: Fe³⁺ – Fe²⁺, NO₃⁻ – NO₂⁻, хинон–гидрохинон, оксалоацетат–малат, НАД⁺–НАДН.

Существуют два общепринятых способа выражения окислительных и восстановительных свойств сопряженных окислительно-восстановительных пар:

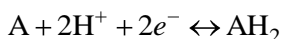
- по изменению свободной энергии ($-\Delta G$, кДж/моль);
- по величине *электродного потенциала* (E^0 , В).

Соединение с положительным потенциалом будет окислять восстановленную форму вещества с более низким потенциалом с изменением стандартной свободной энергии:

$$\Delta G^0 = -nF\Delta E^0 \times 96,49 \text{ кДж/моль},$$

где n — число электронов, передаваемых восстановителем окислителю; F — число Фарадея.

Для измерения *электродного потенциала* нужно, чтобы окислитель сопряженной окислительно-восстановительной пары (А) мог восстанавливаться потоком электронов, "стекающих" с поверхности специального электрода:

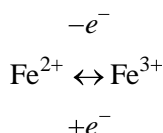


Электрохимический элемент состоит из двух электродов, и полная реакция является суммой двух полуреакций. Это уравнение описывает реакцию, протекающую только на одном электроде. Электродный потенциал данной полуреакции определяется путем измерения электродвижущей силы, создаваемой элементом, в котором одна из полуреакций протекает на *стандартном электроде* с известным

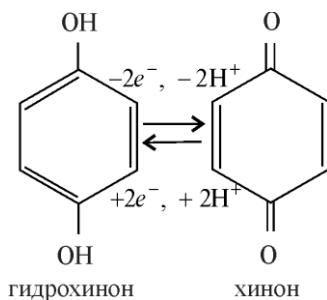
потенциалом. В качестве стандартного электрода применяют водородный электрод, который представляет собой платиновый стержень, заключенный в стеклянную трубку, через которую подается газообразный водород под давлением 1 атм. Потенциал именно этого электрода условно принят за 0.

В клетках различают три типа окислительно-восстановительных реакций, каждая из которых связана с отнятием или присоединением электрона, соответственно, от окисляемого или восстанавливаемого субстрата.

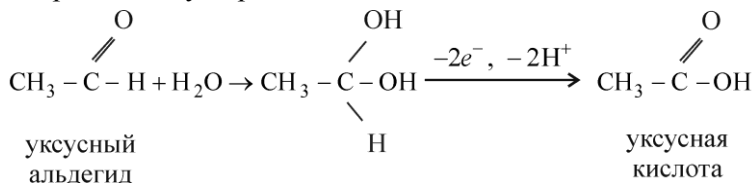
Непосредственная отдача (присоединение) электрона:



Отнятие (присоединение) и электрона, и протона:



Образование промежуточного гидратированного соединения с последующим отнятием двух электронов и двух протонов:



Можно видеть, что в процессе окисления одного вещества (донора электронов) происходит восстановление другого (акцептора электронов). Поэтому ферменты, которые катализируют эти процессы, получили название *оксидоредуктазы*.

Оксидоредуктазы относятся к 1-му классу ферментов и включают несколько подклассов энзимов, в число которых входят анаэробные дегидрогеназы, аэробные дегидрогеназы и оксидазы. *Анаэробные дегидрогеназы* передают электроны и протоны аэробным дегидрогеназам, их коферментом является никотинамидадениндинуклеотид (НАД) или никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ). *Аэробные дегидрогеназы* способны передавать электроны и протоны на кислород и другие акцепторы (например, сукцинатдегидрогеназа), их коферментом является флавиноадениндинуклеотид (ФАД) или флавиномононуклеотид (ФМН). *Оксидазы* передают только электроны и имеют в качестве кофермента атом металла (Fe, Cu, Mo).

В состав НАД(Ф) входят аденозин и амид никотиновой кислоты, которые соединены между собой пирофосфатом (рис. 3.1).

В состав ФАД входит рибофлавин, связанный двумя фосфатными остатками с аденозином (рис. 3.2).

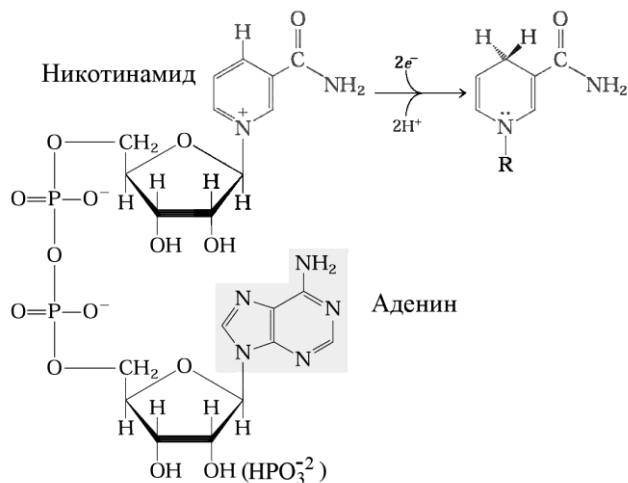


Рис. 3.1. Структура и окислительно-восстановительные превращения НАД(Ф)

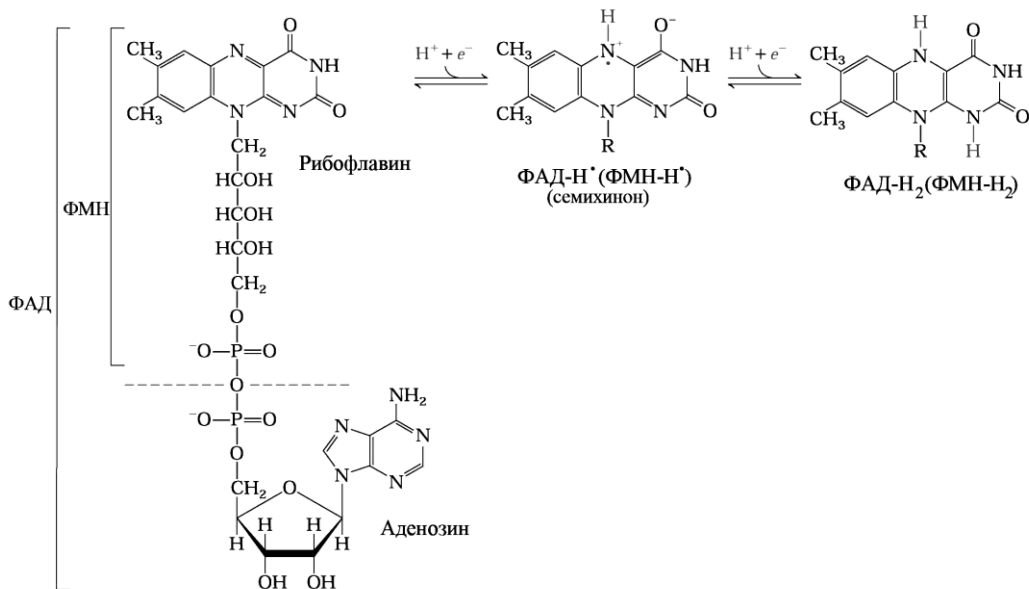


Рис. 3.2. Структура и окислительно-восстановительные превращения ФАД и ФМН

ФМН представляет собой рибофлавинфосфат, или витамин В₂. Три факта объясняют потребность клетки как во флавиновых, так и в пиридиновых коферментах. Во-первых, флавины являются более сильными окислителями, чем НАД⁺. Это позволяет им функционировать в цепи переноса электронов в митохондриях, где требуется последовательность все более и более сильных окислителей, и делает их идеальными окислителями в реакциях дегидрирования. Во-вторых, флавины могут восстанавливаться как в одно-, так и в двухэлектронных процессах (с образованием семихинонов). Это позволяет им участвовать в окислительных реакциях со свободными радикалами и в реакциях с ионами металлов. В-третьих, восстановленные флавины, в отличие от НАДН и НАДФН, доступны быстрому прямому реокислению кислородом. Это позволяет флавинам переносить электроны непосредственно на кислород и участвовать в реакциях гидроксирования.

3.3. Гликолиз

Термин "гликолиз" означает расщепление сахаров или гликогена. Под *гликолизом* понимают процесс распада сахаров, проходящий через образование глюкозо-6-фосфата, фруктозо-1,6-бисфосфата и пировиноградной кислоты. Гликолиз идет как в присутствии кислорода, так и в его отсутствие. Процесс гликолиза является основным путем катаболизма углеводов. Он протекает в цитозоле клеток. Ферменты гликолиза обратимо ассоциированы в мультиэнзимные комплексы с участием актиновых филаментов и локализованы в цитоплазме. Такая организация гликолитических ферментов обеспечивает процессам векторность. Гликолиз представляет собой начальный этап аэробного дыхания и брожения.

Процесс гликолиза был расшифрован немецкими биохимиками Г. Эмбденом (G. Embden) и О. Мейергофом (O. Meyerhof), а также польским биохимиком Я. О. Парнасом (Y. O. Parnas). Г. Эмбден постулировал способ расщепления фруктозо-1,6-дифосфата и предложил общую схему процессов гликолиза. Нобелевский лауреат 1922 г. О. Мейергоф выделил ряд гликолитических ферментов, раскрыл последовательность реакций от 3-фосфоглицериновой кислоты до молочной кислоты. Я. О. Парнас выяснил механизмы фосфорилиза гликогена и превращений углеводов в мышечной ткани. Иногда гликолиз называют путем Эмбдена—Мейергофа—Парнаса.

В последующих исследованиях О. Варбург (O. Warburg) (лауреат Нобелевской премии 1931 г.) выявил механизм окисления 3-фосфоглицеринового альдегида до фосфоглицериновой кислоты и синтеза АТФ, а также структуру НАДН. Помимо этого, вместе с супругами Карлом и Гертти Кори (K. и G. Cori) (Нобелевская премия 1947 г. за исследования метаболизма гликогена) он выделил ферменты, которые расщепляют гликоген до глюкозо-6-фосфата, а крахмал — до глюкозы.

Гликолиз делят на 3 этапа.

1. *Подготовительный этап*, в ходе которого образуется фруктозо-1,6-бисфосфат, расщепляемый на две фосфотриозы: 3-фосфоглицериновый альдегид (3-ФГА) и фосфодиоксиацетон (ФДОА).

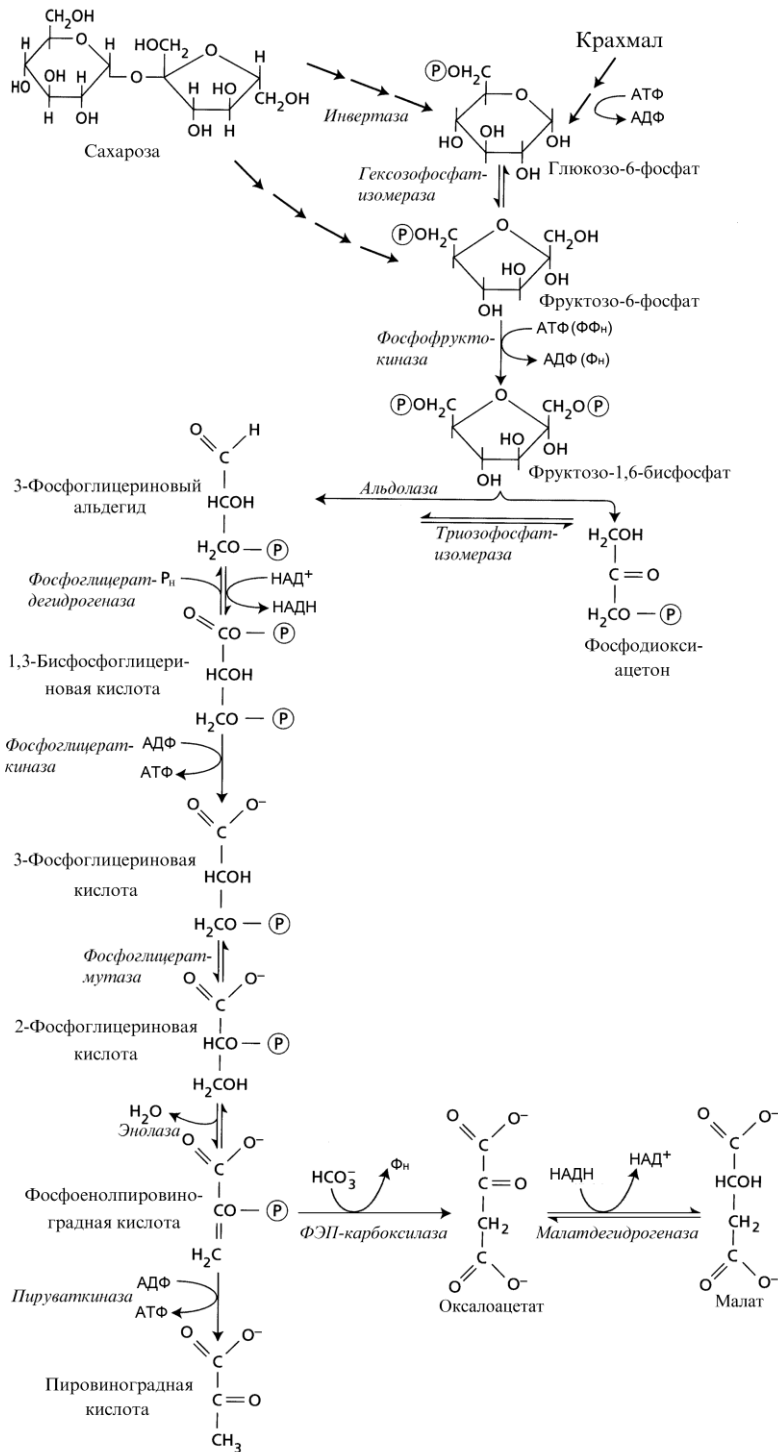
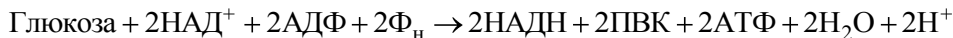


Рис. 3.3. Гликолиз

2. Первое субстратное фосфорилирование. Вначале 3-ФГА окисляется с образованием НАДН и 1,3-бисфосфоглицериновой кислоты (1,3-ФГК). Затем 1,3-ФГК дефосфорилируется с образованием АТФ и 3-ФГК.
3. Второе субстратное фосфорилирование, в котором происходит образование еще одной молекулы АТФ при переносе фосфатной группы с фосфоенолпировиноградной кислоты (ФЕП) на АДФ.

На рис. 3.3 приведена вся последовательность реакций гликолиза. На первом этапе из крахмала или сахарозы образуется фруктозо-1,6-бисфосфат. При этом расходуется 2 молекулы АТФ. Затем фруктозо-1,6-бисфосфат под действием альдолазы расщепляется на две триозы — 3-ФГА и ФДОА. На следующем этапе под действием 3-фосфоглицератдегидрогеназы 3-ФГА окисляется до 3-ФГК. Этот процесс идет через образование фермент-субстратного комплекса (фосфоглицератдегидрогеназа-ФГА), в котором происходит образование НАДН и 1,3-ФГК. На этапе первого субстратного фосфорилирования под действием фосфоглицераткиназы осуществляется перенос фосфатного остатка с 1,3-ФГК на АДФ и образование АТФ.

Образовавшаяся 3-ФГК изомеризуется с образованием 2-ФГК. Последняя дегидратируется под действием энолазы и превращается в макроэргическое соединение — ФЕП. После этого следует этап второго субстратного фосфорилирования, в ходе которого происходит перенос остатка фосфорной кислоты с ФЕП на АДФ, синтез АТФ и образование пировиноградной кислоты (пирувата, ПВК). Суммарное уравнение гликолиза имеет вид:



Энергетика гликолиза. На образование фруктозо-1,6-бисфосфата было затрачено 2 молекулы АТФ. В ходе двух субстратных фосфорилирований в гликолизе синтезируется 4 молекулы АТФ (в расчете на две триозы, образовавшиеся при расщеплении фруктозо-1,6-бисфосфата). То есть суммарный энергетический итог гликолиза составляет всего лишь $4 - 2 = 2$ молекулы АТФ. Необходимо помнить, что в процессе гликолиза также образуются 2 молекулы НАДН, окисление которых в аэробных условиях приведет к синтезу еще 6 молекул АТФ. Поэтому в аэробных условиях суммарный энергетический выход гликолиза составит 8 молекул АТФ. При отсутствии же кислорода энергетический выход гликолиза равен только 2 молекулам АТФ.

Хотелось бы обратить особое внимание, что в растительной клетке гликолиз имеет ряд принципиальных отличий от животных. Во-первых, у растений гликолиз может идти не только в цитоплазме, но также и в хлоропластах. Во-вторых, исходным соединением для гликолиза является сахароза, а не глюкоза, как у животных. В-третьих, фосфорилирование фруктозо-6-фосфата и образование фруктозо-1,6-бисфосфата может идти не только за счет АТФ, но также и за счет пиррофосфата (ФФ_H) и активности пиррофосфат-зависимой фосфофруктокиназы (тем более, что в цитоплазме растительной клетки концентрация пиррофосфата может достигать 0,3 мМ). И, наконец, конечным продуктом гликолиза у растений может быть не только пируват, но также и малат, образование которого идет в цитоплазме

в две стадии (см. рис. 3.3). Вначале происходит карбоксилирование ФЭП и образование оксалоацетата, который затем восстанавливается малатдегидрогеназой до малата. В матриксе митохондрий малат или подвергается с участием малик-энзима окислительному декарбоксилированию до ПВК, или окисляется с помощью малатдегидрогеназы до оксалоацетата, которые поступают в цикл Кребса.

Регуляция гликолиза. Первый участок регуляции гликолиза находится на уровне гексокиназной реакции, продукт которой глюкозо-6-фосфат аллостерически подавляет активность фермента гексокиназы. Второй участок регулирования связан с фосфофруктокиназой, активность которой возрастает при повышении содержания Φ_n , но подавляется высокими концентрациями ФЕП. Регуляторной молекулой у всех эукариот является глюкозо-1,6-бисфосфат, который активизирует гликолиз, но подавляет глюконеогенез.

Дальнейшие превращения образовавшегося в гликолизе пирувата зависят от обеспеченности клеток кислородом. Аэробная фаза дыхания локализована в митохондриях, где пировиноградная кислота окисляется до воды и углекислого газа в дыхательном цикле, получившем название цикла ди- и трикарбоновых кислот, или цикла Кребса. В анаэробных условиях превращения пирувата связаны с различными типами брожения.

3.3.1. Обращение гликолиза и глюконеогенез

Большинство реакций гликолиза легко обратимы, и поэтому из пирувата могут быть синтезированы углеводы. Такой "обращенный" гликолиз называют *глюконеогенезом*. Наиболее активно глюконеогенез идет в прорастающих семенах (см. разд. 3.6). В гликолизе необратимыми являются только три реакции, которые катализируются киназами — гексокиназой, фосфофруктокиназой и пируваткиназой. Поэтому в ходе глюконеогенеза на этих участках работают обходные пути, которые осуществляются с помощью других ферментов.

Процесс глюконеогенеза начинается с того, что пируват поступает в митохондрии, где с помощью пируваткарбоксилазы превращается в оксалоацетат. Затем оксалоацетат при участии НАДН-зависимой малатдегидрогеназы восстанавливается до малата. После этого малат выходит в цитоплазму и окисляется до оксалоацетата. И, наконец, оксалоацетат под действием ФЕП-карбоксикиназы декарбоксилируется с образованием ФЕП. Далее ФЕП за счет обратимых реакций гликолиза легко превращается в фруктозо-1,6-бисфосфат. Обращение необратимых реакций гликолиза, катализируемых фосфофруктокиназой и гексокиназой, осуществляется за счет соответствующих фосфатаз.

3.4. Брожение

В 1929 г. Нобелевская премия по химии "за исследования в области химизма брожения" была присуждена двум биохимикам — А. Гардену из Великобритании (A. Harden) и Г. Эйлер-Хельпину из Швеции (H. von Euler-Chelpin). Им удалось установить, что в процессе *брожения* происходит окисление НАДН, который образу-

ется в ходе гликолиза. Способ окисления НАДН в анаэробных условиях зависит от организма и условий, в которых он находится.

В дрожжах, выращиваемых в анаэробных условиях, брожение осуществляется в процессе, ведущем к образованию этанола. При этом пируват, образующийся в результате гликолиза, декарбоксилируется пируватдекарбоксилазой с образованием уксусного альдегида (рис. 3.4). Затем ацетальдегид восстанавливается до этанола под действием алкогольдегидрогеназы, использующей НАДН в качестве восстановителя. Таким образом, НАДН превращается в НАД^+ , а этанол накапливается как побочный продукт. Общий процесс, от глюкозы до этанола, называется *спиртовым брожением* и лежит в основе промышленного производства спиртных напитков. При спиртовом брожении в незначительном количестве всегда образуются янтарная кислота и так называемые сивушные масла — смесь амилового, изоамилового, бутилового и других спиртов; в ничтожных количествах также накапливаются уксусный альдегид, глицерин и ряд вторичных соединений, от которых зависит специфический аромат вина, пива и других спиртных напитков.

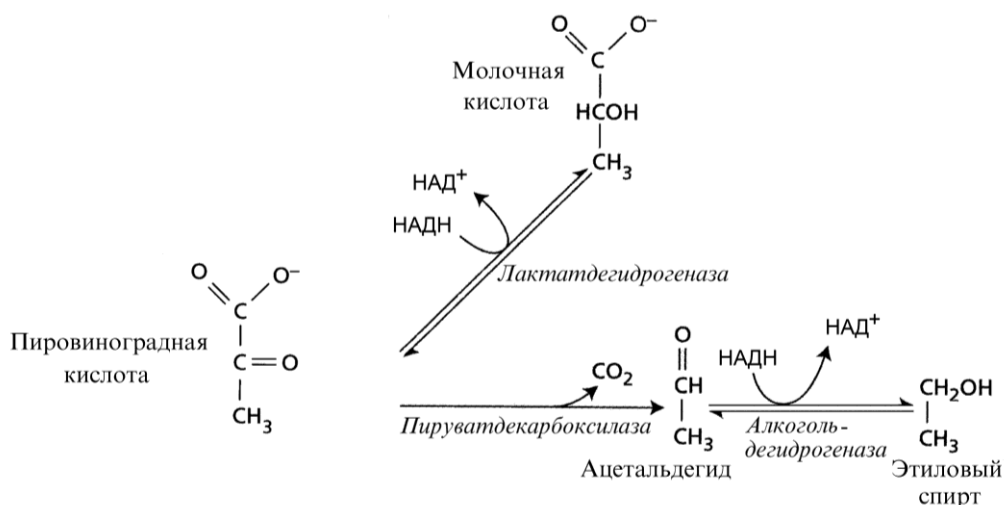


Рис. 3.4. Брожение

Окисление НАДН, образующегося при анаэробном гликолизе в таких животных тканях, как интенсивно работающая мышца, осуществляется путем *молочнокислого брожения*, т. е. восстановления пировиноградной кислоты до L-молочной кислоты (рис. 3.4), под действием фермента лактатдегидрогеназы. Молочнокислое брожение лежит в основе производства большинства молочнокислых продуктов.

Для приготовления ряда пищевых продуктов используют одновременно дрожжи, вызывающие спиртовое брожение, и молочнокислые бактерии, вызывающие молочнокислое брожение. Подобного рода технологии применяются для приготовления заквасок при хлебопечении, при квашении капусты и огурцов, силосовании

кормов, а также для получения таких продуктов, как кефир, хлебный квас, кумыс, айран и мацони.

В растениях брожение редко имеет место, однако если это случается, например, при прорастании семян (когда прочная наружная оболочка препятствует доступу кислорода) или при затоплении корневой системы, то для окисления НАДН используется спиртовое или молочнокислое брожение. Аналогичным образом ведут себя и некоторые зеленые водоросли при анаэробном росте. При анаэробнозе обычно вначале идет молочнокислое брожение и накапливается лактат. При подкислении цитоплазмы активируются ферменты спиртового брожения и синтезируется этанол.

Таким образом, основная функция брожения заключается в окислении НАДН и обеспечении гликолитических процессов окисленной формой (НАД^+) этого кофермента в условиях анаэробноза. Поэтому суммарный энергетический выход гликолиза и брожения составляет всего лишь 2 молекулы АТФ. В аэробных же условиях пируват поступает в цикл ди- и трикарбоновых кислот и окисляется там с образованием CO_2 .

3.5. Цикл ди- и трикарбоновых кислот (цикл Кребса)

Еще в 1910 г. шведский химик Т. Тунберг (Т. Tunberg) показал, что в животных тканях содержатся ферменты, способные отнимать водород от некоторых органических кислот — янтарной, яблочной и лимонной. Венгерский биоэнергетик А. Сент-Дьердьи (А. Szent-Györgyi) в 1935 г. установил, что добавление к измельченной мышечной ткани небольших количеств янтарной, фумаровой, яблочной или щавелевоуксусной кислот резко активизирует поглощение тканями кислорода. Однако Нобелевскую премию, которую ему присудили в 1937 г., он получил не за эти работы, а за открытие аскорбиновой кислоты — витамина С.

Английский биохимик, немец по национальности, Г. Кребс (Н. Krebs) изучал взаимопревращения различных органических кислот и их влияние на клеточное дыхание летательной мышцы голубя. Учитывая данные Т. Тунберга, А. Сент-Дьердьи и собственные, в 1937 г. Г. Кребс предложил свою схему последовательности окисления ди- и трикарбоновых кислот до CO_2 за счет отнятия e^- и H^+ через *цикл лимонной кислоты*. При окислении одной молекулы пирувата в цикле происходит выделение 3-х молекул CO_2 , включение 2-х молекул H_2O и образование 5 восстановленных коферментов соответствующих дегидрогеназ. Через два года в 1939 г. А. Чибнелл (А. Chibnell) доказал, что цикл Кребса функционирует и у растений.

Однако последняя точка в расшифровке цикла Кребса была поставлена только в 1952 г. Ф. Липманом (F. Lipmann), который установил, что веществом, участвующим в образовании лимонной кислоты из щавелевоуксусной, является *ацетил-коэнзим А* (ацетил-СoА). И, поэтому символично, что уже в следующем, 1953 г.

Нобелевские премии по физиологии и медицине были вручены одновременно — Г. Кребсу за цикл ди- и трикарбоновых кислот, а Ф. Липману — за выяснение роли коэнзима А в биоэнергетике клетки.

Окисление ди- и трикарбоновых кислот в цикле Кребса. В аэробных условиях пируват, образовавшийся в результате гликолиза, диффундирует из цитоплазмы в матрикс митохондрий, где функционирует большинство ферментов цикла Кребса, и полностью окисляется до CO_2 с образованием большого количества АТФ. Для транспорта пирувата во внутренней мембране имеется специфический транслокатор, который осуществляет электронейтральный обмен пирувата на OH^- . Непосредственно в цикле Кребса окисляется не сам пируват, а его производное — ацетил-СоА. Поэтому процесс окисления пирувата делится на два этапа:

- окислительное декарбоксилирование пирувата до ацетил-СоА;
- окисление ацетил-СоА в цикле Кребса.

Первый этап катализируется *пируватдегидрогеназным комплексом* (рис. 3.5), который включает три фермента: пируватдегидрогеназу (E_1), дигидролипоилтранс-ацетилазу (E_2) и дигидролипоилдегидрогеназу (E_3).

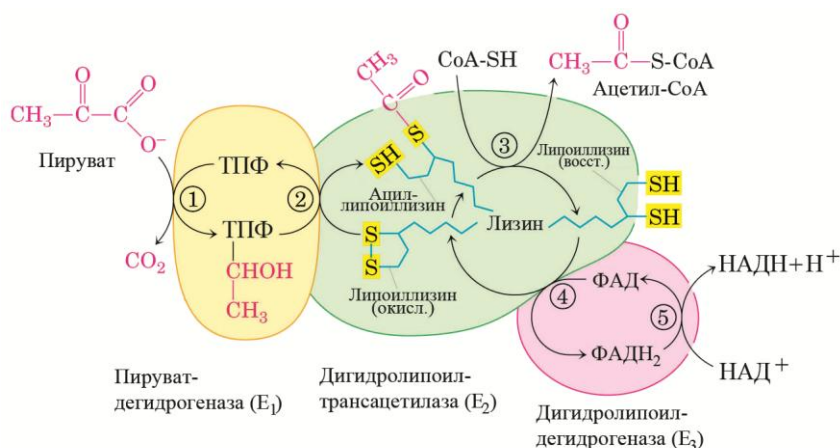


Рис. 3.5. Окислительное декарбоксилирование пирувата до ацетил-СоА пируватдегидрогеназным комплексом. ТПФ — тиаминпирофосфат

Процесс окислительного декарбоксилирования пирувиноградной кислоты идет в пять стадий:

1. Пируват взаимодействует с тиаминпирофосфатом (ТПФ) пируватдегидрогеназы и декарбоксилируется.
2. Пируватдегидрогеназа передает два электрона и ацетильную группу от ТПФ на окисленную форму липоиллизина, являющегося основой фермента. В результате формируется ацетил-тиоэфир восстановленной формы липоиллизина.

- Затем происходит расщепление тиоэфирной связи липоиллизина и взаимодействие ацетата с серосодержащим коэнзимом А (CoA). В итоге образуются полностью восстановленная форма липоиллизина и ацетил-CoA.
- Дигидролипоилдегидрогеназа окисляет дигидролипоил с образованием ФАДН₂.
- При окислении ФАДН₂ ферментом E₃ образуется НАДН.

Таким образом, при окислении пирувата образуются CO₂, НАДН и ацетил-CoA.

На втором этапе в цикле Кребса из ацетил-CoA и щавелевоуксусной кислоты (оксалоацетата) под действием фермента цитратсинтазы образуется шестиуглеродная трикарбоновая кислота — лимонная (цитрат) (рис. 3.6).

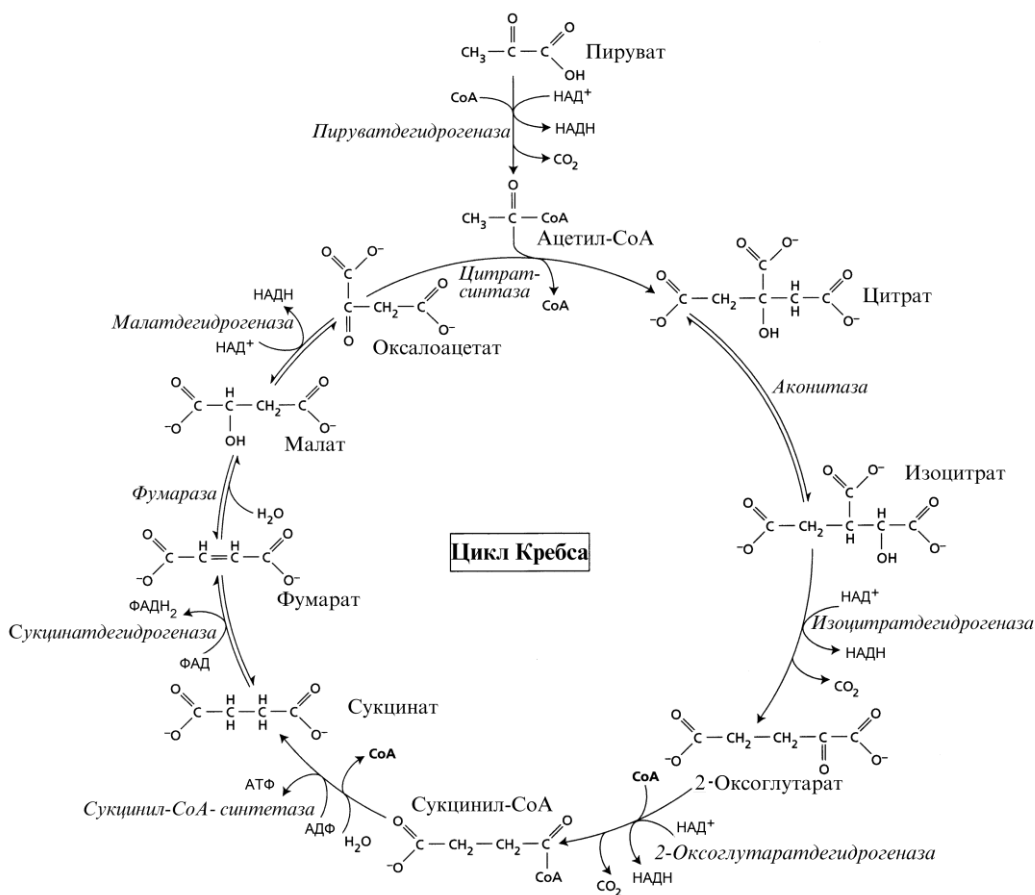


Рис. 3.6. Цикл ди- и трикарбоновых кислот (цикл Кребса)

Затем цитрат изомеризуется в изоцитрат при участии фермента аконитазы. После этого изоцитрат дважды подвергается окислительному декарбосилированию, в результате чего образуются две молекулы НАДН, две молекулы CO₂ и 4-углеродное

соединение — сукцинил-СоА. Следует отметить, что окислительное декарбоксилирование 2-оксоглутаровой кислоты осуществляется 2-оксоглутаратдегидрогеназным мультиферментным комплексом, сходным с пируватдегидрогеназным. Поскольку сукцинил-СоА является высокоэнергетическим тиоэфиром, при его превращении в сукцинат (янтарную кислоту) происходит субстратное фосфорилирование АДФ и синтез АТФ, катализируемое сукцинил-СоА-синтетазой. У животных организмов на этом этапе происходит образование ГТФ.

Далее янтарная кислота окисляется до фумаровой (фумарат) при участии сукцинатдегидрогеназы, коферментом которой является ФАД. Сукцинатдегидрогеназа, мембранно-связанный фермент цикла Кребса, входит в состав комплекса II электрон-транспортной цепи митохондрий. Затем к фумаровой кислоте под действием фумаразы присоединяется вода и образуется яблочная кислота (малат), которая окисляется малатдегидрогеназой до шавелевоуксусной кислоты (оксалоацетат) с образованием НАДН. Оксалоацетат вновь взаимодействует с ацетил-СоА и, таким образом, цикл замыкается.

В результате последовательного окисления пирувата в митохондриях происходит запасание энергии в форме восстановленных коферментов дегидрогеназ — четырех молекул НАДН и одной молекулы ФАДН₂. Помимо этого также синтезируется одна молекула АТФ.

Расчет энергетики цикла Кребса. На каждую молекулу НАДН или НАДФН, окисленную в электрон-транспортной цепи митохондрий, образуются 3 молекулы АТФ. При окислении одной молекулы ФАДН₂ синтезируются 2 молекулы АТФ. Таким образом, после полного окисления в цикле Кребса одной молекулы пирувиноградной кислоты образуются 4 молекулы НАДН (что соответствует 12 АТФ), 1 молекула ФАДН₂ (эквивалентна 2 АТФ) и 1 молекула АТФ, т. е. всего $12 + 2 + 1 = 15$ молекул АТФ. Если же учесть, что при окислении глюкозы в гликолизе образуются две молекулы пирувата, то 15 АТФ необходимо удвоить, что в итоге составит 30 молекул АТФ. Сюда необходимо также добавить 2 молекулы АТФ и 2 молекулы НАДН (соответствующие 6 АТФ), образованные в гликолизе. Поэтому суммарный итог окислительного расщепления глюкозы через гликолиз и цикл Кребса составит $30 + 8 = 38$ молекул АТФ.

Известно, что энергия 3-й сложноэфирной связи в молекуле АТФ составляет 41,87 кДж/моль, что приблизительно соответствует 10 ккал/моль. Поэтому суммарный энергетический выход гликолиза и цикла Кребса будет равен $41,87 \times 38 = 1591$ кДж/моль (или 380 ккал/моль). При полном окислении глюкозы в процессе сжигания ее в калориметре выделяется энергия, равная 2872 кДж/моль (686 ккал/моль). Теперь можно рассчитать эффективность трансформации энергии при окислении глюкозы в энергию макроэргической связи АТФ через гликолиз и цикл Кребса: $380/686 = 0,554$. Таким образом, КПД окисления глюкозы через гликолиз и цикл Кребса достаточно высок — 55,4%.

Регуляция цикла Кребса. В регуляции цикла ди- и трикарбоновых кислот важное значение имеет соотношение между концентрациями НАДН и НАД⁺, а также АТФ

и АДФ. Высокое содержание АТФ и НАДН угнетает активность таких ферментов цикла Кребса, как цитратсинтаза и изоцитратдегидрогеназа. Изоцитратдегидрогеназа активируется цитратом и АДФ. Повышение концентрации оксалоацетата угнетает ферменты, активность которых связана с его синтезом — сукцинатдегидрогеназы и малатдегидрогеназы. Окисление 2-оксоглутаровой кислоты ускоряется аденилатами, а сукцината — АТФ, АДФ и убихинолом. В цикле Кребса имеется и ряд других пунктов регулирования.

Цикл Кребса является конечным этапом окисления не только углеводов, но также и других органических соединений — белков, липидов, некоторых веществ вторичного происхождения (рис. 3.7). Аминокислоты, образовавшиеся при гидролизе белков, через реакции переаминирования превращаются в органические кетокислоты, которые могут окисляться в цикле Кребса. В том случае, когда в качестве дыхательного субстрата используются жиры (это происходит, например, при прорастании семян масличных растений), включается дыхательный путь, называемый гликосилатным циклом.

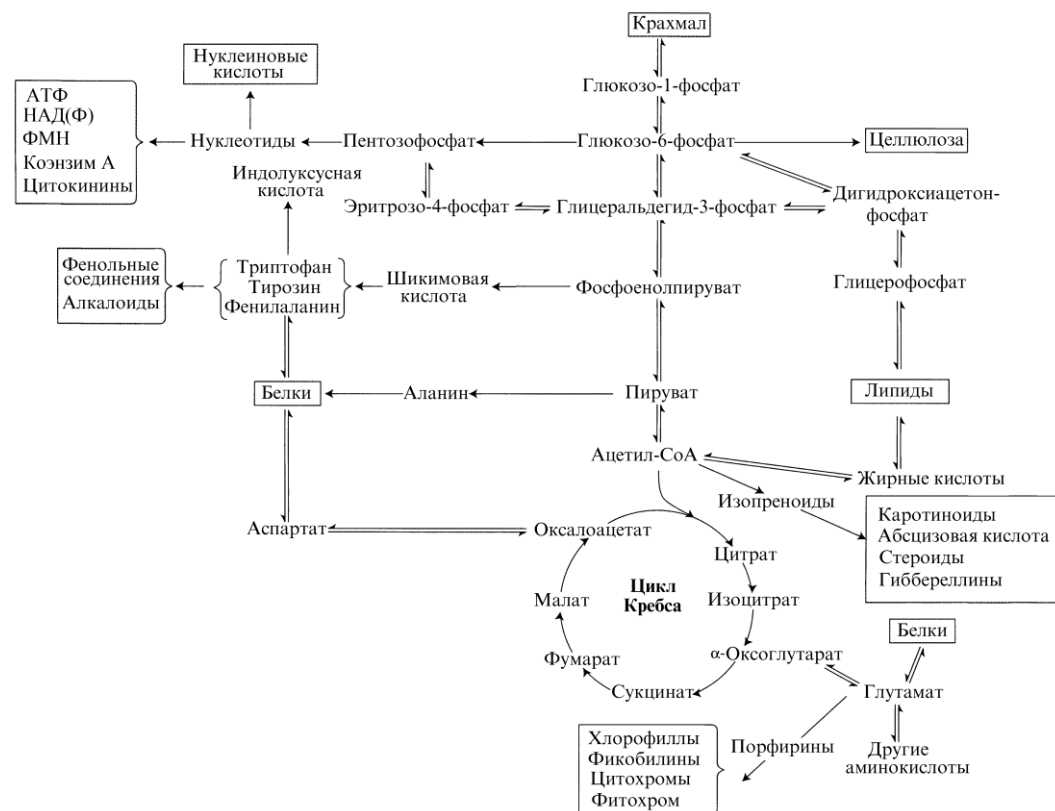


Рис. 3.7. Взаимосвязь промежуточных продуктов гликолиза и цикла Кребса с другими метаболическими путями у высших растений (Taiz, Zeiger, 1998)

Промежуточные продукты гликолиза и цикла Кребса могут включаться во множество метаболических путей, связанных не с энергетикой, а с процессами синтеза широкого спектра органических соединений. Цикл Кребса и гликолиз "поставляют" метаболиты, необходимые для синтеза полисахаридов, белков, липидов, фотосинтетических пигментов, гормонов и многих других соединений.

3.6. Превращение жиров в углеводы.

Глиоксилатный цикл

Процесс превращения жиров в углеводы состоит из трех этапов: окисления жирных кислот, глиоксилатного цикла и глюконеогенеза. В этом процессе участвуют три типа органелл — олеосомы, глиоксисомы и митохондрии. Глиоксилатный цикл впервые был описан в 1957 г. британскими биохимиками Г. Корнбергом (H. L. Kornberg) и Г. Кребсом (H. Krebs) у некоторых бактерий и плесневых грибов. Впоследствии оказалось, что этот цикл активно функционирует в семенах масличных растений и других объектах, где запасные липиды превращаются в сахара. В клетках животных этого цикла не выявлено.

Процесс превращения жиров в углеводы у семян масличных видов растений начинается в *олеосомах* или *жировых телах*, содержащих запасные липиды (обычно это триацилглицеролы). В ходе прорастания семян жиры гидролизуются липазами до жирных кислот и глицерола (рис. 3.8). Глицерол может превращаться в триозофосфат и участвовать в гликолизе. Жирные кислоты поступают в *глиоксисому* (которые находятся с олеосомами в тесном контакте) и окисляются в системе β -окисления. В этом процессе от жирных кислот последовательно отщепляются C_2 -фрагменты с образованием ацетил-СoА. При этом происходит восстановление НАД⁺ и образование пероксида водорода. НАДН поступает в цитоплазму, а H_2O_2 разлагается до воды каталазой.

Глиоксилатный цикл является модификацией цикла Кребса. Три фермента — цитратсинтаза, аконитаза и малатдегидрогеназа — являются общими и для цикла Кребса и для глиоксилатного цикла, а два фермента — *изоцитратлиаза* и *малатсинтаза* — работают только в *глиоксисомах*. Глиоксилатный цикл удобнее разбить на два этапа, в которых последовательно участвуют вначале одна, затем вторая молекулы ацетил-СoА (см. рис. 3.8).

На первом этапе одна из молекул ацетил-СoА при участии цитратсинтазы связывается с оксалоацетатом и образуется лимонная кислота. Затем цитрат с помощью аконитазы превращается в изолимонную кислоту. После этого изоцитрат под действием фермента *изоцитратлиазы* расщепляется на янтарную кислоту и *глиоксилевую (глиоксилат)*. Янтарная кислота выходит в цитоплазму и идет на синтез углеводов. Вначале сукцинат поступает в *митохондрии*, где превращается в фумаровую, а затем в яблочную кислоту. Малат выходит из митохондрий и окисляется малатдегидрогеназой до оксалоацетата. Далее оксалоацетат декарбоксилируется с образованием ФЕП, которая может использоваться на синтез углеводов в процессе *глюконеогенеза* (см. разд. 3.3.1).

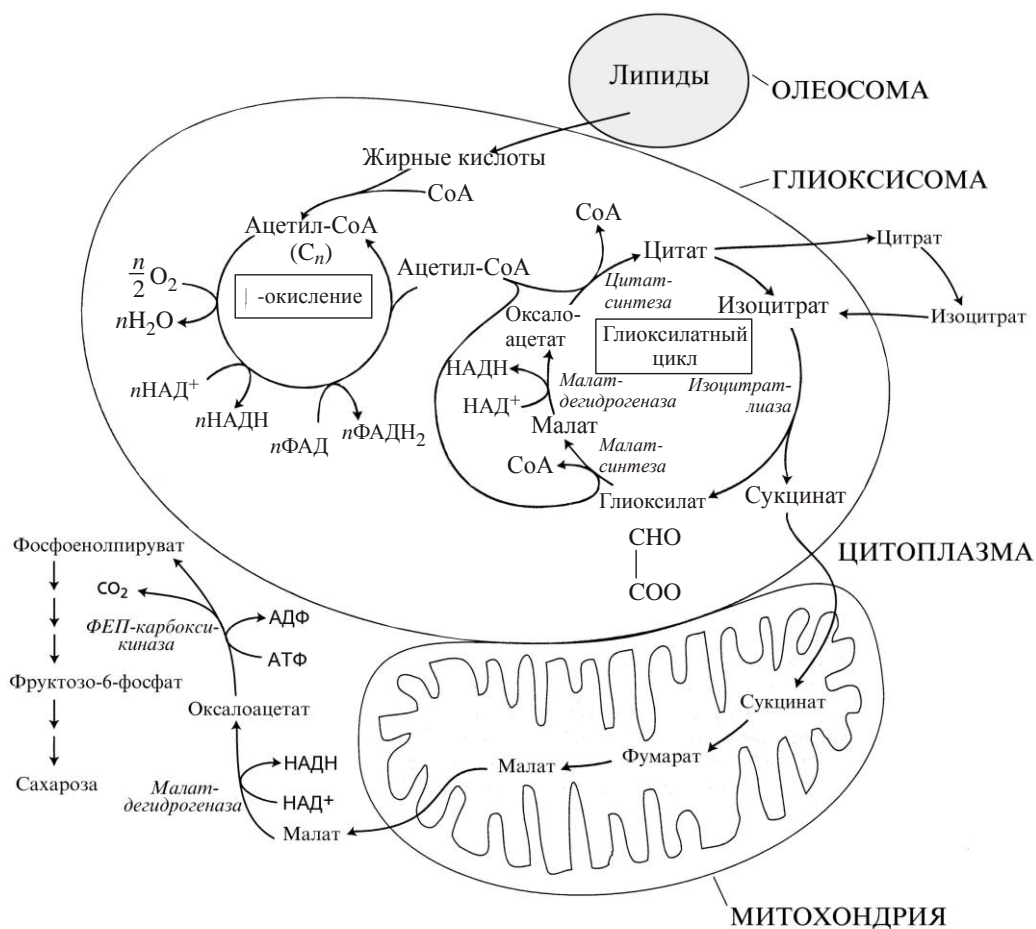


Рис. 3.8. Функционирование глиоксилатного цикла в процессе превращения липидов в сахара при прорастании семян масличных видов растений (Taiz, Zeiger, 1998)

На втором этапе вторая молекула ацетил-СоА при участии малатсинтазы связывается с глиоксилатом. В результате образуется малат, который затем окисляется до оксалоацетата. Взаимодействие оксалоацетата со следующей молекулой ацетил-СоА приводит к синтезу цитрата и глиоксилатный цикл замыкается.

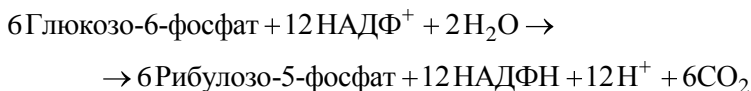
Таким образом, глиоксилатный цикл представляет собой способ превращения ацетил-СоА в органические кислоты, которые затем в глюконеогенезе идут на синтез углеводов. Сукцинат, поступающий в митохондрии из глиоксисом, может окисляться в цикле Кребса и идти на синтез АТФ.

3.7. Пентозофосфатный путь окисления глюкозы

Пентозофосфатный путь окисления глюкозы (апотомическое окисление глюкозы или гексозо-монофосфатный путь) был открыт в 1935—1938 гг. в результате исследований О. Варбурга (O. Warburg), Ф. Диккенса (F. Dickens) и Б. Л. Хореккера (B. L. Horecker). Поэтому его иногда называют *путем Варбурга—Диккенса—Хореккера*. Все реакции этого пути протекают в растворимой части цитоплазмы клетки, а также в пропластидах и хлоропластах. Пентозофосфатный путь окисления глюкозы особенно активен в клетках, в которых идет интенсивный синтез липидов, нуклеиновых кислот, элементов клеточной стенки, фенольных соединений. В ходе этого процесса синтезируется НАДФН.

Пентозофосфатный путь делят на два этапа. На первом, окислительном этапе происходит последовательное окисление глюкозо-6-фосфата с образованием CO_2 , рибулозо-5-фосфата и двух молекул НАДФН. На втором, неокислительном этапе идут процессы, связанные с превращением рибулозо-5-фосфата в исходный субстрат — глюкозо-6-фосфат (рис. 3.9).

Первый окислительный этап пентозофосфатного пути начинается с окисления глюкозо-6-фосфата до 6-фосфоглюконо- δ -лактона с образованием НАДФН. Фосфоглюконо- δ -лактон — соединение нестабильное и быстро превращается либо спонтанно, либо с помощью 6-глюконолактонгидратазы в 6-фосфоглюконовую кислоту. Затем идет процесс окислительного декарбоксилирования 6-фосфоглюконовой кислоты, в ходе которого образуется рибулозо-5-фосфат, CO_2 и НАДФН (см. рис. 3.9). Этот процесс можно описать следующим образом:



В ходе *неокислительного этапа* пентозофосфатного пути происходит регенерация фруктозо-6-фосфата из пентоз. Этот циклический процесс удобнее понять, если принять, что в регенерации участвует шесть пентоз. Регенерация начинается с того, что происходит эимеризация или изомеризация рибулозо-5-фосфата, соответственно, в ксилулозо-5-фосфат или в рибозо-5-фосфат (см. рис. 3.9).

Вначале рассмотрим превращение первых трех пентоз. Транскетолаза расщепляет связь С—С между кетогруппой и соседним атомом углерода в молекуле ксилулозо-5-фосфата (1-й пентозы), в результате чего образуется 3-фосфоглицериновый альдегид (3-ФГА) и двухуглеродный фрагмент, который переносится на альдегидную группу рибозо-5-фосфата (2-й пентозы) с образованием седогептулозо-7-фосфата. Затем трансальдолаза переносит трехуглеродный фрагмент от седогептулозо-7-фосфата на 3-ФГА, образуя фруктозо-6-фосфат и эритрозо-4-фосфат. В следующей реакции, катализируемой транскетолазой, происходит перенос двухуглеродного фрагмента от ксилулозо-5-фосфата (3-й пентозы) на эритрозо-4-фосфат. Продуктами этой реакции являются фруктозо-6-фосфат и 3-ФГА.

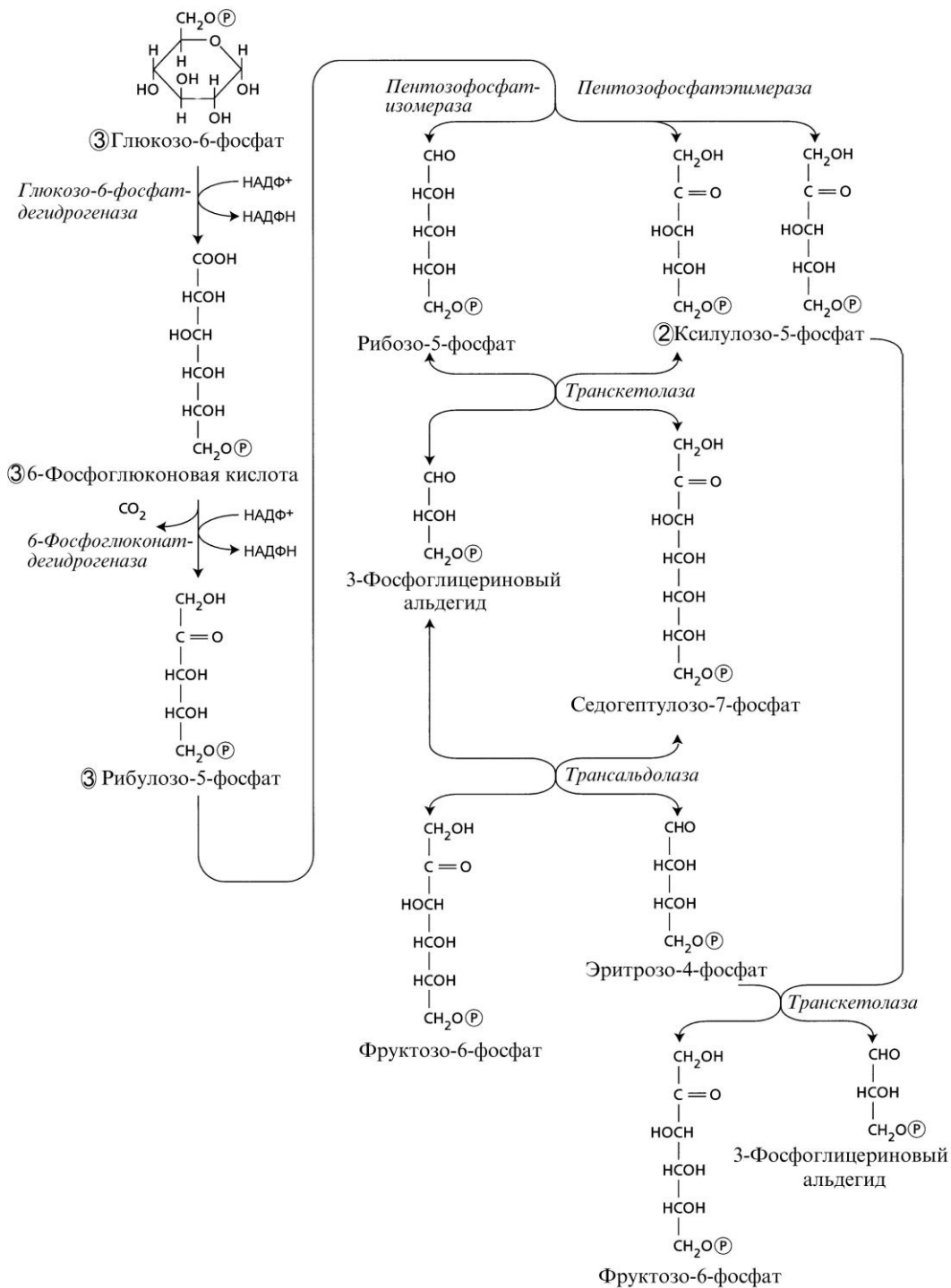
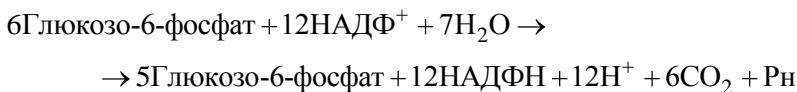


Рис. 3.9. Пентозофосфатный путь окисления глюкозы

В результате превращений трех пентоз образуются две гексозы (два фруктозо-6-фосфата) и одна триоза — 3-ФГА. Если в цикл вступают еще три пентозы, то образуются еще два фруктозо-6-фосфата и один 3-ФГА. Образовавшийся 3-ФГА может изомеризоваться в фосфодиоксиацетон (ФДОА). В результате альдольной конденсации ФГА и ФДОА образуется пятая молекула фруктозо-6-фосфата.

Таким образом, 6 молекул глюкозо-6-фосфата, вступая в пентозофосфатный путь, образуют 6 молекул рибулозо-5-фосфата и 6 молекул CO_2 , после чего из 6 молекул рибулозо-5-фосфата регенерируют 5 молекул глюкозо-6-фосфата. Однако это не означает, что молекула глюкозо-6-фосфата, вступающая в цикл, окисляется полностью. Все шесть молекул CO_2 образуются из первого углеродного атома каждой из шести молекул глюкозо-6-фосфата. Суммарное уравнение пентозофосфатного пути выглядит следующим образом:



Энергетика пентозофосфатного пути окисления глюкозы. В процессе полного окисления молекулы глюкозы образуется 12 молекул НАДФН, которые при окислении в электрон-транспортной цепи могли бы дать $12 \times 3 = 36$ молекул АТФ. Однако основная роль этого пути не связана с синтезом АТФ. Его физиологическая роль заключается в поддержании пластического, а не энергетического обмена.

Выделяют пять функций пентозофосфатного пути окисления глюкозы.

- Синтез НАДФН, который используется как восстановитель при биосинтезах жирных кислот, липидов, вторичных соединений, органических кислот, а также для восстановления NO_3^- и SO_4^{2-} .
- Синтез пентоз, которые идут на синтез нуклеиновых кислот и таких нуклеотидов, как АТФ, ГТФ, НАД(Ф)⁺, ФАД, коэнзим А.
- Пентозофосфатный путь окисления глюкозы поставляет углеводы с различным числом углеродных атомов (от C_3 до C_7), которые являются основой для синтеза широкого спектра органических соединений.
- Пентозофосфатный путь окисления глюкозы представляет собой обращенный цикл Кальвина, поэтому его компоненты могут участвовать и в фиксации CO_2 . Только две из 15 реакций цикла Кальвина специфичны для фотосинтеза, остальные же могут участвовать в апотомическом окислении глюкозы. В хлоропластах окислительный пентозофосфатный путь функционирует в темноте, предотвращая резкое изменение концентрации НАДФН в отсутствие света.
- Нередко окисление глюкозы по пентозофосфатному пути может на одном из этапов переходить на гликолитический путь. Образующиеся при этом в хлоропластах триозофосфаты, поступая в гликолиз и цикл Кребса, могут использоваться на синтез АТФ.

Процесс расщепления глюкозы в пентозофосфатном (апотомическом) пути является самым коротким способом ее окисления и включает всего 12 реакций. Процесс окисления глюкозы по гликолитическому (дихотомическому) пути, включающий гликолиз и цикл Кребса, занимает более 30 реакций.

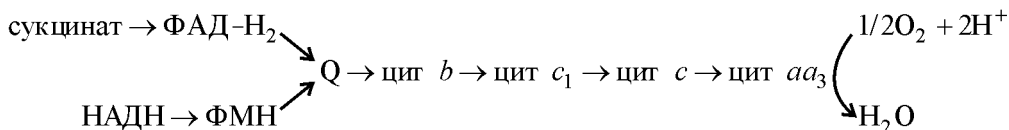
Регуляция пентозофосфатного пути окисления глюкозы. Его скорость регулируется, прежде всего, концентрацией НАДФ⁺, поскольку для проявления активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и дегидрогеназы 6-фосфоглюконовой кислоты требуется постоянный приток окисленной формы этого нуклеотида.

3.8. Синтез АТФ в процессе окислительного фосфорилирования

Цикл Кребса и пентозофосфатный путь окисления глюкозы функционируют только в условиях достаточного количества кислорода, хотя непосредственно в этих процессах O₂ не участвует. Кислород необходим для окисления в электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий восстановленных коферментов — НАДН и ФАДН₂, при этом синтезируется АТФ. Электрон-транспортная цепь локализована на внутренней мембране митохондрий и служит для переноса электронов от восстановленных субстратов на O₂. Основная ЭТЦ имеет сходное строение у эукариотических организмов (животных, растений, грибов). Процесс переноса электронов (т. е. окисление субстратов) сопровождается созданием на внутренней мембране митохондрий электрохимического градиента протонов (Δμ_{H⁺}), энергия которого трансформируется в энергию макроэргической связи АТФ.

3.8.1. Строение электрон-транспортной цепи митохондрий

Б. Чанс (B. Chance, 1959), используя величины окислительно-восстановительных потенциалов переносчиков электрона и ингибиторный анализ, расположил их в следующем порядке:



Позже, в 1961 г. Д. Грин (D. E. Green) пришел к выводу, что переносчики электрона сгруппированы в митохондриальной мембране в четыре мембранных комплекса (рис. 3.10).

Комплекс I, или НАДН-дегидрогеназа (НАДН: убихинон оксидоредуктаза), состоит из гидрофобного компонента, встроенного в мембрану, и гидрофильной части (рис. 3.11).

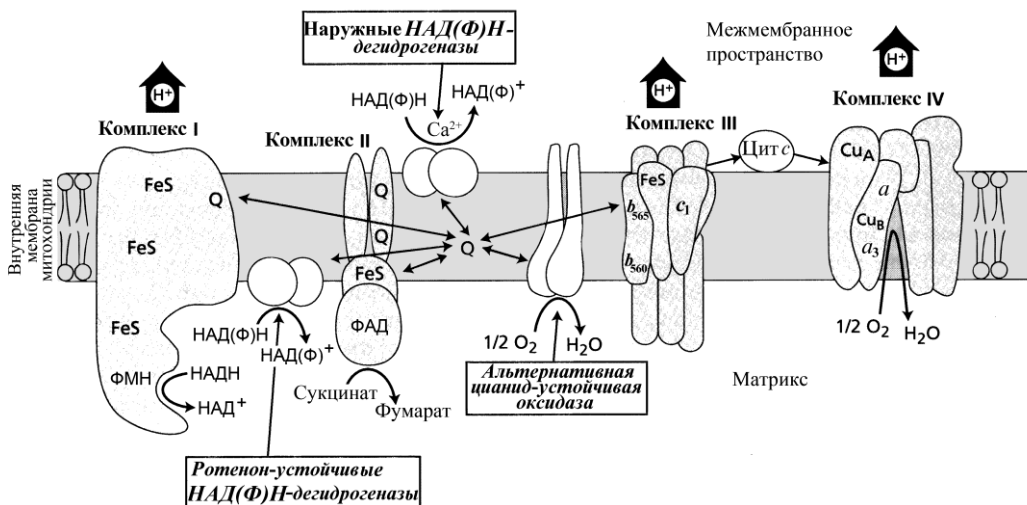


Рис. 3.10. Строение электрон-транспортной цепи митохондрий растительных клеток (Siedlow, Umbach, 1995): FeS — железосерные кластеры; Q — убихинон, b_{560} , b_{565} , c_1 ; и Цит c — цитохромы; Cu_A и Cu_B — белковые домены, содержащие атомы меди; a и a₃ — гемы. Стрелками показан транспорт протонов комплексами I, III и IV

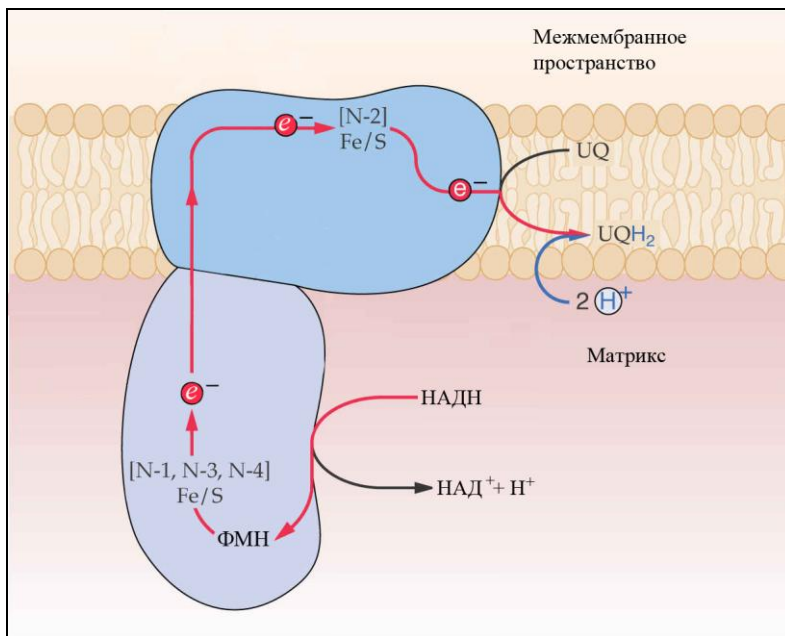


Рис. 3.11. Схематическое строение комплекса I (НАДН: убихинон оксидоредуктазы): N-1, N-2, N-3, N-4 — белки, содержащие железосерные кластеры; UQ — убихинон (Buchanan, Gruissem, Jones, 2000)

Электронно-микроскопические снимки показали, что комплекс имеет форму, похожую на башмак, который своей "подоймой" встроен в мембрану. Этот крупный комплекс с молекулярной массой 600—900 кДа включает до 40 белковых субъединиц. В качестве редокс-центра функционируют ФМН и несколько белков (N-1, N-2, N-3, N-4), содержащих железосерные кластеры. В составе белков N-1 имеются Fe_2S_2 -кластеры, а в белках N-2 и N-3 содержатся Fe_4S_4 -кластеры. В гидрофобной части комплекса имеется сайт (сайты) для связывания убихинона.

Комплекс II, или сукцинат-дегидрогеназа (сукцинат-коэнзим Q редуктаза), состоит из 4-х крупных полипептидов (рис. 3.12) — двух гидрофильных, проявляющих сукцинат-дегидрогеназную активность (A, B), и двух трансмембранных гидрофобных (C, D). Редокс-центрами комплекса являются ФАД и три железосерных кластера — S-1 ($\text{Fe}_2\text{-S}_2$), S-2 ($\text{Fe}_4\text{-S}_4$) и S-3 ($\text{Fe}_3\text{-S}_4$). В комплексе II также имеется цитохром b_{560} . Сукцинат-дегидрогеназа — единственный фермент цикла Кребса, встроенный в мембрану митохондрий.

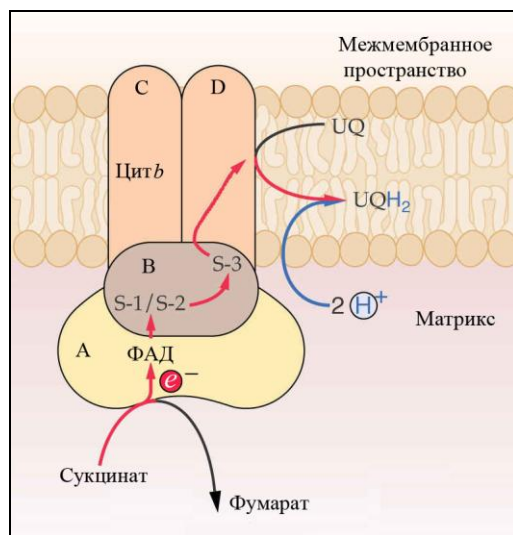


Рис. 3.12. Схематическое строение комплекса II (сукцинат-дегидрогеназы): S-1, S-2 и S-3 — железосерные кластеры; UQ — убихинон (Buchanan, Gruissem, Jones, 2000)

Комплекс III, или убихинол-цитохром *c* оксидоредуктаза (цитохром b_6/c_1 комплекс), состоит (рис. 3.13) из цитохрома *b*, цитохрома c_1 (цитохром c_{551}), железосерного белка Риске (Fe_2S_2). Цитохром *b* содержит два гема (b_{565} и b_{560}) — низкопотенциальный (b_L , $-0,04$ В) и высокопотенциальный (b_H , $+0,04$ В). Комплекс III функционирует как димер. В структуре комплекса III имеются два участка для связывания восстановленной и окисленной форм убихинона. Первый специфически блокируется миксотиазолом, а второй — антимицином А (рис. 3.13).

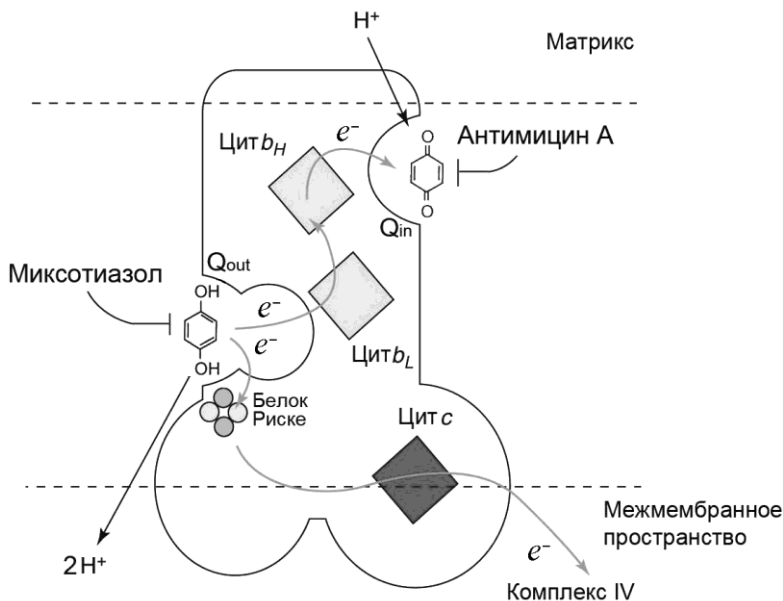


Рис. 3.13. Схематическое строение комплекса III (цитохром b_6/c_1 комплекса) (Cape et al., 2006)

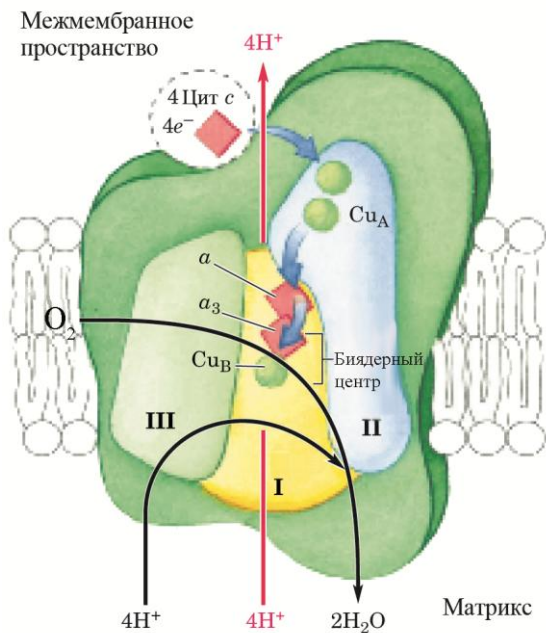


Рис. 3.14. Схематическое строение комплекса IV (цитохром c оксидазы) (Nelson, Cox, 2004):
 I, II и III — белковые субъединицы; Цит c — цитохром c ; a и a_3 — гемы;
 Cu_A и Cu_B — белковые домены, содержащие атомы меди

Комплекс IV, или цитохром *c* оксидаза, включает до 13 субъединиц, три из которых (I—III) кодируются геномом митохондрий. В комплексе имеется 4 редокс-центра (рис. 3.14): два гема *a* (a и a_3) и два Cu-центра (Cu_A и Cu_B). Центр Cu_A , содержащий два атома меди, расположен на субъединице II. Субъединица I содержит гем *a* и так называемый *биядерный центр* (гем a_3 -Cu_B), в котором происходит восстановление кислорода. Комплекс IV функционирует как димер.

Четыре комплекса ЭТЦ не связаны между собой в некий суперкомплекс, а активно диффундируют в липидном слое внутренней мембраны митохондрий. Единственным белком ЭТЦ, который не интегрирован в мембрану, является цитохром *c*. Этот небольшой (12,5 кДа) водорастворимый белок (цитохром c^{550}) переносит электроны в межмембранном пространстве от комплекса III к комплексу IV. В митохондриальной мембране также имеется пул убихинонов, которые свободно диффундируют и функционируют как переносчики электронов и протонов.

ЭТЦ митохондрий растений, в отличие от животных, включает альтернативную цианид-устойчивую терминальную оксидазу, локализованную во внутренней мембране, альтернативные ротенон-устойчивые НАДН- и НАДФН-дегидрогеназы во внутренней мембране со стороны матрикса митохондрий, а также НАДН- и НАДФН-дегидрогеназы на стороне внутренней мембраны, обращенной в межмембранное пространство, которые способны принимать электроны от НАД(Ф)Н, образующихся в цитозоле (рис. 3.10).

3.8.2. Транспорт электронов во внутренней мембране митохондрий

Отдельные белки-переносчики электронов расположены во внутренней мембране митохондрий не беспорядочно, а собраны, как уже было сказано, в 4 белковых комплексах. Транспорт электронов идет от одного комплекса к другому. Перенос электронов в дыхательной цепи от НАДН ($E^{0'} = -0,32$ В) на кислород ($E^{0'} = +0,82$ В) идет по градиенту окислительно-восстановительного потенциала — от соединений с более отрицательным $E^{0'}$ к акцепторам, имеющим более положительный $E^{0'}$. Освобождаемая при этом энергия окисления переходит в энергию электрохимического градиента ионов водорода ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$).

В комплексе I электроны от НАДН поступают на ФМН, далее на Fe-S-центры и, наконец, на убихинон (см. рис. 3.11). Принимая два электрона (от Fe-S-белка) и два протона (из матрикса), убихинон (Q) восстанавливается до убихинола (QH_2). При этом комплекс I работает, как протонная помпа: на каждый окисленный НАДН и восстановленный QH_2 из матрикса в межмембранное пространство перекачиваются протоны в соотношении $4\text{H}^+/2e^-$. Ингибиторами комплекса I являются ротенон, амитал, капсаицин, пиерицидин А.

После окисления сукцината в комплексе II электроны передаются на ФАД, затем на Fe-S-кластеры и далее на восстановление убихинона с использованием 2H^+ из матрикса (см. рис. 3.12). Комплекс II не перекачивает протоны, но обеспечивает вход в дыхательную цепь дополнительных электронов за счет окисления сукцината. Специфическим ингибитором комплекса II является структурный аналог сукцината — малонат.

Q-цикл. Отличительной особенностью *комплекса III* является то, что одновременно с переносом электронов через внутреннюю мембрану митохондрий с помощью хинонов транспортируются протоны. Хиноны свободно диффундируют в липидной фазе мембран, что позволяет им не только переносить электроны между мембранными комплексами, но также выполнять функции протонофоров — трансмембранных переносчиков ионов H^+ . Механизм транспорта электронов и протонов в комплексе цитохромов b_6/c_1 был постулирован еще в 1976 г. П. Митчелом, в дальнейшем он получил название *Q-цикла*.

В структуре комплекса III имеются два отдельных участка (Q_{out} и Q_{in}), предназначенных для связывания восстановленной (QH_2) и окисленной (Q) форм убихинона (см. рис. 3.13). Центр Q_{out} находится между $\text{Fe}_2\text{-S}_2$ -кластером и гемом b_L вблизи внешней (out) стороны мембраны. Центр Q_{in} расположен вблизи внутренней (in) стороны мембраны, контактирующей с матриксом митохондрии. Механизм транспорта электронов в комплексе III удобнее представить как двухэтапный процесс, в ходе которого происходит последовательное окисление вначале одной, а затем второй молекул убихинола (QH_2).

Вначале (рис. 3.13 и 3.15, а) происходит связывание (в Q_{out} -центре) и окисление *первой молекулы* убихинола с образованием семихинона ($\text{QH}_2 \rightarrow \text{Q}^\bullet + e^- + 2\text{H}^+$). При этом происходит восстановление белка Риске, от которого электрон затем передается на цитохром c_1 и далее на водорастворимый цитохром c . Протоны же, образующиеся при окислении убихинола, переносятся в межмембранное пространство. Поскольку образующийся при этом в Q_{out} -центре семихинон крайне нестабилен, он быстро отдает электрон на гем b_L и далее на гем b_H . При этом электрон пересекает мембрану и восстанавливает связанный в Q_{in} -центре убихинон (Q) до семихинона (Q^\bullet). Следует особо отметить, что в Q_{in} -центре семихинон находится в более стабильном состоянии.

Аналогичным путем происходит окисление *второй молекулы* убихинола (рис. 3.15, б). Один из двух электронов, образующийся при окислении QH_2 , через железосерные кластеры белка Риске вначале идет на цитохром c_1 , а затем на цитохром c . Второй электрон через гемы b_L и b_H поступает в Q_{in} -центр и восстанавливает семихинон (Q^\bullet) до убихинола (QH_2), захватывая при этом 2H^+ из матрикса ($\text{Q}^\bullet + e^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{QH}_2$). Убихинол покидает Q_{in} -центр и может вновь связываться и окисляться в Q_{out} -центре. В итоге, на каждые 2 электрона, передаваемые ком-

плексом цитохромов b_6/c_1 на цитохром c , через внутреннюю мембрану митохондрий переносится 4 протона. То есть стехиометрию этого процесса можно представить как $2e^-/4H^+$. От комплекса III через цитохром c электроны поступают в комплекс IV и далее на кислород.

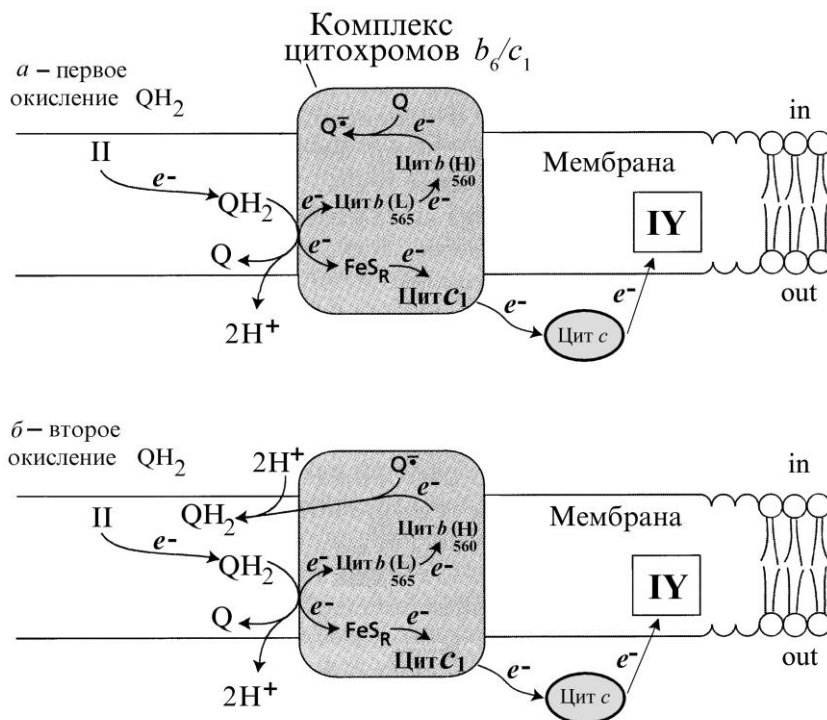
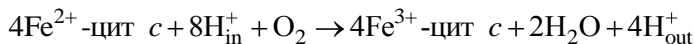


Рис. 3.15. Окисление восстановленного убихинола (QH_2) в комплексе цитохромов b_6c_1 (Taiz, Zeiger, 1998): Цит — цитохромы; FeS_R — белок Риске; II — сукцинатдегидрогеназа; IV — цитохром c оксидаза

Транспорт электронов в комплексе III подавляется при высоком мембранном потенциале митохондрий, а также специфическими ингибиторами (см. рис. 3.13). *Стигмателлин* и *миксотиазол*, связываясь с Q_{out} -центром, подавляют поток электронов от QH_2 на белок Риске. *Антимицин А* связывается с Q_{in} -центром и блокирует передачу электронов от гема b_L на Q . С комплекса III электроны могут поступать на кислород, что будет приводить к образованию супероксид-радикала (Q^{\bullet}) и окислительному стрессу.

Комплекс IV осуществляет последовательное окисление 4-х молекул цитохрома c (цит c), передачу 4-х электронов на молекулярный кислород (см. рис. 3.14) и восстановление его до 2-х молекул воды:



В ходе этого процесса цитохром *c* связывается с субъединицей II комплекса IV и передает электроны на Cu_A -центр, расположенный у поверхности мембраны. От Cu_A -центра электроны поступают на гем *a* и далее на биядерный центр (гем a_3 - Cu_B), находящийся в толще митохондриальной мембраны. В биядерном центре осуществляется последовательное присоединение 4-х электронов к молекуле O_2 с образованием 2-х молекул воды. В процессе восстановления (помимо биядерного центра) может принимать участие аминокислота тирозин (Y-288) субъединицы I.

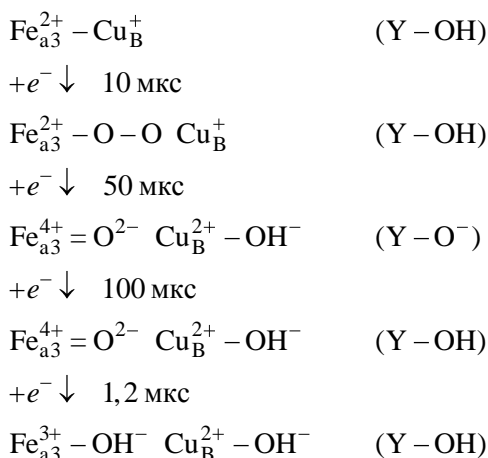


Рис. 3.16. Взаимодействие между цитохромоксидазой и кислородом у пурпурной бактерии *Rhodobacter sphaeroides* (Namslauer, Brzezinski, 2004):

Cu_A и Cu_B — белковые домены; содержащие атомы меди; *a* и a_3 — гемы;

Y — аминокислота тирозин, входящая в состав редокс-центра

На рис. 3.16 показано взаимодействие между цитохромоксидазой и кислородом у пурпурной бактерии *Rhodobacter sphaeroides*. Можно видеть, как в процессе восстановления O_2 до H_2O происходит последовательный перенос 4-х электронов (от биядерного центра к кислороду) и изменение редокс-состояния биядерного центра — от полностью восстановленного (Fe^{2+} - Cu^+) до окисленного (Fe^{3+} - Cu^{2+}). Транспорт электронов в комплексе IV также сопряжен с генерацией на внутренней мембране митохондрий градиента ионов водорода ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$). Классическими ингибиторами комплекса IV являются цианид, CO и азид.

Четыре митохондриальных комплекса организованы в мембране очень упорядоченно, что обеспечивает специфичность и векторность процессам окисления. НАДН и сукцинат окисляются в матриксе, там же, где и восстанавливается O_2 . Цитохром *c* функционирует в межмембранном пространстве. В комплексе III железосерные центры белка Риске, цитохром c_1 и низкопотенциальный гем цитохрома *b* (b_L) расположены ближе к внешней поверхности мембраны, в то время как высокопотенциальный гем цитохрома *b* (b_H) локализован ближе к матриксу.

Следует особо отметить, что три мембранных комплекса (I, III и IV) функционируют как протонные помпы, которые за счет энергии окисления дыхательных субстратов перекачивают протоны из матрикса в межмембранное пространство. Таким образом, в ЭТЦ происходит превращение энергии химической (окисляемых субстратов) в энергию электрическую ($\Delta\mu_{H^+}$). В дальнейшем энергия $\Delta\mu_{H^+}$ используется для синтеза АТФ в процессе окислительного фосфорилирования.

3.8.3. Окислительное фосфорилирование

Впервые идею о том, что процесс дыхания сопряжен с фосфорилированием АДФ и образованием АТФ, высказал В. А. Энгельгардт. Еще в 1931 г. ему удалось показать, что при аэробном дыхании накапливается АТФ. В 1937—1939 гг. биохимики В. А. Белицер в России и Г. Калькар (H. M. Kalckar) в США установили, что при окислении промежуточных продуктов цикла Кребса (янтарной и лимонной кислот) суспензиями клеток животных тканей исчезает неорганический фосфат и синтезируется АТФ. В анаэробных условиях (или при подавлении дыхания цианидом) такого фосфорилирования не происходило. Процесс фосфорилирования АДФ с образованием АТФ, сопряженный с переносом электронов по электрон-транспортной цепи митохондрий, называется *окислительным фосфорилированием*. Для объяснения механизма синтеза АТФ вначале были предложены три гипотезы — химическая, механохимическая и хемиосмотическая.

Согласно *химической гипотезе* в митохондриях за счет энергии окисления на первом этапе с помощью соединения X формируется некий фосфорилированный интермедиат $X \sim P$. На втором этапе происходит перенос фосфатной группы с фосфорилированного интермедиата на АДФ и образование АТФ. Однако вещество X в митохондриях не удалось найти.

Механохимический механизм синтеза предполагает, что при окислении субстратов происходят конформационные изменения митохондрий, которые и обеспечивают энергию для синтеза АТФ. Основой механохимической гипотезы, предложенной в 1965 г. американским биохимиком П. Бойером (P. Boyer), послужило свойство митохондрий изменять свой объем в зависимости от энергетического состояния. Однако гипотеза П. Бойера не давала ответа на вопрос: почему при работе электрон-транспортной цепи митохондрий происходит подкисление среды? Объяснение этому факту было получено работами английского биохимика П. Митчелла (P. Mitchell, 1961—1966 гг.), который предложил *хемиосмотический механизм* синтеза АТФ.

П. Митчелл ввел понятие *сопрягающей мембраны*, непроницаемой для ионов H^+ . Он полагал, что в таких мембранах происходит сопряжение процессов окисления, трансмембранного транспорта протонов и синтеза АТФ. Он также постулировал, что элементы электрон-транспортной цепи митохондрий расположены в мембране таким образом, что переносчики электронов и протонов чередуются с переносчи-

ками только электронов. Согласно *хемиосмотической гипотезе* предложенной Митчеллом, движение электронов по электрон-транспортной цепи сопровождается транспортом ионов H^+ из матрикса в межмембранное пространство митохондрий. В результате на внутренней мембране митохондрий формируется электрохимический градиент протонов, который и является непосредственным источником энергии для синтеза АТФ. Синтез АТФ осуществляется в процессе транспорта ионов H^+ по градиенту концентрации через протонный канал фермента АТФ-синтазы.

Вскоре предположения Митчелла получили экспериментальное подтверждение. Во-первых, было обнаружено, что некоторые вещества (так называемые разобщители, к которым относится, например 2,4-динитрофенол) подавляют синтез АТФ, но стимулируют поглощение кислорода. Митчелл объяснил эффект разобщителей тем, что они разряжают мембрану, т. е. являются протонофорами, т. е. переносчиками ионов H^+ . Результатом "протонного" шунтирования митохондриальной мембраны является разобщение процессов окисления субстратов в дыхательной цепи и фосфорилирования АДФ. Большинство разобщителей являются хорошо растворимыми в липидах слабыми кислотами, которые в зависимости от рН среды легко присоединяют или отдают H^+ . И, во-вторых, самому Митчеллу удалось в условиях искусственно созданного градиента протонов на митохондриальной мембране зарегистрировать возрастание скорости синтеза АТФ (при подкислении внешней среды).

Окончательное экспериментальное подтверждение теории Митчелла было сделано американским биоэнергетиком Э. Рэкером (E. Racker, 1973). Ему удалось получить мембранные везикулы (липосомы) из сои и встроить в них бактериородопсин из галофильной археи *Halobacterium halobium*, а также АТФ-синтазу митохондрий сердца быка. *Бактериородопсин* обладает способностью за счет энергии света функционировать как трансмембранный протонный насос, обеспечивая создание электрохимического градиента ионов H^+ . В экспериментах Рэкера при освещении гибридных везикул, содержащих бактериородопсин и АТФ-синтазу, регистрировались не только генерация мембранного градиента протонов, но и синтез АТФ.

Таким образом, энергия окисления дыхательных субстратов в процессе переноса электронов и протонов по электрон-транспортной цепи митохондрий вначале трансформируется в энергию электрохимического потенциала ионов H^+ ($\Delta\mu_{H^+}$, или протон-движущую силу) на внутренней мембране митохондрий и только затем преобразуется в энергию макроэргической связи АТФ. В 1978 г. П. Митчеллу за разработку хемиосмотической теории окислительного фосфорилирования была присвоена Нобелевская премия по химии.

При этом возникает другой вопрос: каков же механизм трансформации энергии мембранного градиента рН в макроэргическую энергию фосфатной связи АТФ? Было предложено несколько принципов синтеза АТФ, из которых наибольший

интерес представляют два — *прямой* механизм Митчелла и *обменно-связывающий* механизм Бойера.

Согласно Митчеллу синтез АТФ идет следующим образом. В начале АДФ и Φ_{H} связываются с комплексом F_1 фермента АТФ-синтазы. Далее протоны, перемещаясь по протонному каналу, взаимодействуют с одним из атомов кислорода фосфорной кислоты, который выводится из комплекса в виде воды: $2\text{H}^+ + \text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{O}$. После этого АДФ через атом кислорода соединяется с фосфатом, образуя АТФ. На заключительном этапе происходит отделение синтезированной молекулы АТФ от ферментативного комплекса.

Механизм "связывание—обмен" Бойера предполагает, что на первом этапе происходит присоединение АДФ и Φ_{H} к активному центру фермента и синтез АТФ без притока энергии. На втором этапе ионы H^+ , перемещаясь по протонному каналу (рис. 3.17) АТФ-синтазного комплекса, вызывают *конформационные изменения* в каталитическом центре, в результате чего происходит высвобождение АТФ.

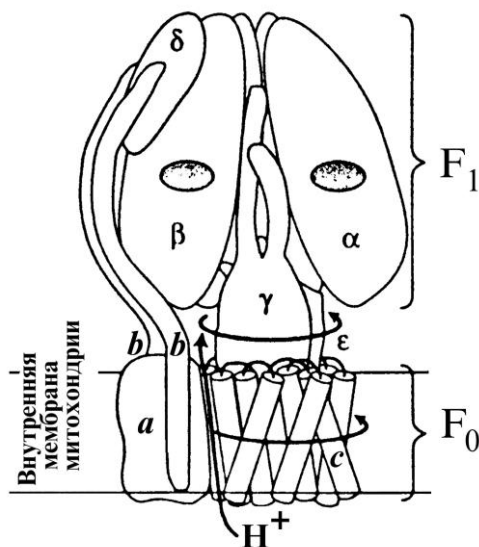


Рис. 3.17. Модель функционирования АТФ-синтазы (Junge et al., 1997).

Показаны принцип крепления каталитического комплекса к мембране с помощью *a*-, *b*- и δ -субъединиц, транспорт ионов H^+ по протонному каналу и направление вращения γ -, ϵ - и *c*-субъединиц

Дальнейшие исследования, связанные с анализом кинетики процесса синтеза АТФ и особенно с изучением кристаллической структуры F_1 -комплекса АТФ-синтазы, привели к выводу, что синтез АТФ идет согласно обменно-связывающему механизму, предложенному Бойером (Boyer, 1989, 1993, 1997).

3.8.4. Механизм работы АТФ-синтазного комплекса митохондрий

Синтез АТФ катализируется *a* (АТФ-синт зой), расположенной во внутренней мембране митохондрий. АТФ-синт за состоит из интегрального мембранного домена F_0 и каталитического домена — F_1 , находящегося вне мембраны, в матриксе.

Субъединичный состав домена F_1 очень консервативен и включает пять различных белков — три β -субъединицы, три α -субъединицы и по одной γ -, δ - и ϵ -субъединице (см. рис. 3.17). В состав F_0 -комплекса входит одна *a*-субъединица, две *b*-субъединицы и "кольцо" из 9—12 *c*-субъединиц. Это "с-кольцо" жестко связано с γ -субъединицей через ϵ -субъединицу. (см. приложение 2. АТФ-синтаза) Активность F_0 -компонента АТФ-синтазы подавляет антибиотик олигомицин.

Обменно-связывающий механизм синтеза АТФ П. Бойера включает три принципиальных элемента:

- основным этапом, требующим энергии, является не синтез АТФ из АДФ и F_n , а процесс отделения АТФ от фермента;
- в АТФ-синтазном комплексе связывание субстратов и высвобождение продуктов реакции происходит в трех отдельных каталитических участках фермента. При этом каждый каталитический участок может существовать только в одном из трех конформационных состояний (рис. 3.18);
- поток ионов H^+ через протонный канал F_0 по градиенту электрохимического потенциала вызывает вращение γ -субъединицы АТФ-синтазного комплекса, что приводит к конформационным изменениям в каталитических участках, которые позволяют АТФ высвободиться от фермента.

Два первых постулата Бойера получили много подтверждений, основанных главным образом на анализе кинетики процесса. Утверждение же о вращательном механизме процесса сопряжения между потоком H^+ и синтезом АТФ доказать было сложнее. Это удалось сделать группе английских исследователей в лаборатории Дж. Уокера в Кембридже (Abrahams, Leslie, Lutter, Walker, 1994). Им удалось провести высокоразрешающий кристаллографический анализ структуры F_1 -комплекса АТФ-синтазы митохондрий быка. Было выявлено, что в каталитический комплекс входят три β - и три α -субъединицы, которые расположены чередуясь подобно долькам апельсина (рис. 3.18).

Три β -субъединицы отличаются друг от друга и конформационно, и по связанным с ними нуклеотидам, что подтверждает наличие механизма синтеза АТФ по принципу "связывание—обмен". При этом γ -субъединица как стержень вставлена внутрь каталитического комплекса (см. рис. 3.17). Между α - и β -субъединицами обнаружены высокогидрофобные взаимодействия, что обеспечивает возможность вращения γ -субъединицы внутри полости, образуемой в каталитическом центре фермента.

Другими словами, γ -субъединица выглядит как молекулярный подшипник, который "смазывается" (при вращении) за счет гидрофобных взаимодействий, существующих в каталитическом центре фермента.

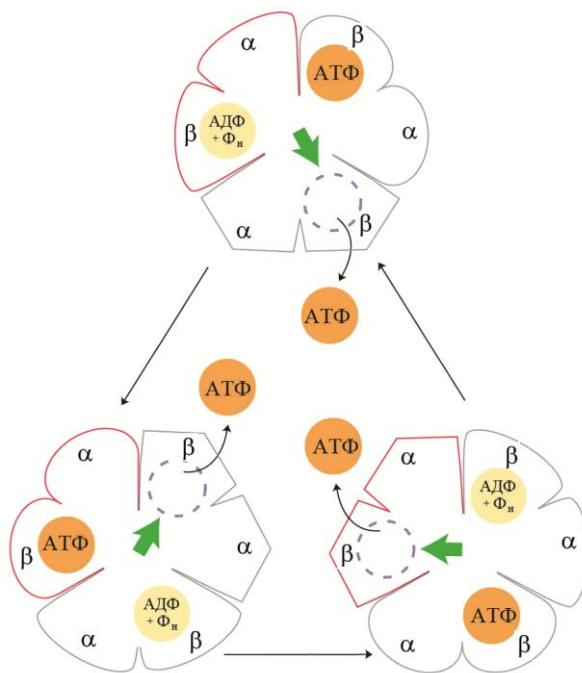


Рис. 3.18. Обменно-связывающий механизм синтеза АТФ (Nelson, Cox, 2004). Показано, что связывание и высвобождение продуктов реакции происходит в трех отдельных каталитических участках фермента

После анализа кристаллической структуры F_1 -комплекса АТФ-синтазы были сняты практически все вопросы, касающиеся механизма синтеза АТФ. Однако окончательное доказательство вращения γ -субъединицы в каталитическом центре фермента можно было бы получить, если бы его удалось зарегистрировать визуально. Такой эксперимент удалось провести в лабораториях М. Ешида (Masasuke Yoshida) и К. Киносита (Kazuhiko Kinosita) (Noji, Yasuda, Yoshida, Kinosita, 1997). Они метили флуоресцентным зондом актиновый филамент и "пришивали" его белком авидином к γ -субъединице (или к одной из c -субъединиц F_0 -комплекса). Затем комплекс F_1 был прикреплен к специально обработанной стеклянной поверхности, по которой невозможно скольжение (рис. 3.19). Исследователи предположили, что если γ -субъединица действительно способна вращаться под действием АТФ, то будет вращаться комплекс из c -субъединиц и прикрепленный к нему актиновый филамент. Поскольку размеры филамента составляли около 1 мкм, его вращение должно быть видно во флуоресцентный микроскоп.

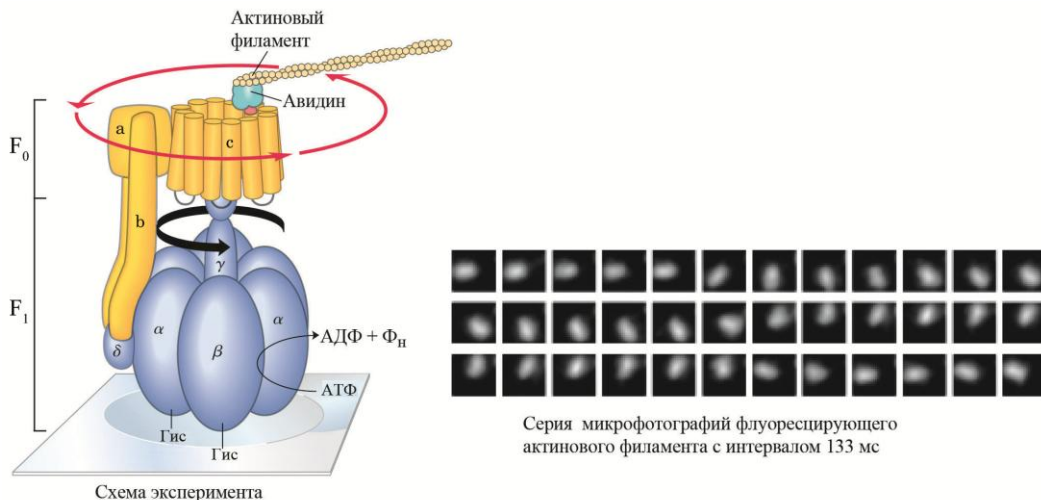


Рис. 3.19. Экспериментальное подтверждение вращения γ -субъединицы в F_1 -комплексе АТФ-синтазы (Noji, Yasuda, Yoshida, Kinosita, 1997): F_0 — интегральный мембранный домен и F_1 — каталитический домен АТФ-синтазы; α , β , γ , δ , a , b , c — субъединицы АТФ-синтазы; Гис — гистидин

Результаты эксперимента оказались потрясающими. Как только к модифицированному комплексу F_1 была добавлена АТФ (рис. 3.19), актиновый филамент начинал вращаться по кругу со средней скоростью 4 оборота в секунду. Поскольку размеры актинового филамента значительно превышали размеры ферментативного комплекса, реальная скорость вращения γ -субъединицы гораздо выше (до 100 оборотов в секунду). Демонстрация вращательного движения γ -субъединицы позволила окончательно решить вопрос о механизме синтеза АТФ в АТФ-синтазном комплексе. За свой вклад в установление механизма синтеза АТФ П. Бойер и Д. Уокер в 1997 г. получили Нобелевскую премию по химии.

Таким образом, в процессе синтеза АТФ каждая из трех β -субъединиц каталитического центра последовательно оказывается в трех состояниях:

- свободна от нуклеотидов;
- связывает АДФ и Φ_H ;
- синтезирует АТФ.

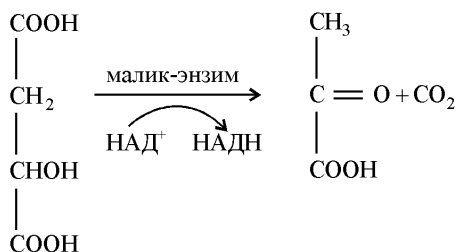
Синтез АТФ идет в три этапа. Вначале происходит присоединение АДФ и Φ_H к активному центру фермента (в первой β -субъединице). На втором этапе (во второй β -субъединице) идет синтез АТФ без затраты энергии. На третьем этапе ионы H^+ , перемещаясь по градиенту $\Delta\mu_{H^+}$, вызывают вращение c -субъединичного кольца и жестко связанной с ним γ -субъединицы. Вращение γ -субъединицы внутри F_1 -комплекса вызывает конформационные изменения в каталитическом центре, приводящие к высвобождению АТФ и возврату АТФ-синтазного комплекса в ис-

ходное состояние. Считается, что третье состояние β -субъединиц (т. е. свободное от нуклеотидов) наступает при удалении из каталитического центра воды, чтобы с процессом синтеза АТФ не конкурировала бы обратная реакция — гидролиза. Предполагается, что за один оборот γ -субъединицы по F_0 -каналу проходит 12 протонов, при этом в каталитическом центре F_1 синтезируется 3 молекулы АТФ.

Следует отметить, что сам каталитический комплекс (3β - и 3α -субъединицы) не вращается и крепится к мембране с помощью a -, b -, и δ -субъединиц. Поэтому в терминах электротехники F_1 -комплекс и его мембранный "якорь" (субъединицы a и b) можно сравнить со статором, а "с-субъединичный комплекс" и вращающуюся вместе с ним γ -субъединицу — с ротором. Размеры этого миниатюрного моторчика составляют около 20 нм.

3.9. Особенности клеточного дыхания растений

У растительных митохондрий помимо цитохромоксидазы имеется *альтернативная терминальная оксидаза*, способная передавать электроны от убихинона прямо на кислород (см. рис. 3.10). Вторым отличием митохондрий растений являются два пути окисления НАДН, образующегося в матриксе: через комплекс I, угнетаемый ротеноном, и через ротенон-нечувствительные НАД(Ф)Н-дегидрогеназы. В-третьих, в растительных клетках возможно Ca^{2+} -зависимое окисление цитоплазматического пула НАДН и НАДФН в электрон-транспортной цепи митохондрий через НАДН- и НАДФН-зависимые дегидрогеназы, функционирующие в межмембранном пространстве (см. рис. 3.10). И, наконец, характерной особенностью митохондрий растительных клеток (в отличие от животных) является наличие малик-энзима, который катализирует в матриксе окислительное декарбосилирование малата в пируват:



Пируват далее окисляется в цикле Кребса, а НАДН — в электрон-транспортной цепи.

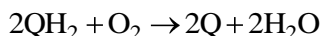
3.10. Цианид-устойчивое дыхание растений

Завершающий этап почти всех окислительных процессов заключается в переносе электронов от окисляемого субстрата на кислород. Этот процесс катализируется дыхательными ферментами, которые называют *терминальными оксидазами*. У растительных клеток к таким ферментам относятся не только цитохромоксидаза,

но и *альтернативная оксидаза*, локализованная на внутренней мембране митохондрий (см. рис. 3.10). Терминальные оксидазы являются главным компонентом акцепторного участка дыхательной электрон-транспортной цепи, от которых зависит общая эффективность дыхания.

Если к животным тканям добавить 1 мМ раствор цианида, дыхание практически полностью остановится, поскольку будет подавлена работа цитохром *c* оксидазы — терминальной оксидазы, передающей электроны на кислород. Однако у большинства растительных клеток при этом поглощение кислорода не прекратится, а только замедлится (в среднем от 10 до 25%). У некоторых растительных тканей уровень цианид-устойчивого дыхания (поглощения O_2) может достигать 90%.

Такая особенность дыхания растений объясняется тем, что на внутренней мембране растительных митохондрий функционирует *альтернативная цианид-устойчивая оксидаза* (*убихинол-кислород-оксидоредуктаза*), которая обеспечивает передачу электронов от убихинола на кислород с образованием H_2O :



Этот процесс специфически угнетается рядом соединений, к которым относится, например, *салицилгидроксамовая кислота*.

Когда электроны от убихинола попадают на кислород, то пропускаются два участка электрон-транспортной цепи (комплексы III и IV), на которых была бы возможна генерация энергии (вначале в виде протонного градиента, а затем и АТФ). Поэтому в ходе цианид-устойчивого дыхания происходит выделение энергии в виде тепла.

Альтернативная оксидаза представляет собой интегральный мембранный белок, составленный из двух идентичных субъединиц, молекулярная масса каждой из которых от 35,5 до 37 кДа. Регулирование активности этого фермента осуществляется путем образования (димерная форма) или расщепления (мономерная форма) дисульфидного мостика между мономерами. Сродство альтернативной цианид-устойчивой оксидазы к кислороду несколько ниже, чем у цитохромоксидазы.

У многих цветков перед образованием пыльцы наблюдается быстрое повышение активности этого фермента. Это приводит к резкому возрастанию температуры внутри цветка, которая, например у *Sauromatum guttatum*, достигает 25 °С. Одновременно активизируется синтез салициловой кислоты, а также ряда аминов и индольных соединений, которые служат аттрактантами для насекомых-опылителей. Такие условия могут поддерживаться до 7 ч. Повышение температуры характерно для соцветий и цветков других видов ароидных (*Araceae*) — *Arum maculatum*, *Symplocarpus foetidus*.

Однако у большинства растений уровень цианид-устойчивого дыхания невелик. Поэтому вопрос о его роли для растений пока еще не решен. Считается, что альтернативная цианид-устойчивая оксидаза активизируется при стрессовых воздействиях, которые повреждают работу основной электрон-транспортной цепи митохондрий.

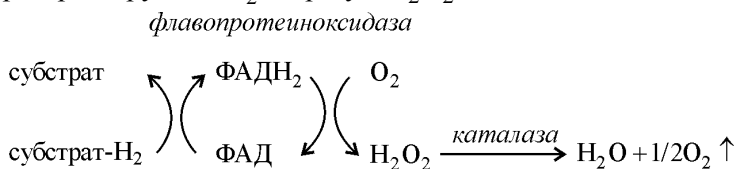
3.11. Немитохондриальные электрон-транспортные цепи растительной клетки

У растений, как и у других организмов, имеются системы окисления восстановленных пиридин- и флавиноклеотидов не только с помощью терминальных оксидаз митохондрий, но и в редокс-цепях эндоплазматического ретикулаума и плазмалеммы. В процессах окисления, катализируемых *немитохондриальными оксидазами*, не происходит образования АТФ.

К таким оксидазам относятся, например, Cu-содержащие ферменты, — полифенолоксидаза и аскорбатоксидаза. Голубые медь-содержащие оксидазы способны восстанавливать оба атома молекулярного кислорода до H_2O , чем напоминают цитохромоксидазу, которая также содержит медь. Однако они не содержат железа. Для окисления аскорбиновой кислоты в дегидроаскорбиновую в растительных клетках имеется специальная *аскорбатоксидазная система*, способная осуществлять такое превращение. Функционирование этой системы обеспечивает окисление НАД(Ф)Н, аскорбиновой кислоты и восстановленной формы глутатиона. *Полифенолоксидаза* окисляет фенольные соединения (моно-, ди- и трифенолы) с образованием соответствующих хинонов. Этот процесс сопряжен с окислением НАДН (или аскорбиновой кислоты).

Именно активностью полифенолоксидазы объясняется потемнение поверхностей разрезанного яблока или картофельного клубня, поскольку при ранениях растительных тканей этот фермент превращает фенолы в токсичные для патогенов хиноны, что препятствует распространению инфекции. Полифенолоксидаза участвует в окислении полифенолов и дубильных веществ, происходящем при скручивании и завяливании чайного листа, ее действием объясняется также потемнение плодов при сушке. Активность полифенолоксидазы возрастает в период старения тканей.

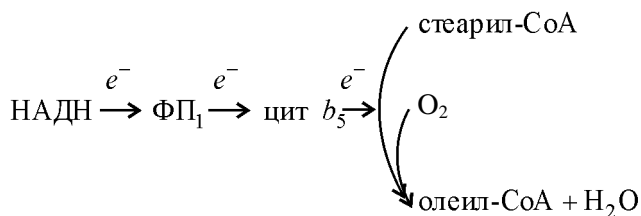
Свойство аутооксидабельности, т. е. прямого окисления кислородом, присуще лишь немногим органическим соединениям. Быстрому прямому окислению молекулярным O_2 доступны восстановленные флавины. "Самоокисляемость" позволяет флавинам некоторых ферментов переносить электроны непосредственно к O_2 , а также создает основу для функционирования флавинов в реакциях гидроксилирования. В цитоплазме растительных клеток функционируют *флавопротеиновые оксидазы*, которые реагируют с O_2 , образуя H_2O_2 :



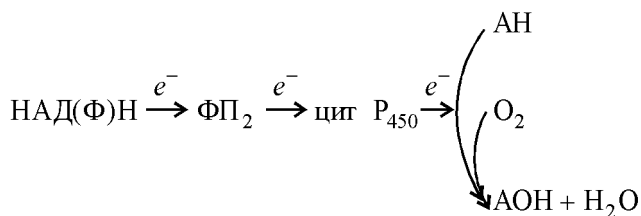
Терминальные оксидазы растений (цитохромоксидаза, альтернативная оксидаза, аскорбатоксидаза, полифенолоксидаза, флавопротеиноксидаза) различаются по чувствительности к парциальному давлению кислорода и температуре. Цитохро-

моксидаза обладает высоким сродством к O_2 и поэтому активно функционирует при низком парциальном давлении кислорода. Однако ее активность сильно меняется при колебаниях температуры. Флавопротеиноксидазы меньше зависят от температуры, но имеют более низкое сродство к O_2 . Полифенолоксидаза и аскорбатоксидаза занимают по этим характеристикам промежуточное положение.

В мембранах эндоплазматического ретикулама растительных клеток найдены электрон-транспортные цепи, которые, используя восстановители (НАДН или НАДФН) и цитохром b_5 , осуществляют *реакцию десатурации* — образования ненасыщенных жирных кислот из насыщенных:



В другой редокс-цепи цитохром P_{450} , используя кислород, осуществляет *реакцию гидроксирования* различных органических соединений:



Процесс гидроксирования необходим для синтеза некоторых соединений, детоксикации ряда вредных метаболитов, которые при этом теряют свою активность, и, наконец, для превращения нерастворимых в воде веществ в растворимые.

В плазматической мембране есть редокс-цепь, которая окисляет НАДФН и передает электроны через цитохром b_{559} на молекулу кислорода, превращая его в супероксид-радикал. Эта НАДФН-оксидаза играет защитную роль в реакции сверхчувствительности при повреждении растительных клеток патогенами (см. главу 14).

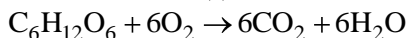
3.12. Зависимость дыхания от содержания кислорода и АДФ

Системы клеточного дыхания формировались в условиях низкого парциального давления кислорода, вероятно, поэтому при понижении содержания кислорода от 21 до 5% интенсивность дыхания у большинства растительных организмов существенно не снижается. Тем не менее наиболее значимым фактором среды, влияющим на дыхание, является *содержание кислорода*. Различные виды растений существенно отличаются по способности адаптироваться к дефициту кислорода.

Величина парциального давления кислорода имеет принципиальное значение в регулировании потока дыхательных субстратов, поступающих из гликолиза в цикл Кребса и далее на окислительное фосфорилирование. На это впервые обратил внимание Л. Пастер во время своих известных исследований роли брожения в производстве вина. Он обнаружил, что в присутствии O_2 снижается скорость гликолитического распада глюкозы и интенсивность брожения. При этом активируется использование сахаров на синтетические процессы и рост биомассы дрожжей. Это явление получило название *эффекта Пастера*. В дальнейшем было показано, что эффект Пастера наблюдается также в животных и растительных тканях, где кислород тормозит анаэробный гликолиз.

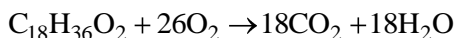
Эффект Пастера объясняется тем, что при высоком парциальном давлении кислорода весь пул АДФ и Φ_n расходуется на синтез АТФ в ходе окислительного фосфорилирования. В результате происходит торможение гликолиза по двум причинам. Во-первых, резко снижается количество АДФ и неорганического фосфата, необходимых для субстратного фосфорилирования. Во-вторых, повышение содержания АТФ в клетках угнетает некоторые гликолитические ферменты, в частности фосфофруктокиназу. В итоге снижается интенсивность гликолиза, а глюконеогенез и синтетические процессы, связанные с расходом углеводов, активируются.

Количество кислорода, необходимое для дыхания, зависит от его содержания в молекулах окисляемых субстратов. Отношение количества молекул CO_2 , выделяемого при дыхании, к количеству поглощенных молекул кислорода называют *дыхательным коэффициентом* (ДК). При окислении гексоз дыхательный коэффициент равен единице:



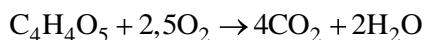
$$ДК = 6CO_2 / 6O_2 = 1$$

Если окисляются субстраты, в молекуле которых мало кислорода, дыхательный коэффициент меньше единицы. Например, ДК при окислении стеариновой кислоты равен 0,7:



$$ДК = 18CO_2 / 26O_2 = 0,7$$

При использовании более окисленных субстратов, чем углеводы, например оксалоацетата, дыхательный коэффициент больше единицы:



$$ДК = 4CO_2 / 2,5O_2 = 1,6$$

Поэтому величина дыхательного коэффициента может служить косвенной характеристикой типов органических субстратов, используемых при дыхании.

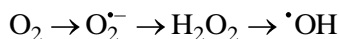
Вторым важным фактором, определяющим интенсивность дыхания клетки, является *концентрация АДФ*. Зависимость скорости потребления O_2 от концентрации АДФ называют *дыхательным контролем*. Содержание Φ_n в клетках обычно не является лимитирующим фактором, поэтому добавление к изолированным

митохондриям АДФ быстро доводит скорость поглощения O_2 до максимальной (и это длится до тех пор, пока весь АДФ не превратится в АТФ). Таким образом, соотношение АДФ/АТФ прямо влияет на скорость переноса электронов в цепи на кислород, генерацию градиента $\Delta\mu_{H^+}$ и работу АТФ-синтазы.

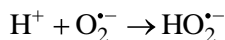
3.13. Активные формы кислорода

Участие молекулярного кислорода в процессах дыхания стало возможным не только потому, что он является хорошим окислителем, но также благодаря тому, что молекула O_2 относительно стабильна и спонтанно не реагирует с биологическими соединениями. Однако в ходе окислительно-восстановительных процессов, которые постоянно идут с участием кислорода, может происходить образование так называемых *активных (реактивных) форм кислорода* — АФК (ROS, reactive oxygen species). В большинстве случаев продуцируется *супероксидный анион радикал (супероксид-радикал, $O_2^{\bullet-}$)*, который быстро превращается в другие АФК — *пероксид водорода (H_2O_2)* и *гидроксильный радикал (гидроксил-радикал, $\bullet OH$)*. К АФК относят также другие химически активные кислородсодержащие соединения, в частности — *перекиси и синглетный кислород (1O_2)*. Таким образом, среди АФК есть свободные радикалы ($O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$) и соединения, которые ими не являются (H_2O_2 , 1O_2). Следует отметить, что $O_2^{\bullet-}$ и $\bullet OH$, как и все свободные радикалы, содержат на внешней электронной оболочке неспаренный электрон, который обозначается точкой (\bullet). АФК обладают чрезвычайно высокой реакционной способностью и могут спонтанно окислять практически любые органические соединения.

Образование активных форм кислорода. АФК представляют собой продукты неполного восстановления кислорода до воды одним, двумя или тремя электронами:



У растений $O_2^{\bullet-}$ образуется в норме в электрон-транспортных цепях хлоропластов и митохондрий. Супероксидрадикал имеет короткое время жизни (10^{-6} с) и очень быстро превращается (энзиматическим и неэнзиматическим путем) в другие активные формы кислорода. При низких значениях pH супероксид-радикал практически не проявляет активность сам по себе, а инактивирует белки или вызывает перекисное окисление липидов в своей протонированной форме *гидропероксил-радикала (HO_2^{\bullet})*. Образование HO_2^{\bullet} происходит за счет протонирования $O_2^{\bullet-}$:



При физиологических pH супероксидрадикал вступает в реакцию дисмутации, в результате которой из двух молекул $O_2^{\bullet-}$ образуется H_2O_2 и O_2 :

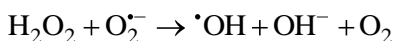


Этот процесс может идти самопроизвольно и каталитическим путем. Очень быструю нейтрализацию $O_2^{\bullet-}$ осуществляют различные *супероксиддисмутазы (СОД)*,

которые катализируют его превращение в H_2O_2 . В клетках растений выявлены три изоформы СОД, которые различаются по металлам, входящим в состав активного центра: Fe-СОД (хлоропласт), Mn-СОД (митохондрии, пероксисомы) и Cu-Zn-СОД (апопласт, цитоплазма, хлоропласт, пероксисомы). Пероксид водорода может также образовываться в фотодыхании и в глиоксилатном цикле (соответственно, в пероксисомах и глиоксисомах). Следует отметить, что пероксид водорода более стабилен, чем $\text{O}_2^{\cdot-}$, может диффундировать по клетке и транспортироваться через мембраны с помощью аквапоринов.

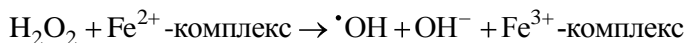
Самой "опасной" формой АФК является гидроксил-радикал ($\cdot\text{OH}$), который образуется только неэнзиматическим путем на фоне высокого содержания H_2O_2 . Гидроксил-радикал способен окислять практически любые соединения. Поскольку время жизни $\cdot\text{OH}$ очень мало (10^{-9} с), он не может диффундировать на большие расстояния и проявляет свою активность только в местах своего образования.

Гидроксил-радикал образуется в реакции *Хабера—Вайса*, которая протекает в присутствии ионов железа (Fe^{2+}) или меди (Cu^+):

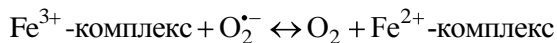


Реакция Хабера—Вайса может быть разделена на два этапа:

1. *Реакция Фентона*, в которой $\cdot\text{OH}$ образуется из H_2O_2 с участием металлов с переходной валентностью в хелатированной форме (Fe^{2+} или Cu^+):



2. Fe^{3+} -комплекс может эффективно восстанавливать $\text{O}_2^{\cdot-}$, обеспечивая таким образом цикличность реакции Фентона:



Скорость данной реакции возрастает в присутствии аскорбата, способного восстанавливать O_2 до H_2O_2 , а Cu^{2+} до Cu^+ .

Обычно молекулярный кислород находится в относительно инертном *триплетном состоянии* — $^3\text{O}_2$, при этом у парных электронов каждого атома О спины параллельны. При взаимодействии с хлорофиллом, находящимся в возбужденном триплетном состоянии, может инициироваться обращение спина одного из электронов $^3\text{O}_2$ и переход его в более активную — *синглетную форму кислорода* ($^1\text{O}_2$). Синглетный кислород может также появляться при воздействии на кислород ультрафиолета.

Антиоксидантная защита клетки. В процессе дыхания около 95% от всего потребляемого кислорода клетки восстанавливается в митохондриях до воды. Однако оставшиеся 5% кислорода могут превращаться в АФК. Повышение уровня АФК приводит к *оксидативному (окислительному) стрессу*. Поскольку гидроксилрадикал чрезвычайно активен, "бороться" с ним невозможно. Поэтому работа антиоксидантной системы направлена на нейтрализацию таких АФК, как $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 и $^1\text{O}_2$.

Наиболее важную роль в системе антиоксидантной защиты клетки играют такие ферменты, как *супероксиддисмутазы*, *каталаза*, различные формы *пероксидазы* (гваяколовая пероксидаза, аскорбатпероксидаза, глутатионпероксидаза), а также гидрофобные антиоксиданты — α -, β -, γ -, σ -*токоферолы* и *каротиноиды*. В фотосинтезирующих тканях доминирует α -токоферол, известный как *витамин E*.

Защита растений от избытка активных форм кислорода и удаление их излишков, например H_2O_2 , может также происходить через *аскорбат-глутатионовый цикл* или путь *Холливэла—Асада*. В этом пути (рис. 3.20) восстановление H_2O_2 с образованием воды катализирует аскорбатпероксидаза. При этом происходит окисление аскорбата до монодегидроаскорбата (МДА), который может быть восстановлен МДА-редуктазой до аскорбата за счет НАД(Ф)Н. Из МДА в результате спонтанной дисмутации может быть образован дегидроаскорбат, который восстанавливается до аскорбата за счет окисления глутатиона. Завершается этот путь восстановлением окисленной формы глутатиона с участием НАДФН.

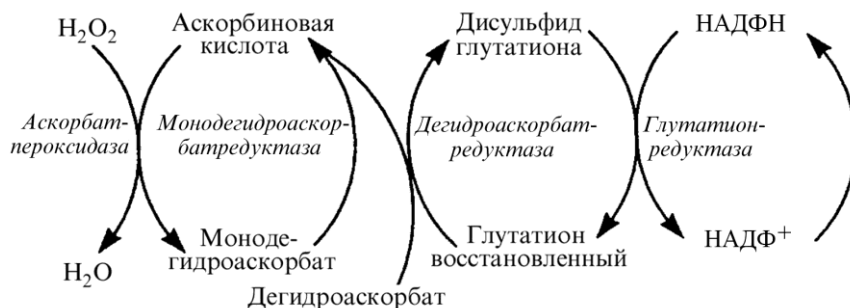


Рис. 3.20. Аскорбат-глутатионовый цикл или путь Холливэла-Асада

В заключение хотелось бы еще раз отметить, что АФК являются продуктами нормальной жизнедеятельности клетки, а в ряде сигнальных путей они могут даже выполнять функции вторичных посредников. АФК образуются в электрон-транспортных цепях митохондрий и хлоропластов, в пероксисомах и глиоксисомах, при взаимодействии озона с кислородом в клетках растений, а также в реакции сверхчувствительности (СВЧ). У растительных организмов образование АФК возрастает при старении тканей, а также при стрессовых ситуациях — засухе, низких температурах, засолении, механических повреждениях, атаке патогенов, воздействии ксенобиотиками, облучении ультрафиолетом. Процесс образования большого количества активных форм кислорода называют окислительным взрывом. АФК способны индуцировать цепные реакции, приводящие к образованию большого количества свободных радикалов, вызывающих перекисное окисление липидов, нарушение целостности мембран, инактивацию ферментов и разрушение нуклеиновых кислот. В ходе реакции СВЧ (см. разд. 14.2) эти процессы завершаются появлением некротических пятен, гибелью части клеток растения-хозяина и патогена.

Глава 4



Водный режим растений

Человек компетентный — это тот,
кто заблуждается по правилам.

П. Валери

Голландский ученый ван Гельмонт (J. V. van Helmont, 1579—1644), которого называют "последним алхимиком и первым биохимиком", вероятно, был также первым естествоиспытателем, который стал проводить эксперименты на растениях. Он решил проверить идею Аристотеля о том, что растения с помощью корней извлекают из земли готовую пищу. Ван Гельмонт пытался выяснить, что именно является питанием для растений — почва или вода. Он посадил ветку ивы (весом 5 фунтов) в горшок с землей, сухой вес которой был равен 200 фунтам. Иву поливали дождевой водой, и дерево прекрасно развивалось. Ровно через 5 лет Гельмонт извлек растение из горшка, очистил от земли и взвесил. Растение за 5 лет увеличилось в весе на 164 фунта. Затем он высушил и взвесил землю, которая за 5 лет потеряла в весе всего лишь 2 унции. Отсюда Гельмонт делает вывод, что пищей растению служит вода. Это был первый количественный эксперимент с живым организмом. Что же касается трактовки полученных результатов, то при этом он честно заблуждался, полагая, что питанием растению служит вода. Его выводы послужили основой водной теории питания растений, которая (несмотря на ее ошибочность) продержалась почти до конца XIX века. Сотни людей проверяли опыт ван Гельмонта, получали аналогичные результаты и делали аналогичные выводы. Тех же, кто пытался доказать, что Гельмонт не прав, долгое время даже не хотели выслушивать. В то время ван Гельмонт еще не знал, что содержащийся в воздухе CO_2 может вносить свой вклад в рост растений — это установил (более чем 100 лет спустя) швейцарский химик Соссюр (N. De Saussure). Через 245 лет после смерти Гельмонта (в 1889 г.) ему поставили памятник "За полезные для науки заблуждения". Такова может быть сила вошедшей во все учебники доктрины.

4.1. Функции воды в растении

Вода имеет определяющее значение для жизнедеятельности растения. Она составляет от 80 до 95% массы растущих тканей. В семенах же ее содержание резко снижается и составляет от 5 до 15%. Для увеличения биомассы растительного организма на 1 г необходимо, чтобы около 500 г воды поглотилось корневой системой, транспортировалось по растению и выделилось с его поверхности в атмосферу. Вода обладает уникальными свойствами, благодаря которым она имеет первостепенное значение во всех процессах жизнедеятельности клетки. Даже небольшое нарушение водного режима вызывает серьезные сдвиги в обмене веществ. Жизнь на Земле зародилась только благодаря воде, водная среда является основой для протекания большинства процессов, происходящих в клетках животных и растительных организмов.

Именно водная фаза объединяет все клетки и ткани растительного организма в единое целое, участвует в построении и упорядочении мембранных структур, гидратирует белки, нуклеиновые кислоты и полисахариды. Вода является основным растворителем и активным метаболитом многих биохимических процессов. При фотосинтезе вода служит донором электронов и протонов, используемых на восстановительные биосинтезы. В процессе роста растения большая часть увеличения его массы обеспечивается за счет воды. При дыхании, например в цикле Кребса, вода принимает непосредственное участие в окислительных процессах. Процессы гидролиза, а в ряде случаев и синтеза идут с участием воды. Передвижение веществ по растению в сосудах ксилемы и ситовидных трубках осуществляется в водной среде. Обладая высокой теплоемкостью и большой удельной теплотой парообразования, вода обеспечивает терморегуляцию растительного организма и защищает ткани от резких колебаний температуры. Благодаря явлениям осмоса и тургорному давлению вода обеспечивает упругое состояние клеток и тканей растительного организма, а также их защиту (как амортизатор) при механических воздействиях.

4.2. Структура и свойства воды

Молекулярное строение. В молекуле воды атом кислорода ковалентно связан с двумя атомами водорода. Две ковалентные связи O—H в молекуле воды формируют угол $104,45^\circ$ (рис. 4.1).

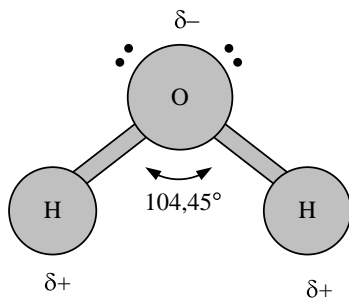


Рис. 4.1. Строение молекулы воды. Черные точки — электроны, концентрирующиеся у атома кислорода. Образование отрицательного и положительного заряда в молекуле воды показано, как δ^- и δ^+

Атом кислорода обладает большей способностью оттягивать на себя электроны ковалентной связи. В результате со стороны кислорода образуется отрицательный заряд, а со стороны каждого атома водорода — положительный. Поскольку в молекуле воды разноименные заряды разделены, она при общей электронейтральности является полярной молекулой — молекулой-диполем. Это свойство обуславливает тенденцию молекул воды притягиваться друг к другу разноименными полюсами и определенным образом ориентироваться вокруг других молекул и ионов. Слабые электростатические взаимодействия между атомами Н и О в молекулах воды обеспечиваются за счет водородных связей. Именно водородные связи отвечают за многие необычные физико-химические свойства воды. Поскольку водородные связи более слабые (около 19 кДж/моль) по сравнению с ковалентными связями (460 кДж/моль), они постоянно возникают и разрушаются. Каждая молекула воды, являясь диполем с тетраэдрическим распределением электронов вокруг атома кислорода, за счет образования водородных связей может взаимодействовать с четырьмя другими молекулами воды (рис. 4.2).

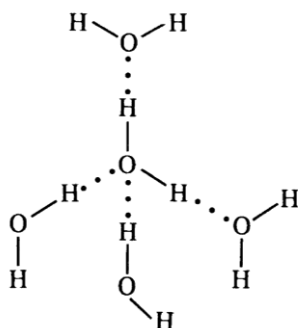


Рис. 4.2. Формирование водородных связей между молекулами воды

Агрегатные состояния. Вода может находиться в трех агрегатных состояниях — твердом, жидком и газообразном. В структуре льда каждая молекула воды окружена четырьмя другими молекулами, образующими тетраэдр, формируя таким образом, кристаллическую структуру льда. Жидкая вода в зависимости от температуры может находиться в жидкокристаллическом или свободном состоянии (рис. 4.3).

В жидкокристаллическом состоянии молекулы воды объединены водородными связями в кластеры, время жизни которых составляет 10^{-10} — 10^{-11} с. Считается, что в каждый момент времени в формировании кластеров участвует до 2/3 молекул воды.

Ионизация воды. Поскольку электроны в молекуле воды сильнее связаны с кислородом, чем с водородом, происходит диссоциация воды:



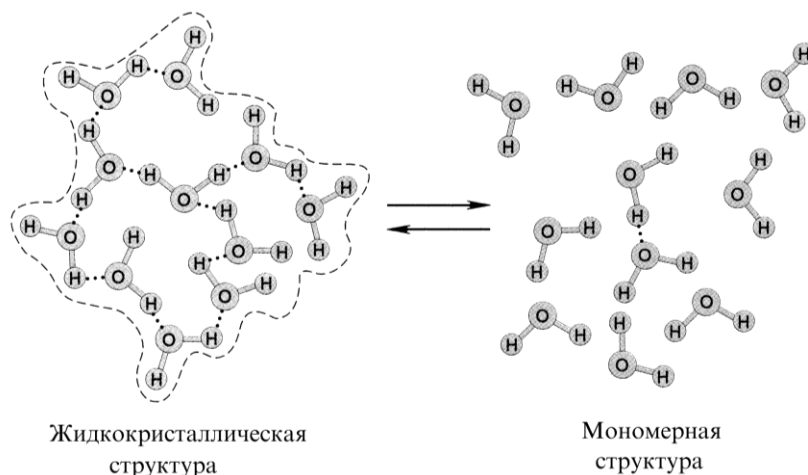
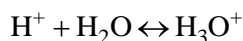
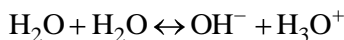


Рис. 4.3. Жидкокристаллическое и свободное состояния воды

Однако свободный протон не способен к самостоятельному существованию и гидратируется молекулой воды с образованием иона *гидроксония*:



Обычно ион H^+ переходит от одной молекулы воды к другой с образованием гидроксильного иона и иона гидроксония. Поэтому суммарная реакция запишется следующим образом:



Физико-химические свойства воды. Биологические мембраны могут содержать до 25% воды в связанной форме. В связанной форме вода находится и в капиллярах (капиллярная вода). В основе явления *капиллярности* лежат три процесса: когезия, адгезия и поверхностное натяжение. Все эти процессы имеют место в биологических системах.

Когезией называют процесс связывания (сцепления) молекул воды между собой за счет водородных связей. Именно благодаря когезии вода может подвергаться натяжению (от десятков до нескольких сотен мегапаскалей (МПа)), прежде чем столб воды в капилляре (сосуде ксилемы) разрушится.

Взаимодействие молекул воды с твердой фазой (например, клеточной стенкой) за счет водородных связей называют *адгезией*. Адгезия (или прилипание) характерна только для воды, у ртути, например, этого не происходит. В основе капиллярности, т. е. подъема воды по капилляру против вектора силы тяжести, лежат процессы когезии, адгезии, а также поверхностное натяжение.

Опыт показывает, что для увеличения поверхности какой-либо фазы, например поверхности воды, граничащей с газообразной средой, необходима затрата работы. Эта работа, связанная с увеличением поверхности, выражается в эргах на квадрат-

ный сантиметр (эрг/см²) и равна *поверхностному натяжению* на границе раздела фаз. Если перенос молекул вещества из внутренних частей фазы к ее границе связан с затратой работы, это означает, что свойства вещества в поверхностном слое отличаются от его свойств в более глубоких слоях. Молекула воды, находящаяся внутри жидкой фазы, подвергается воздействию со стороны соседних молекул равномерно со всех сторон. На границе раздела фаз молекулы воды испытывают более сильное притяжение со стороны ее жидкой фазы, чем со стороны газообразной среды. Эти различия между поверхностными и глубинными слоями молекул воды уменьшаются с увеличением расстояния от поверхности.

Теплоемкость воды (количество теплоты, необходимое для повышения ее температуры на 1 °С) в 5—30 раз выше, чем у других веществ. Только водород и аммиак обладают большей теплоемкостью. Эта особенность воды объясняется сцеплением молекул воды друг с другом (когезией) за счет водородных связей и обеспечивает защиту растений от резкого повышения температуры.

4.3. Водные растворы

В теории растворов известно такое правило: подобное растворяется в подобном. Вода из-за полярной структуры и небольших размеров молекулы является наилучшим растворителем полярных веществ. Растворение, например, кристаллов неорганических солей осуществляется за счет гидратации ионов, входящих в состав растворяемых соединений. Хорошо растворяются в воде также сахара, белки и другие органические соединения, которые содержат полярные группы: COO^- , NH_3^+ , OH^- и др. При растворении молекулы воды ориентируются вокруг ионов и полярных молекул, нейтрализуя их электрические заряды. Это ослабляет электростатические взаимодействия между заряженными веществами и повышает их растворимость.

При растворении веществ в воде происходит изменение ее жидкокристаллической структуры, изменяется также и вязкость раствора. Эти изменения зависят, прежде всего, от поляризующей силы иона и его концентрации. В разбавленных растворах небольшие по размеру ионы с большой плотностью заряда сильнее действуют на структуру водородных связей воды, чем крупные ионы, имеющие малую плотность заряда. Однако и те, и другие ионы разрушают жидкокристаллическую структуру воды и изменяют вязкость раствора.

При гидратации катиона молекулы воды ориентируются отрицательным полюсом внутрь комплекса. Если же гидратируется анион, то внутрь направлены положительные полюсы молекул-диполей воды (рис. 4.4). Процесс формирования слоя молекул-диполей воды, прочно связанных с центральным ионом, называют *первичной гидратацией*. Однако ионы могут оказывать влияние на ориентацию молекул воды, которые не входят в состав первичной оболочки, а расположены за ее пределами. Такую гидратацию называют *вторичной*. В состоянии первичной гидратации подвижность молекул воды гораздо ниже, чем у молекул воды вторичной оболочки.

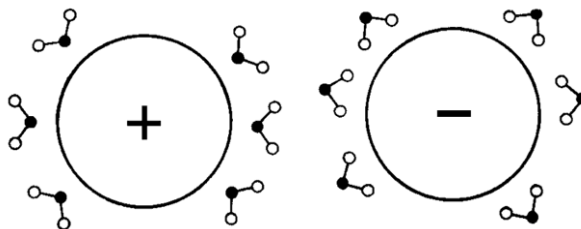


Рис. 4.4. Гидратация ионов молекулами воды

Вода, связанная с ионами, называется *связанной осмотически* и является важным элементом осмотического давления в клетках растений. При концентрации раствора более 1,5—2 моль/л вторичные гидратные оболочки вокруг ионов начинают перекрываться и вода переходит в новую форму — *кристаллогидрат*. Чем больше ионов в растворе, тем больше нарушается структура воды, меньше необходимо энергии для разрушения оставшихся водородных связей и тем меньше теплоемкость раствора. При гидратации происходит выделение тепла (экзотермический процесс) и увеличение объема гидратируемого вещества, при осмотическом поглощении — только увеличение объема.

Вода, оказавшаяся внутри макромолекул (*иммобилизованная*), может находиться в двух формах. Одна часть ее формирует слой первичной гидратации, а вторая сохраняет свойства обычной воды, но с ограниченной подвижностью. Молекулы белков гидратируются только в местах расположения полярных и ионизированных групп. Растворимость белков в воде варьирует в широких пределах и зависит от концентрации солей и pH.

4.4. Водный обмен растительных клеток

Поглощение воды из внешней среды является обязательным условием существования любого живого организма. Поступление воды в клетки идет в результате осмоса, набухания биоколлоидов, а также благодаря увеличению степени их гидратации. В тургесцентных клетках центральная вакуоль плотно прижимает цитоплазму к клеточной стенке, тем самым способствуя поддержанию формы клетки в мягких органах растения, например в листьях. При недостатке влаги вода выходит из вакуоли, что приводит к утрате тургора и увяданию.

4.4.1. Формы воды в растительных клетках

Содержание воды в растительных тканях очень изменчиво, зависит от времени года и суток и сильно различается у различных видов и тканей растений. Вода может находиться в клетках и тканях в двух состояниях: свободном и связанном. *Свободная вода* — это чистая, лишенная каких-либо примесей вода с высокой подвижностью. Под *связанной* подразумевают содержащуюся в гетерогенных системах воду,

которая не может служить растворителем и имеет ограниченную подвижность. Различают три формы связанного состояния воды: осмотически, коллоидно и капиллярно связанную воду.

Осмотически связанная вода участвует в гидратации растворимых веществ (см. ранее). Даже при сильном обезвоживании растительного организма очень большие количества воды удерживаются внутри клеток гидратированными коллоидами, ионами и другими осмотически активными веществами.

Коллоидно связанная вода включает *интрамицеллярную воду*, находящуюся внутри коллоидной системы, и *интермицеллярную воду* на поверхности коллоидов и между ними. Таким образом вода может связываться с белками и полисахаридами. Количество связываемой коллоидами воды может быть достаточно большим. Например, в желатиновых гелях оно достигает 30 г воды на 1 г сухого желатина.

Капиллярно связанная вода находится в клеточных стенках и сосудах проводящей системы. Клеточные стенки обладают высокой гигроскопичностью и удерживают воду в основном за счет высокой гидрофильности пектиновых и целлюлозных компонентов. Содержание воды в клеточных стенках тургесцентных клеток может составлять около 50%. В фазе клеточных стенок вода может находиться в свободном и связанном состоянии. Вода, удерживаемая в микрокапиллярах, а также связанная водородными связями с полисахаридами, малоподвижна. Свободная вода легко перемещается в крупных капиллярах между микрофибриллами целлюлозы. Передвижение воды вне проводящих пучков осуществляется, главным образом, по клеточным стенкам.

Содержание воды в цитоплазме может достигать 95% от ее массы. Наибольшее количество воды в цитоплазме связывается на поверхности и внутри белковых молекул. Помимо белков цитоплазма содержит ионы, сахара, липиды и другие соединения, которые также оказывают влияние на состояние воды.

Больше всего воды в растительной клетке (до 98%) концентрируется в вакуоли. Вакуолярный сок содержит сахара, органические кислоты, ионы, белки и другие соединения, которые связывают воду осмотически и как биокolloиды. Вода в клетке может быть связана также пластидами, митохондриями и ядром, которые способны к самостоятельному регулированию своего водообмена за счет набухания или удерживания воды при обезвоживании клетки. В отличие от цитоплазмы содержание воды в пластидах и митохондриях обычно ниже (10—20%), что объясняется присутствием в них большого количества липидов и гидрофобных веществ.

Вода является важным структурным компонентом мембран, которые могут содержать до 25—30% воды в связанной форме. Взаимодействие воды с мембранными липидами и белками определяет структурно-функциональные свойства мембран и играет важную роль в процессах их формирования и стабилизации. Связанная в мембранах вода обуславливает, например, образование строго ориентированного слоя фосфолипидов в результате гидрофобных взаимодействий молекул. Наименьшей подвижностью характеризуется вода, находящаяся в виде одиночных молекул в углеводородной зоне мембраны. Основная же часть связанной воды формирует гидратные оболочки вокруг полярных частей молекул липидов и белков. Гидратные оболочки структурных липидов состоят обычно из 10—12 молекул воды.

4.4.2. Водный потенциал

Энергетический уровень воды, как и любого другого вещества, отражаемый скоростью диффузии, называют химическим потенциалом, или, применительно к воде, *водным потенциалом* (Ψ_w). Водный потенциал является термодинамическим показателем состояния воды в системе и характеризует способность воды диффундировать, испаряться или поглощаться. Водный потенциал имеет размерность энергии, деленной на объем (что совпадает с размерностью давления), и его величину выражают в атмосферах, барах (1 бар = 0,987 атм.) или паскалях (1 МПа = 10 атм.). Направление диффузии молекул воды, или массового водного тока, определяется градиентом водного потенциала.

Водный потенциал складывается как минимум из четырех компонентов:

$$\Psi_w = \Psi_s + \Psi_p + \Psi_g + \Psi_m.$$

Ψ_s — осмотический потенциал, определяется концентрацией растворенного вещества.

$$\Psi_s = -cRT,$$

где c — концентрация вещества в молях; R — газовая постоянная; T — абсолютная температура; знак "—" указывает на то, что растворенное вещество уменьшает водный потенциал раствора. С увеличением концентрации вещества осмотический потенциал становится все более отрицательным. Осмотический потенциал — величина равная, но обратная по знаку осмотическому давлению.

Ψ_p — потенциал давления, отражает влияние на активность воды механического (гидростатического) давления. В растительной клетке потенциал давления представляет собой тургорное противодействие клеточной оболочки, возникающее при ее эластичном растяжении. Положительное давление повышает водный потенциал, отрицательное — его снижает. Потенциал давления по абсолютной величине равен тургорному давлению, но противоположен ему по знаку.

Ψ_g — гравитационный потенциал, отражает влияние на активность воды силы тяжести, заставляет воду двигаться вниз до тех пор, пока силе гравитации не будет противостоять равная ей по величине другая сила. Поэтому водный потенциал зависит от веса воды. Гравитационный потенциал заметно сказывается на водном потенциале при поднятии воды на относительно большую высоту, например у высоких деревьев.

Ψ_m — потенциал набухания биокolloидов (матричный потенциал), связан с поглощением воды клетками за счет гидратации белков и других биокolloидов.

Наибольшая величина водного потенциала у чистой воды. Она условно принята за "0". Водный потенциал растворов, растительных клеток и тканей, почвы, атмосферы, как правило, имеет отрицательное значение.

Водный потенциал и его отдельные компоненты оказывают сильное воздействие на процесс фотосинтеза и продуктивность сельскохозяйственных растений. Подобно

температуре тела человека, он служит хорошим интегральным показателем "здоровья" растения. Поэтому исследователи постоянно предпринимают попытки создания простых, но точных приборов, позволяющих регистрировать водный статус растения. Для измерения Ψ_w , Ψ_s и Ψ_p на практике обычно используют такое оборудование, как психрометр, осмотическая ячейка, криоскопический осмометр и различные типы датчиков, которые позволяют регистрировать гидростатическое давление растительных клеток.

4.4.3. Осмос

Осмозом называют процесс диффузии воды в раствор, отделенный полупроницаемой мембраной, которая пропускает молекулы растворителя, но не растворенных веществ. Основной движущей силой водных потоков в клетках и тканях растений является градиент осмотического потенциала. Численно *осмотический потенциал* равен тому давлению, которое необходимо приложить к раствору, чтобы предотвратить поступление в него воды. Если вода диффундирует в раствор, отделенный от нее полупроницаемой мембраной, возникает давление (*осмотическое давление*), равное по величине, но противоположное по знаку исходному осмотическому потенциалу.

Для измерения осмотического давления можно использовать осмометр, предложенный в 1877 г. немецким физиологом В. Пфедфером (W. Pfeffer). Прибор состоит из трех отсеков: внешнего сосуда с водой, внутреннего сосуда с раствором осмотически активного вещества, например сахарозы, и манометрической трубки (рис. 4.5).

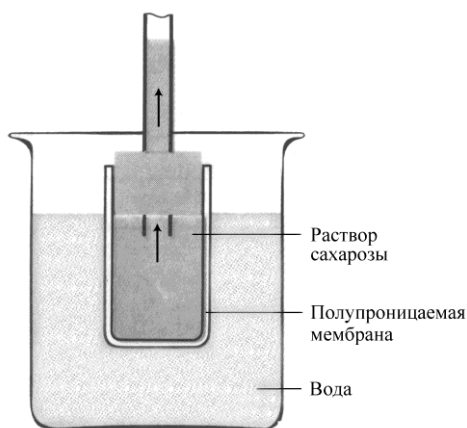


Рис. 4.5. Осмотическая ячейка

Внешний и внутренний сосуды разделены полупроницаемой мембраной, которая пропускает только воду, но не осмотик. Во внутренний сосуд вставлена градуированная манометрическая трубка, сообщающаяся с атмосферой. Из-за разницы ос-

мотического давления вода будет поступать из внешнего сосуда во внутреннюю ячейку. Это приведет к увеличению объема жидкости во внутренней ячейке и поднятию уровня раствора в манометрической трубке до тех пор, пока гидростатическое давление столба жидкости не сравняется с осмотическим давлением раствора.

Для расчета осмотического давления используют формулу, предложенную Вант-Гоффом:

$$P_{\text{осм.}} = i \cdot c \cdot RT.$$

Здесь: i — изотонический коэффициент, равный $1 + \alpha n - 1$, где α — степень электролитической диссоциации; n — количество ионов, на которые распадается молекула электролита. Из уравнения следует, что осмотическое давление определяется концентрацией растворенного вещества. Осмотическое давление выражают в паскалях.

4.4.4. Транспорт воды в растительной клетке

Растительную клетку условно можно сравнить с осмометром, внутренним отсеком которого является цитоплазма (или вакуоль), окруженная мембраной. Если плазмолизированную клетку погрузить в чистую воду, то в нее начнет поступать вода. В отсутствие противодействия клеточной стенки поступление воды в клетку целиком определяется ее осмотическим потенциалом (Ψ_s).

Однако по мере проникновения воды объем клетки возрастает и клеточная стенка начинает испытывать давление. Давление, которое возникает за счет увеличения объема вакуоли и прижатия цитоплазмы к клеточной стенке, называется *тургорным*. Тургорное давление необходимо для роста растительных клеток растяжением, газообмена листьев, передвижения веществ по флоэме. Оно придает механическую прочность нелигнифицированным тканям и поддерживает их форму.

Если бы клеточная стенка могла растягиваться неограниченно, поступление воды в клетку шло бы до тех пор, пока концентрации осмотически активных веществ снаружи и внутри клетки сравняются. Однако, поскольку эластичность клеточной стенки невелика, она начинает давить на протопласт в противоположном направлении. Это противодействие, оказываемое клеточной стенкой на клеточное содержимое, называют *тургорным натяжением*. Под потенциалом давления (Ψ_p) понимают именно тургорное натяжение, т. е. противодействие клеточной стенки. В соответствии с третьим законом Ньютона тургорное натяжение равно (но противоположно по знаку) тургорному давлению.

Таким образом, при "осмотическом" поступлении воды в клетку возникает тургорное давление клеточного содержимого и противодействие на него клеточной стенки — тургорное натяжение. При достаточно большом значении Ψ_p дальнейший приток воды в клетку прекращается. Устанавливается динамическое равновесие, при котором положительный потенциал давления (Ψ_p) полностью уравновешивает

ется отрицательным осмотическим потенциалом (Ψ_s), и клетка перестает поглощать воду — ее водный потенциал равен нулю ($\Psi_w = \Psi_p - \Psi_s = 0$).

Теперь рассмотрим ситуацию, когда растение испытывает недостаток влаги и водный потенциал клеточной стенки ниже, чем внутри клетки. В таком случае вода выходит из вакуоли, клетки теряют тургор, становятся вялыми и мягкими. В искусственных условиях потери тургора можно добиться при погружении растительных тканей в более концентрированные растворы, чем клеточное содержимое. При этом может происходить отделение плазмалеммы от клеточной стенки и сокращение объема протопласта. Явление потери тургора клетками в гипертонической среде называют *плазмолизом*.

4.4.5. Аквапорины

Аквапорины (aquaporin's, AQP's) представляют собой семейство небольших белков (23—31 кДа), формирующих селективные каналы, способствующие транспорту воды через клеточные мембраны. Транспорт воды через клеточные мембраны с помощью аквапоринов происходит пассивно по градиенту водного потенциала и без затраты энергии. Помимо воды ряд аквапоринов способны также пропускать небольшие незаряженные вещества (мочевину, глицерол, борную и кремниевую кислоты, H_2O_2), а также газы (CO_2 , NH_3 , NO).

Впервые водные каналы были выявлены П. Агри с коллегами (P. Agre et al., 1987) в мембране эритроцитов и почечных канальцах. В дальнейшем белки, гомологичные аквапоринам животных, были идентифицированы у бактерий, грибов и растений. За открытие аквапоринов П. Агри в 2003 г. была присвоена Нобелевская премия по химии. Семейство аквапоринов входит в более крупное семейство "основных внутренних белков", называемых MIP (major intrinsic proteins).

У растений описаны четыре группы аквапоринов:

- аквапорины плазматической мембраны — PIP (plasma membrane intrinsic proteins);
- аквапорины тонопласта — TIP (tonoplast intrinsic proteins);
- аквапорины эндоплазматического ретикулума — SIP (small intrinsic protein);
- нодулин-подобные мембранные белки — NIP (nodulin intrinsic proteins), названные по аквапорину перибактероидной мембраны клубеньков сои (они выявлены также и в плазмалемме).

В геноме арабидопсиса найдено 35 генов, кодирующих аквапорины (13 PIP, 10 TIP, 9 NIP и 3 SIP).

В клеточных мембранах аквапорины образуют тетрамеры, при этом каждый мономер является независимым водным каналом. Каждый мономер аквапоринов содержит шесть трансмембранных α -спиралей, соединенных двумя цитоплазматическими (*B* и *D*) и тремя экстраклеточными (*A*, *C* и *E*) петлями (рис. 4.6).

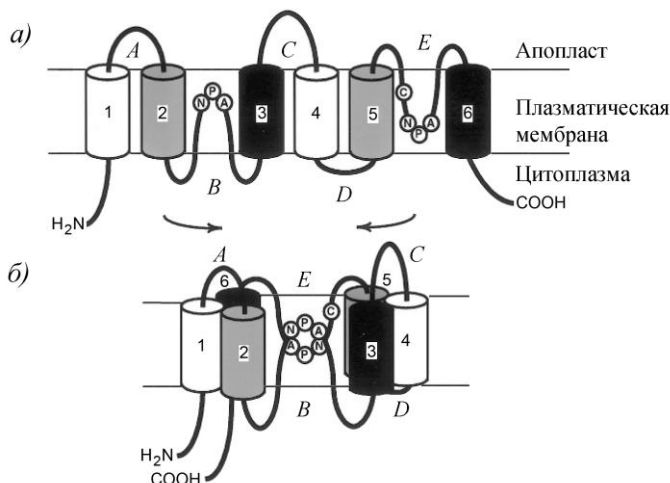


Рис. 4.6. Строение мономера (а) и формирование водной поры (б) аквапоринов (Jung et al., 1994): 1—6 — шесть трансмембранных α -спиралей; NPA (асп-про-ала) — консервативные аминокислотные последовательности, находящиеся на двух коротких α -спиралах аквапоринов; А, С и Е — экстраклеточные петли, В и D — цитоплазматические петли. Стрелками показан процесс объединения петель В и Е при создании водной поры, формируемой за счет коротких α -спиралей аквапорина

На петлях В и Е имеются два коротких домена, содержащих консервативные аминокислотные последовательности NPA (асп-про-ала). При объединении петель В и Е происходит создание структуры (водной поры), которая похожа на песочные часы, узкая часть которых формируется именно за счет коротких доменов. Поэтому предполагается (Jung et al., 1994), что вода проходит через пору аквапорина подобно песку в песочных часах (*hourglass model*). При разнице осмотического давления в 1 МПа через одиночную пору аквапорина проходит более 100 молекул воды в секунду. Транспортная активность аквапоринов регулируется их фосфорилированием и рН. При изучении активности аквапоринов в качестве ингибиторов используют ионы ртути (Hg), блокатор калиевых каналов *тетраэтиламмоний*, фенольное соединение *флоретин*, а также ряд других веществ.

4.5. Водный баланс растения

Очень важным параметром водного обмена является *степень оводненности* растительных тканей или *относительное содержание воды*. Степень оводненности можно рассчитать (в %), зная сырую ($m_{\text{сыр}}$) и сухую массу ($m_{\text{сух}}$) ткани, а также сырую массу в состоянии полного насыщения водой ($m_{\text{сыр.нас.}}$) по формуле:

$$\text{степень оводненности} = \frac{m_{\text{сыр}} - m_{\text{сух}}}{m_{\text{сыр.нас.}} - m_{\text{сух}}} \cdot 100\%.$$

У большинства мезофитов степень оводненности составляет 85—95%. Если поглощение и потребление воды растением сбалансированы, степень оводненности не меняется. Если оводненность меньше 50%, то ткани начинают отмирать. Поэтому растения стремятся регулировать потоки воды таким образом, чтобы поддерживать оводненность клеток и тканей на необходимом уровне.

Движущей силой дальнего транспорта воды в растении являются два процесса — "присасывающее" действие транспирации и корневое давление. Очень часто эти два процесса называют *верхним* (транспирация) и *нижним* (корневое давление) *концевыми двигателями* потока воды в растении.

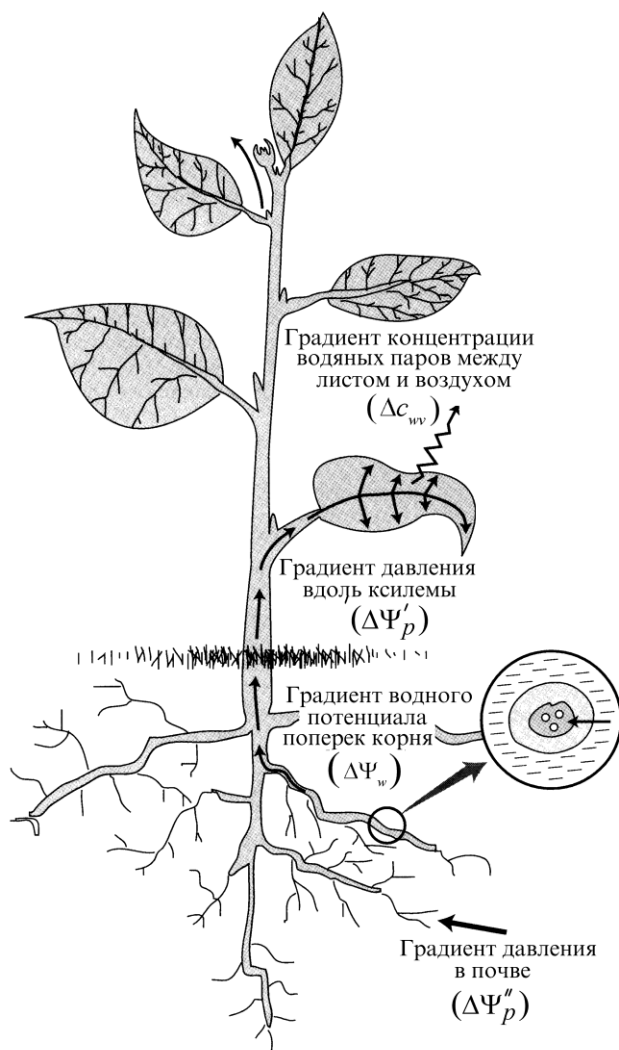


Рис. 4.7. Основные движущие силы водного потока от почвы через растение в атмосферу (Taiz, Zeiger, Cosgrove, 1998)

Хорошо известно, что градиент водного потенциала между атмосферой и почвой настолько велик, что его вполне хватает для подъема воды даже у самых высоких деревьев. Растительные организмы как бы "встраиваются в промежуток" между высоким водным потенциалом почвы и низким водным потенциалом воздуха и используют этот градиент для транспорта воды через растение.

Движущие силы водного потока от почвы через растение в атмосферу включают три типа градиентов (рис. 4.7): гидростатического давления ($\Delta\Psi_p$), водного потенциала ($\Delta\Psi_w$) и концентрации водяных паров (Δc_{wv}).

Градиенты гидростатического давления ($\Delta\Psi_p$), влияющие на транспорт воды в растении, имеются на границе почвенного воздуха и клеток корня, а также между сосудами ксилемы и окружающими тканями. Из окончаний сосудов ксилемы вода поступает в клеточную стенку клеток мезофилла, где она испаряется в воздушной полости листа. Так как концентрация водяных паров внутри листа обычно выше, чем в атмосфере, вода по градиенту Δc_{wv} диффузионным путем выходит из листа через устьица. Следует отметить, что наибольший перепад водного потенциала имеет место не между почвой и растением, а между растением и воздухом.

4.5.1. Поглощение воды корнями

Почти вся поглощаемая растением вода поступает в него через корни. Лишь незначительное количество воды поглощают надземные части растения. Растения не могут транспортировать воду активно. Вода поглощается главным образом за счет осмотических сил, перемещаясь от участков с высоким водным потенциалом почвы к участкам с более низким водным потенциалом корня. В транспорте воды может также участвовать и микориза, особенно в старых частях корня.

При недостатке влаги вода становится основным фактором, определяющим скорость и направление роста корня. При недостатке воды рост корня ориентирован по градиенту влажности, а не силы тяжести. При этом происходит резкое возрастание поглощающей поверхности за счет увеличения количества корневых волосков.

Строение корня. Все особенности анатомии и морфологии корня связаны с его основной функцией — поглощением воды и растворенных в ней минеральных веществ из почвы, а также их транспортом в надземную часть растения (рис. 4.8).

В первичном строении корня различают более десяти типов тканей.

Эпидерма корня (ризодерма) чаще всего представляет собой однослойную ткань, покрывающую корень снаружи. У одних видов растений эпидермальные клетки делятся на два типа — *трихобласты*, которые образуют корневые волоски, и *атрихобласты*, не способные к их формированию. У других видов каждая клетка ризодермы способна формировать корневой волосок. Основная функция эпидермиса связана с поглощением воды и минеральных веществ. Для этого очень важна площадь контакта его поверхности с почвой. У большинства растений корневая система образует сильно разветвленную сеть, глубоко пронизывающую почву.

Площадь корневой поверхности обычно на один-два порядка превышает площадь надземной части растений. Многочисленные корневые волоски проникают между почвенными частицами, увеличивая поглощающую поверхность корня.

Эндодерма сформирована одним слоем клеток, каждая из которых содержит в клеточной стенке *поясок Каспари* — водонепроницаемый слой суберина и лигнина. Поэтому апопластный водный поток на уровне эндодермы прерывается. Эндодерма разделяет клетки коры и ткани центрального цилиндра.

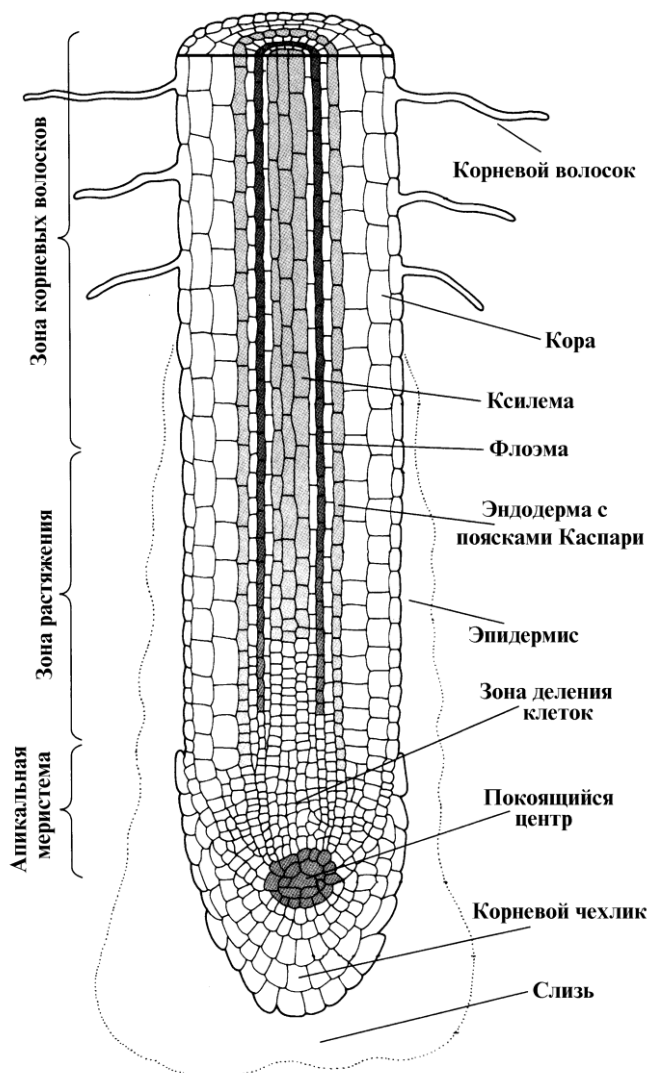


Рис. 4.8. Схема строения корня

Между эндодермой и эпидермой находится *кора корня*, состоящая из нескольких слоев паренхимных клеток. Между клетками коры имеются крупные межклетники, обеспечивающие хорошую аэрацию. У травянистых растений кора может занимать до 85% объема корня.

Центральный цилиндр (стела) включает проводящие ткани (ксилему и флоэму), паренхимные клетки и один (или несколько) слой клеток перицикла. Ткани, входящие в центральный цилиндр, отделены от клеток коры корня эндодермой. *Перицикл* представляет собой слой клеток, расположенный непосредственно под эндодермой. Из перицикла происходит образование боковых и придаточных корней, камбия и феллогена. Через клетки перицикла проходит радиальный поток воды, ионов и ассимилятов.

Радиальный транспорт воды в корне. Поглощение воды корнем из почвы возможно, если имеется соответствующий градиент водного потенциала. От поверхности корня до сосудов ксилемы вода должна пройти клетки эпидермы, коры, эндодермы и перицикла. Радиальное передвижение воды в корне возможно двумя путями: через цитоплазму по плазмодесмам (симпластный поток) и по клеточным стенкам (апопластный поток). По апопласту вода диффундирует по градиенту водного потенциала в направлении эндодермы. При *симпластном транспорте* вначале вода и ионы поглощаются клетками эпидермиса или коры, а затем перемещаются от клетки к клетке по плазмодесмам до сосудов ксилемы (рис. 4.9). В сосуды ксилемы вода и растворенные в ней минеральные вещества попадают осмотическим путем из паренхимных клеток центрального цилиндра.

Апопластный транспорт воды гораздо быстрее, поскольку сопротивление клеточных стенок для воды намного ниже, чем у цитоплазмы. Однако апопластный поток воды и растворенных в ней ионов обрывается на уровне эндодермы из-за непроницаемых для него *поясков Каспари*. Поэтому на уровне эндодермы вода и ионы должны войти в клетку через мембрану и далее передвигаться уже симпластным путем. Следует отметить, что клетки эндодермы не всегда непроницаемы для воды. Во-первых, в молодых растущих клетках пояски Каспари еще не сформированы. Во-вторых, эндодерма прерывается в участках корня, где происходит заложение боковых корней. Тем не менее массовый поток воды по апопласту через клетки эндодермы резко ограничен. Это обстоятельство может эффективно использоваться для тонкого регулирования радиального транспорта воды в корне.

Корневое давление. В сосуды ксилемы вода поступает благодаря градиенту водного потенциала. Осмотически активными веществами в сосудах ксилемы служат минеральные вещества и некоторые метаболиты, выделяемые активными насосами, функционирующими в плазмалемме паренхимных клеток центрального цилиндра. Эти вещества создают осмотический потенциал (Ψ_s), способствующий осмотическому транспорту воды в сосуды ксилемы. В результате этого процесса развивается гидростатическое (*корневое*) давление, обеспечивающее подъем раствора по сосудам ксилемы в надземную часть растения. Механизм, обеспечивающий подъем воды наверх за счет корневого давления, называют *нижним концевым двигателем*.

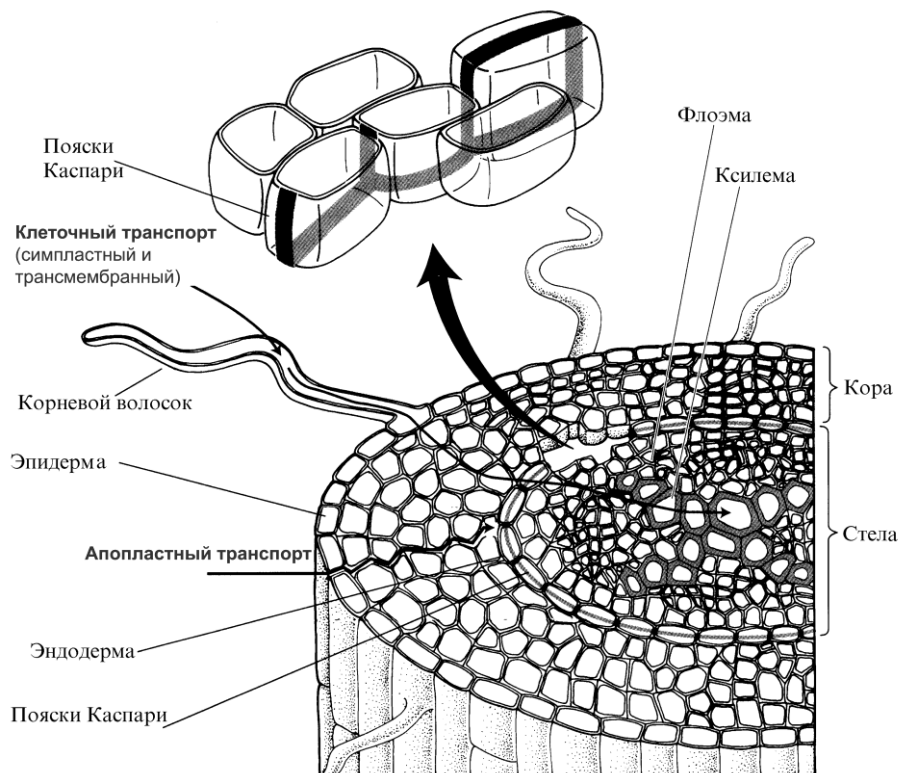


Рис. 4.9. Радиальный транспорт воды в корне

Хорошим примером работы нижнего концевое двигателя является такое явление, как *плач растений*. У деревьев весной на раневых поверхностях происходит выделение ксилемного эксудата. На этом явлении основан сбор березового сока. Количество жидкости, выделяемое при этом, может достигать до 5 л за сутки. Явление "плача" свидетельствует о значительном корневом давлении, которое в этот период у основания ствола деревьев достигает 0,6 МПа. Если у вегетирующего растения удалить стебель, то на срезе начинает выделяться ксилемный сок, или *пасока*. При этом, если на срез поместить манометр, можно измерить величину корневого давления.

Еще одним доказательством существования корневого давления и работы нижнего концевое двигателя является *гуттация* — процесс выделения капель жидкости на кончиках листьев через *гидатоды* при высокой влажности воздуха, когда транспирация затруднена. Нередко эти капли принимают за капли росы. В таких условиях подъем воды осуществляется главным образом за счет корневого давления. Явление гуттации особенно характерно для тропиков, где можно попасть под дождь гуттирующих растений.

4.5.2. Транспирация

Одной из главных проблем, с которой растения столкнулись при выходе на сушу, была двойственность их требований к условиям существования в воздушной среде. С одной стороны, атмосфера является источником CO_2 , необходимого для фотосинтеза. Поэтому клеткам, участвующим в фиксации углекислоты, необходим постоянный доступ к атмосферному воздуху. С другой стороны, сухость атмосферного воздуха является причиной обезвоживания растений. Так что растению одновременно приходится отвечать двум противоречащим друг другу требованиям: максимального поглощения CO_2 листовой поверхностью при минимальных потерях воды. По этому поводу даже существует образное выражение, что растение "постоянно мечется между Сциллой голода и Харибдой жажды".

В растительном организме должен существовать тонкий и динамичный механизм регулирования поглощения CO_2 и испарения воды, который бы обеспечивал максимальную продуктивность фотосинтеза при минимальных потерях воды. Процесс испарения воды надземными органами растения называют *транспирацией*. Различают устьичную и кутикулярную транспирацию.

Устьичная транспирация. Транспирация через устьица складывается по крайней мере из четырех процессов:

- передвижение воды из сосудов в клеточные стенки клеток мезофилла;
- испарение с поверхности клеток мезофилла;
- диффузия водяных паров в полости листа;
- выход водяных паров в атмосферу через устьица.

Движущей силой транспирации служит чрезвычайно большой градиент водного потенциала между воздухом атмосферы и воздухом в полости листа (около 100 МПа). Следует также учесть, что диффузия молекул воды в газах много выше, чем в жидкой воде. Потеря воды из воздушных полостей листа стимулирует ее поступление (испарение) из апопласта клеток мезофилла. При этом в апопласте развивается высокое отрицательное гидростатическое давление, которое способствует притоку воды из клеток мезофилла и сосудов ксилемы.

Площадь внутренней поверхности листа обычно на порядок выше площади его наружной поверхности. Вода в межклетниках испаряется со всех открытых участков клеток мезофилла, а затем через устьичную щель поступает в атмосферу. Лист представляет собой насыщенный влагой орган, пронизанный множеством пор, которые сообщаются друг с другом сетью разветвленных воздушных ходов. На солнце такой орган неизбежно теряет много воды. Основное значение в регулировании этого процесса принадлежит устьицам. Закрывание устьиц при недостатке воды может значительно сокращать ее потерю. Несмотря на то, что площадь устьичных отверстий по отношению к поверхности листа составляет всего около 1%, испарение воды через них идет очень интенсивно.

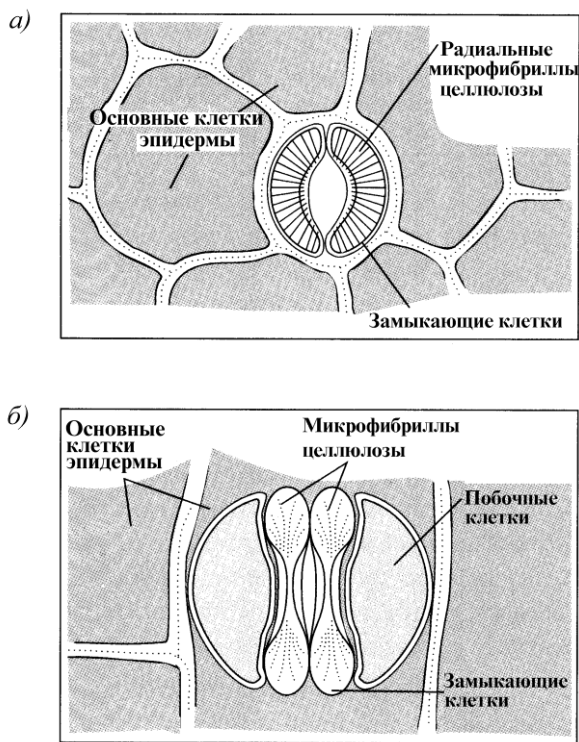


Рис. 4.10. Строение устьиц (Meidner, Mansfield, 1968):
a — почковидные устьица двудольных растений;
б — гантелеобразные устьица злаков

Устьица представляют собой отверстия (щели) в эпидерме, образованные двумя специализированными эпидермальными клетками, которые называют замыкающими (рис. 4.10).

Замыкающие клетки, изменяя свою форму, вызывают открывание или закрывание *устьичной щели*. У многих видов растений вокруг замыкающих клеток расположены так называемые *побочные клетки*. В отличие от основных клеток эпидермы, они способны принимать непосредственное участие в движении устьиц. Устьица можно обнаружить в эпидерме всех надземных органов растения, но больше всего их на листьях. Количество устьиц варьирует в зависимости от возраста листа и условий среды и составляет от 50 до 500 на 1 мм^2 . В листьях устьица могут располагаться или на обеих сторонах, или только на нижней.

Несмотря на все многообразие, замыкающие клетки устьиц можно разделить на два типа. Замыкающие клетки первого типа, имеющие форму серпа с закругленными концами (почковидную форму), встречаются у всех двудольных растений, мхов, папоротников, голосеменных и многих однодольных растений (рис. 4.10, *a*). Клетки второго типа, характерные для травянистых злаков и некоторых других

видов однодольных растений, например пальм, имеют гантелеобразную форму: узкие в средней части и расширенные на обоих концах (рис. 4.10, б).

У ряда растений (например, голосеменных) устьица расположены глубоко в ткани и как бы подвешены к побочным клеткам, которые нависают над ними. Характерной особенностью устьиц хвойных растений является то, что оболочки и замыкающих, и побочных клеток частично лигнифицированы. Нелигнифицированными остаются только тонкие участки, обращенные к устьичной щели.

Отличительной особенностью замыкающих клеток является строение их клеточной стенки. Толщина клеточной стенки устьичных клеток неравномерна и на многих участках гораздо больше, чем у основных клеток эпидермы. У замыкающих клеток почкообразной формы дорсальная клеточная стенка, которая контактирует с эпидермальными клетками, тоньше и более эластичная, чем другие участки. В вентральной части клеток, которые граничат с устьичной щелью, клеточная стенка толще. Эта особенность строения клеточной стенки имеет прямое отношение к их способности изменять форму в ответ на изменение тургорного давления и, таким образом, контролировать величину устьичного отверстия. Важная роль в регуляции формы замыкающих клеток принадлежит также микрофибриллам целлюлозы, радиально ориентированным в клеточной стенке. Они играют роль своеобразных направляющих при движениях устьиц (см. рис. 4.10). Движение двух замыкающих клеток при изменении тургорного давления практически синхронно, поскольку их цитоплазма связана плазмодесмами.

Процесс *открывания устьиц* начинается с поглощения замыкающими клетками осмотически активных соединений, которые вызывают падение осмотического потенциала (Ψ_s) и поток воды внутрь клеток. По мере поступления воды начинает возрастать тургорное давление и размеры клеток. За счет эластичных свойств клеточных стенок замыкающие клетки могут увеличиваться в объеме на 40—100%. Более интенсивное растяжение дорсальных участков клеточной стенки инициирует латеральное смещение ее вентральных участков и открывание щели. *Закрывание устьиц* индуцируется выходом осмотически активных веществ и воды из замыкающих клеток.

Из внешних факторов на устьичные движения самое сильное влияние оказывают свет, уровень CO_2 , влажность и температура воздуха. Однако, несмотря на то, что испарение воды обеспечивает охлаждение организма, эта функция не является жизненно необходимой. При высоких температурах транспирация, как правило, снижается, а не увеличивается, а у произрастающих в жарких условиях САМ-растений на протяжении всего дня устьица закрыты. Исключение составляют гемиксерофиты, которые способны осуществлять фотосинтез при высоких температурах воздуха (см. разд. 4.6).

В механизме открывания устьиц наиболее важную роль играет *синий свет*, а закрывания — фитогормон *абсцизовая кислота* (АБК). Открывание устьиц при освещении синим светом является очень специфической, быстрой и обратимой

реакцией. Закрывание устьиц индуцируется при экзогенной обработке листьев АБК уже через 3—9 мин. При обезвоживании и снижении водного потенциала растений в первую очередь регистрируется резкое повышение уровня АБК и уже после этого — закрывание устьиц. Более подробно о механизмах регулирования движения устьиц синим светом и АБК написано соответственно в *главах 10* и *8*.

Для оценки эффективности использования растениями воды часто применяют *коэффициент транспирации*, который показывает, сколько грамм воды выделяется при фиксации 1 г CO_2 при фотосинтезе. Этот коэффициент сорто- и видоспецифичен и зависит от типа фотосинтеза. У C_3 -растений он варьирует от 200 до 800 г, у C_4 -растений — 200—350 г, а у САМ-растений — 30—150 г.

Кутикулярная транспирация. Кутин. Воска. Суберин. Испарение воды в атмосферу из клеточных стенок эпидермиса листа называют *кутикулярной транспирацией*. При открытых устьицах потери водяного пара через кутикулу листа обычно незначительны по сравнению с общей транспирацией. Однако если устьица закрыты, например во время засухи, кутикулярная транспирация приобретает важное значение в водном режиме растения.

Кутикула является внешним защитным покрытием клеток эпидермиса листьев и молодых стеблей (рис. 4.11). Она защищает растения не только от потери воды, но также представляет собой барьер для бактерий и грибов. В состав кутикулы входят кутин и воска — именно эти гидрофобные соединения уменьшают потерю воды и блокируют проникновение патогенных грибов и бактерий.

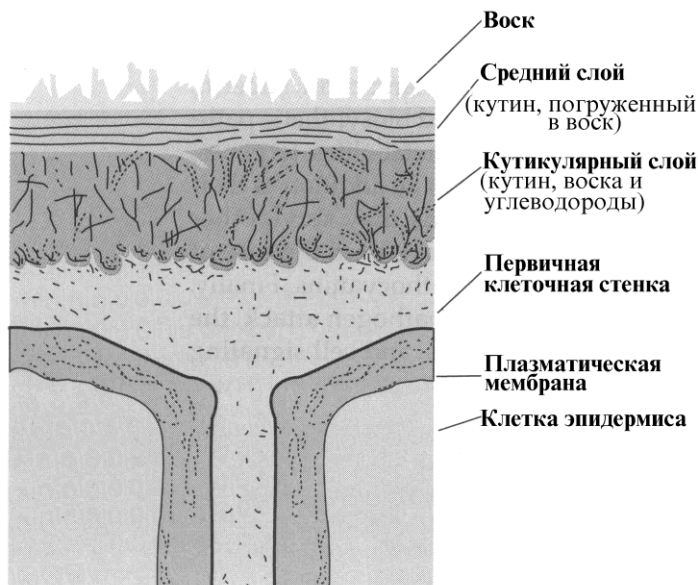


Рис. 4.11. Схематическое изображение структуры кутикулы, покрывающей эпидермальные клетки молодых листьев и побегов (Jeffree, 1996)

Кутин — полимер, состоящий из гидроксигирных кислот, связанных между собой эфирными связями в прочную трехмерную сеть. Эти жирные кислоты могут содержать от 16 до 18 углеродных атомов, а также гидроксильные остатки и одну двойную связь (рис. 4.12).

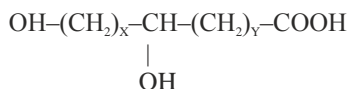
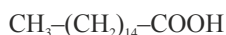
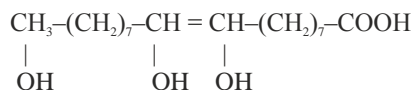
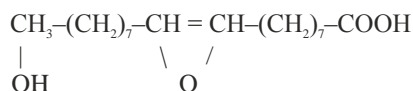
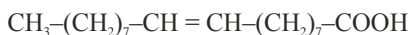
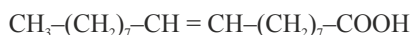
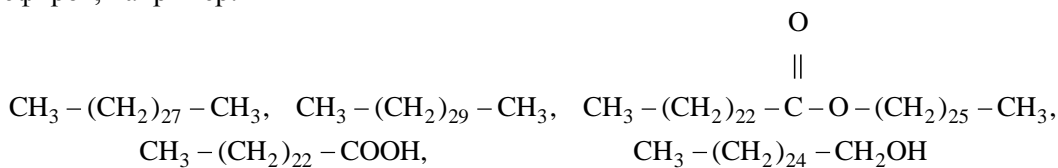
C₁₆-мономеры**C₁₈-мономеры**

Рис. 4.12. Мономеры кутина: X и Y = 5—8

Воска не являются полимерами. Это смесь алканов, жирных кислот и спиртов и их эфиров, например:



Они имеют длинную алкильную цепь (25—35 углеродных атомов) и обладают (как и парафины) высокогидрофобными свойствами. Воска синтезируются в эпидермальных клетках. На поверхности клеток они часто кристаллизуются.

Кутикула представляет собой трехслойную структуру (см. рис. 4.11). Поверхность кутикулы покрыта тонким слоем воска. Ее средний слой, называемый истинным кутинном, состоит из кутина, погруженного в воск. Нижний слой, так называемый кутикулярный, включает кутин, воска и углеводороды, которые смешиваются с элементами клеточной стенки.

Интенсивность кутикулярной транспирации зависит от толщины кутикулы: у молодых листьев с тонкой кутикулой она составляет 50%, а у зрелых листьев с мощной кутикулой — 10% от всей транспирации. В стареющих листьях кутикулярное испарение воды вновь возрастает из-за разрушения и растрескивания кутикулы.

Некоторое количество воды выделяется в результате транспирации почек и репродуктивных органов. Например, корзинки подсолнечника, корбочки мака и плоды перца

транспирируют интенсивнее, чем их листья. Помимо этого вода может испаряться с поверхности ветвей и стволов древесных растений. Интенсивность транспирации через опробковевшие покровные ткани гораздо ниже, чем через кутикулу. Однако в этих тканях имеются рыхло расположенные пробковые клетки — *чечевички*, через которые могут диффундировать пары воды, O_2 и CO_2 . Из-за транспирации ветвей в зимний период часто возникает обезвоживание, приводящее к гибели растений.

Еще одним соединением, имеющим важное значение в водном обмене, является *суберин*. Это компонент клеточных стенок многих клеток растения. Он содержится в поясах Каспари клеток эндодермы корня и входит в состав оболочек клеток феллемы (пробки).

Суберин состоит из жирных кислот, в составе которых имеются гидроксильные и эпокси-группы:



Эти жирные кислоты (так же, как и в кутине) полимеризуются за счет образования эфирных связей. Однако, в отличие от кутина, в состав суберина могут входить дикарбоновые жирные кислоты и фенольные соединения.

Кутин, суберин и ассоциированные с ними воска формируют барьер между растением и средой, защищая его от потери воды и от патогенов. Ткани растений, покрытые кутикулой и суберинизированные, устойчивы к бактериям и грибам. Воска отталкивают воду, что не дает спорам грибов прорасти. Если же некоторым спорам грибов удастся прорасти, они выделяют кутиназу, которая гидролизует кутин и облегчает проникновение гифов грибов в ткани растения.

4.5.3. Передвижение воды по сосудистой системе растения

Главным путем, по которому в растении транспортируются вода и минеральные вещества, являются сосуды ксилемы. Эта ткань включает несколько типов мертвых вытянутых проводящих клеток, контактирующих с живыми паренхимными клетками. Испарение воды в листьях снижает их водный потенциал и вызывает движение воды из ксилемы к клеткам губчатого мезофилла. В результате, в ксилеме происходит снижение давления до величин меньших, чем атмосферное. Вдоль транспирирующего растения устанавливается градиент давления, который инициирует ток воды из почвы в корень и через стебель к испаряющим клеткам листьев.

Вода в растении формирует непрерывный водный континуум, начинающийся от поглощающей поверхности корня и заканчивающийся испаряющей поверхностью листьев. В сосудах ксилемы (от корня до листьев) формируются сплошные водные тяжи, которые, вследствие "присасывающего" действия транспирации, движутся через растение. Между молекулами воды за счет водородных связей возникают большие силы сцепления (когезия). В связи с этим вода в сосудах ксилемы подвергается натяжению от нескольких десятков до нескольких сотен мегапаскалей.

В том случае, когда натяжение водных "нитей" достигает некоторой пороговой величины, в сосуды могут проникать пузырьки воздуха и разрывать столб воды. Это явление называется *эмболией*.

Строение проводящей системы. Основной водопроводящей тканью сосудистых растений является *ксилема*. Пространственно она объединена с *флоэмой*, вместе с которой они образуют непрерывную проводящую систему, проходящую через все органы растения. В зависимости от происхождения и этапа развития различают первичные и вторичные проводящие ткани. Первичные проводящие ткани образуются из прокамбия, вторичные — из камбия. И первичная, и вторичная ксилема, несмотря на ряд гистологических различий, содержат водопроводящие элементы, паренхимные клетки, а также некоторые другие типы клеток, например опорные. Чаще всего свойства этих клеток анализируют на примере вторичной ксилемы древесных растений.

Специализированными клетками ксилемы, выполняющими функцию проведения воды и растворенных в ней веществ, являются *трахеальные элементы*, клетки которых в зрелом состоянии мертвые и имеют вытянутую форму. Для них характерна лигнифицированная, пронизанная порами клеточная стенка.

Существуют два типа трахеальных элементов — *трахеиды* и *членики сосудов* (рис. 4.13). Они отличаются друг от друга тем, что у члеников сосудов имеются перфорации (сквозные отверстия) на каждом конце клетки. У трахеид же таких перфораций нет. В трахеидах передвижение воды из клетки в клетку осуществляется через *поровые мембраны*. По членикам сосудов вода движется свободно через перфорации.

Продольные ряды члеников, связанных перфорациями, чаще называют сосудами. *Сосуды ксилемы* похожи на полые трубки из клеточных стенок, которые расположены одна над другой (рис. 4.13, б). Средняя длина сосудов около 10 см, хотя у некоторых видов они могут простираться почти на всю высоту дерева. Средний диаметр сосудов от 0,3 до 0,5 мм. Перфорированную часть члеников сосудов называют *перфорационной пластинкой* (рис. 4.13, а).

У голосеменных растений функцию транспорта воды выполняют *трахеиды* — остроконечные, вытянутые, мертвые клетки длиной 1—10 см (рис. 4.13). Трахеиды обладают сильно лигнифицированной клеточной стенкой, которая пронизана многочисленными порами. Трахеиды имеются во всех сосудистых растениях. У покрытосеменных растений они чаще встречаются в молодых тканях.

Между соседними трахеальными элементами расположено множество пор, с помощью которых трахеиды и членики сосудов сообщаются между собой. Пory двух смежных клеток обычно располагаются друг против друга. Две противоположащие поры вместе называют *парой пор*. *Пора* представляет собой углубление (отверстие) во вторичной клеточной стенке (рис. 4.14), которое возникает в результате неравномерного отложения ее элементов. Над парой вторичная клеточная стенка фактически прерывается. Каждая пора имеет *поровую камеру*. Обе камеры отделяются друг от друга тонким участком клеточной стенки — замыкающей пленкой поры, или *поровой мембраной*. Замыкающая пленка состоит из первичной клеточной стенки и срединной пластинки.

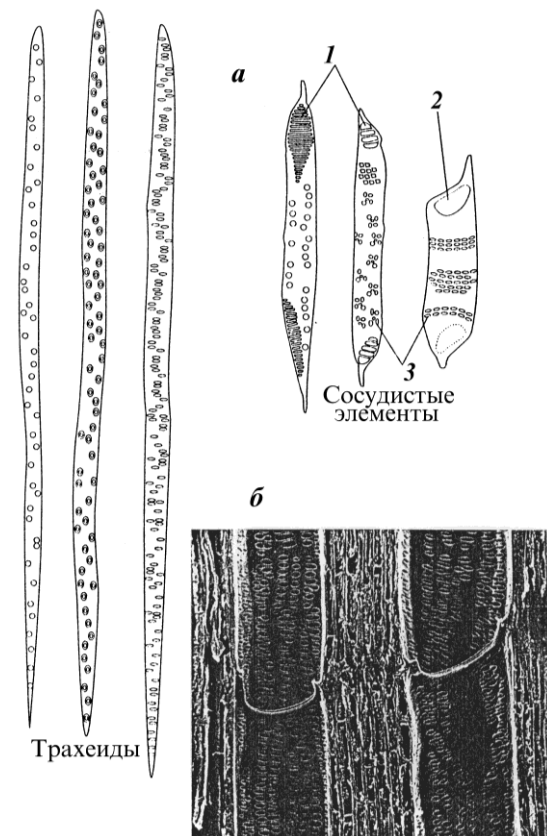


Рис. 4.13. Сосуды ксилемы и трахеиды (Zimmerman, 1983): *а* — схематическое изображение трахеид и членков сосудов ксилемы: 1 — лестничная перфорационная пластинка, 2 — простая перфорационная пластинка, 3 — поры; *б* — сканирующая электронная фотография древесины дуба *Quercus robur*, на которой представлены два сосуда, каждый из которых состоит из двух сосудистых элементов; видны большие поры в клеточной стенке ($\times 420$)

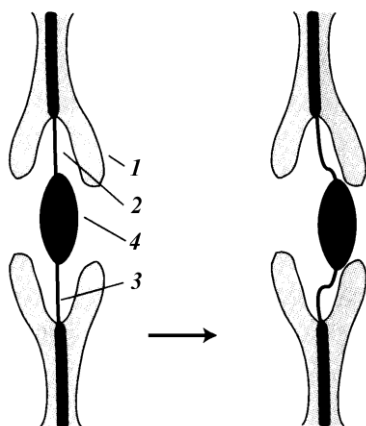


Рис. 4.14. Строение окаймленной поры во время массового потока воды и его блокирования (Эзау, 1980): 1 — окаймление; 2 — полость поры; 3 — замыкающая пленка поры; 4 — торус

Форма, размеры и количество пор сильно варьируют у различных видов растений. Если вторичная клеточная стенка обрывается резко у краев камеры, поры такого типа называются *простыми*. В том случае, когда вторичная клеточная стенка нависает над камерой поры, образуя ее окаймление, поры называют *окаймленными* (см. рис. 4.13). Поровая камера, ограниченная окаймлением, открывается в полость клетки через отверстие в окаймлении — *апертуру поры*.

В трахеидах голосеменных, в особенности у *Pinaceae*, замыкающая пленка, которая разделяет окаймленную пару пор, имеет утолщение, называемое *торусом*. Остальная часть поровой мембраны состоит из микрофибрилл, расположенных радиально от торуса. Так как поровая мембрана эластична, то при определенном давлении торус смещается к одной или другой стороне окаймления, закрывая поровое отверстие, поскольку его размеры больше. В таком положении пора не участвует в проведении веществ и называется *закрытой*. Таким образом, окаймленные поры функционируют как клапаны, предотвращающие поступление воздуха в проводящие трахеиды, который мог бы нарушить непрерывность водяного столба.

Сосуды ксилемы контактируют с паренхимными клетками центрального цилиндра, которые транспортируют ионы в сосуды через поры. Вода и растворенные в ней минеральные вещества попадают в сосуды диффузионным путем. Для некоторых паренхимных клеток характерны многочисленные выросты плазмалеммы, называемые *лабиринтами*, что резко увеличивает площадь обмена. Клетки, активно участвующие в процессе транспорта веществ в сосуды и обратно, называются *передаточными*. Эти клетки могут одновременно граничить и с сосудами ксилемы, и с ситовидными трубками.

Катрин Эзау (Esau, 1980) считала, что в процессе эволюции специализация трахеальных элементов шла преимущественно в направлении разделения механической и проводящих функций. Примером наименее выраженной специализации являются трахеиды, совмещающие и проводящую, и механическую функции. По мере дальнейшего развития в древесине среди проводящих элементов появляются членики сосудов, более эффективные в проведении веществ, чем выполнении механических функций. В противоположность этому волокна эволюционировали, как специализированные опорные элементы. Следовательно, от примитивных трахеид идут два направления специализации: одно — к сосудам, другое — к волокнам.

Однако с появлением сосудов трахеиды не исчезли, а претерпели ряд изменений — они стали короче, но все же не такими короткими, как членики сосудов. В характере поровости стенок появились черты, сближающие их с члениками сосудов; не изменилась существенно лишь их ширина. В ходе эволюции также изменялся и характер поровости боковых стенок сосудов. Межсосудистая поровость, представленная окаймленными, лестнично расположенными парами пор, постепенно сменялась более мелкими окаймленными парами пор, сначала супротивного расположения, а затем очередного.

Движущие силы водного потока в растении. Движущей силой водного потока по сосудам вдоль растения является градиент водного потенциала, который включает

как минимум 4 типа градиентов: осмотического потенциала, гидростатического давления, гравитационного потенциала и концентрации водяных паров (см. рис. 4.7). На рис. 4.15 приведены значения водного потенциала и его компонентов на пути транспорта воды от почвы до атмосферы. Градиенты гидростатического давления регистрируются на границе почвы и корня, а также между ксилемой корня и листа. Значительный перепад осмотического потенциала имеется между почвенным раствором и клетками коры корня, между ксилемой и клетками мезофилла. Из клеток мезофилла в клеточную стенку вода поступает по градиенту концентрации водяных паров, где она испаряется в воздушную полость листа. И наконец, поскольку концентрация водяных паров внутри листа обычно выше, чем в атмосфере, вода по градиенту Δc_{wv} выходит через устьица в атмосферу.

Несмотря на то, что водный потенциал в некоторых частях растения может быть одинаков, его компоненты (Ψ_s , Ψ_p , Ψ_g) могут сильно различаться. Например, водный потенциал клеточной стенки и вакуоли клеток мезофилла равен $-0,8$ МПа. При этом осмотический потенциал клеточной стенки составляет $-0,2$ МПа, а вакуоли — $-1,1$ МПа. Процесс передвижения воды по сосудам ксилемы вверх по растению определяется градиентом гидростатического давления, возникающим в процессе разгрузки ассимилятов, транспортируемых по флоэме (см. рис. 4.15). В листьях водный поток направляется по градиенту осмотического потенциала в сосуды флоэмы, где идет процесс загрузки ассимилятов.

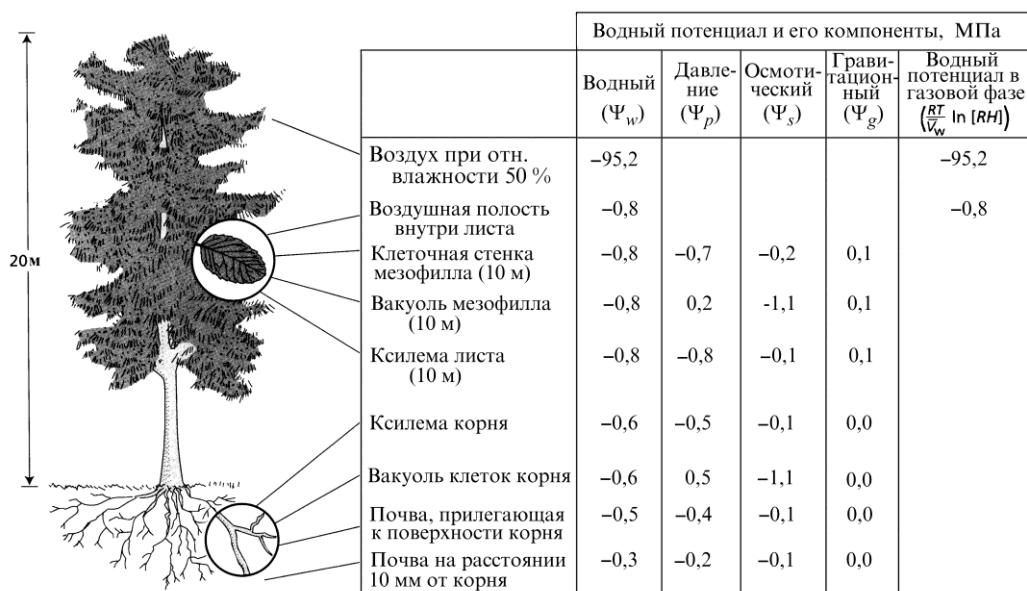


Рис. 4.15. Значения водного потенциала и его компонентов на пути транспорта воды от почвы до атмосферы (Nobel, 1991)

4.6. Водный обмен у растений различных экологических групп

По способности поддерживать водный баланс растительные организмы делятся на пойкилогидридные и гомеогидридные. Гомеогидридные растительные организмы обладают способностью к регуляции водного обмена, а пойкилогидридные такой способностью не обладают.

К *пойкилогидридным растениям* относят некоторые мхи и папоротники, эпифитные и почвенные водоросли, а также некоторые покрытосеменные растения. Для развития этих организмов необходима водная среда или высокая влажность воздуха. Некоторые пойкилогидридные растения приспособились переносить значительное обезвоживание без потери жизнеспособности. Растения, для которых наилучшими условиями является полупогруженный (или полностью погруженный) в воду способ обитания, называют *гидрофитами*.

Гомеогидридные организмы (наземные папоротникообразные, голосеменные, цветковые) способны поддерживать необходимую оводненность растительных тканей, регулируя водный обмен в системе почва—растение—атмосфера. Они обладают устьичной транспирацией, а также корневой системой, обеспечивающей транспорт воды по растению. Их клетки не способны к обратимому высыханию. Даже при значительных изменениях влажности среды у этих растений не наблюдается резких колебаний содержания воды в клетках. По способности адаптироваться в различных условиях обеспеченности водой гомеогидридные растения делят на три экологические группы: ксерофиты, гигрофиты и мезофиты.

Ксерофиты преобладают в местностях с жарким и сухим (аридным) климатом и имеют различные способы адаптации к атмосферной и почвенной засухе. Ксерофиты делятся на эуксерофиты (т. е. настоящие ксерофиты) и гемиксерофиты.

Эуксерофиты приспособились (морфологически и биохимически) сохранять жизненно важные функции при сильном обезвоживании. Они обладают способностью резко сокращать транспирацию в условиях недостатка воды и имеют так называемую ксероморфную структуру, т. е. толстую кутикулу, опушение, уменьшенные размеры листьев и клеток. Их подземные органы, а иногда и стебли покрыты толстым слоем пробки, устьица расположены в углублениях, устьичные щели закупорены восковыми и смолистыми пробочками, листья свернуты в трубочку, где создается свой микроклимат и уменьшается контакт устьичных щелей с атмосферой. Особенно хорошо переносят потерю воды *склерофиты* (растения с жесткими листьями), для которых характерно развитие механических тканей. Облик типичного склерофита легко представить на примере чертополоха — *Carduus crispus* и пустынных полыней, ковылей и саксаулов.

Гемиксерофиты (или полуксерофиты — верблюжья колючка, некоторые виды полыни, шалфей, саксаулы) отличает глубоко проникающая, сильно разветвленная

корневая система, которая позволяет поглощать воду на глубине до нескольких десятков метров. Клетки корня из-за высокой концентрации осмотически активных веществ обладают очень высоким отрицательным водным потенциалом. Растения этой группы обладают хорошо развитой проводящей системой. Для гемиксерофитов характерны тонкие листья с густой сетью жилок и большое количество устьиц, которые они держат открытыми. Благодаря высокой интенсивности транспирации температура листьев значительно понижается, что позволяет им осуществлять фотосинтез при высокой температуре воздуха.

К растениям зоны аридного климата относят также растения, которые запасают влагу — суккуленты и эфемеры (ложные ксерофиты). *Суккуленты* имеют толстые и мясистые стебли, листья часто редуцированы. Различают листовые суккуленты (агавы, алоэ) и стеблевые, у которых листья редуцированы, а наземные части представлены мясистыми стеблями (кактусы, некоторые молочаи). Суккуленты обладают неглубокой, но широко распространяющейся корневой системой. На поверхности суккулентов имеются волоски, толстая кутикула и небольшое число устьиц. Эти растения растут в районах, где засушливые периоды сменяются периодами дождей. Поглощенная суккулентами вода экономно используется и хранится в клетках водоудерживающей ткани (*гидрэнхиме*). У эфемеров стратегия приспособления к аридному климату заключается в том, что они "избегают" дефицита воды за счет ускорения жизненного цикла и использования запасов влаги, накопившейся в почве после весеннего таяния снега или появившейся в период дождей.

Растения-эфемеры (однолетние) и *эфемероиды* (многолетние) самыми первыми развиваются во влажный сезон года в степях и пустынях. Они появляются ранней весной, когда почва еще богата влагой (например, тюльпаны). Эфемеры и эфемероиды проходят очень быстрое развитие до наступления неблагоприятного засушливого периода и избегают таким способом засухи.

Гигрофиты (тонколистные папоротники, кислица, калужница) произрастают в условиях повышенной влажности, низкой освещенности и плохо переносят почвенную и воздушную засуху. Их листья имеют слаборазвитую кутикулу и содержат мало устьиц, которые всегда открыты. Поглощаемая гигрофитами в избытке вода выделяется наружу через гидатоды. При недостатке воды они быстро завядают и гибнут.

Мезофиты по способности регулировать водный режим занимают промежуточное положение между гигрофитами и ксерофитами. Это наземные растения умеренного климата — лиственные деревья, лесные и луговые травы, большинство культурных растений. Обладают тонкими механизмами регуляции устьичной и кутикулярной транспирации. У них хорошо развита корневая система, которая обеспечивает высокое корневое давление.

На рис. 4.16 приведена зависимость ряда физиологических процессов от водного потенциала у различных экологических групп растений — гидрофитов, мезофитов и ксерофитов. Можно видеть, что при уменьшении водного потенциала активизируется накопление АБК и солей растениями. При этом падает интенсивность фотосинтеза и роста клеток растяжением, снижается скорость синтеза белков и элементов клеточной стенки, уменьшается величина устьичной щели.

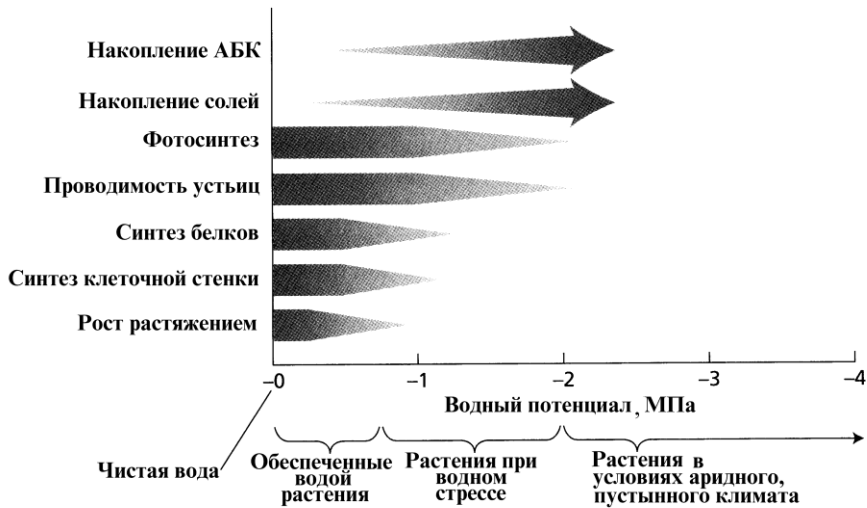
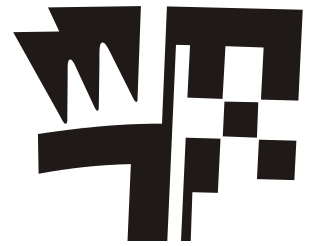


Рис. 4.16. Зависимость ряда физиологических процессов от величины водного потенциала у растений различных экологических групп (Hsiao, 1979)



Глава 5

Мембранный транспорт в растениях

...пока ботаники занимались исключительно формами, химики и физики проникли в заманчивую область растительной жизни и положили основание физиологии растений. Главными своими устоями физиология обязана не ботаникам, а химикам и физикам.

К. А. Тимирязев

Растительные клетки отделены от внешней среды *плазматической мембраной*, через которую клетка получает необходимые элементы питания, информацию обо всех событиях, происходящих за ее пределами, защищается от патогенов и неблагоприятных факторов.

Внутри клетки происходит разделение метаболизма по отдельным органеллам системой *эндомембран*. Во всех этих процессах очень важную роль играют различные мембранные переносчики ионов и органических молекул (рис. 5.1).

5.1. Электрохимический потенциал

Цитоплазма живых клеток заряжена отрицательно по отношению к наружной среде, т. е. существует разность электрических потенциалов, которая может служить движущей силой ионного транспорта. При этом облегчается поступление катионов (в том числе и калия) внутрь клетки и выход из нее анионов. Свободная энергия некоего иона j (и соответственно его передвижение в растворе или через мембрану) определяется величиной его электрохимического потенциала μ_j :

$$u_i = \mu_j^* + RT \ln a_j + z_j FE,$$

где μ_j^* — электрохимический потенциал иона в стандартных условиях; a_j — активность иона; z_j — заряд иона; F — число Фарадея; E — электрический потенциал системы, содержащей данный ион (величина E не является характеристикой иона, а зависит от общего электролитного состава данного участка системы); R — газовая постоянная; T — абсолютная температура. Электрохимический потенциал имеет размерность энергии на единицу количества вещества и обычно выражается в джоулях на моль (Дж/моль).

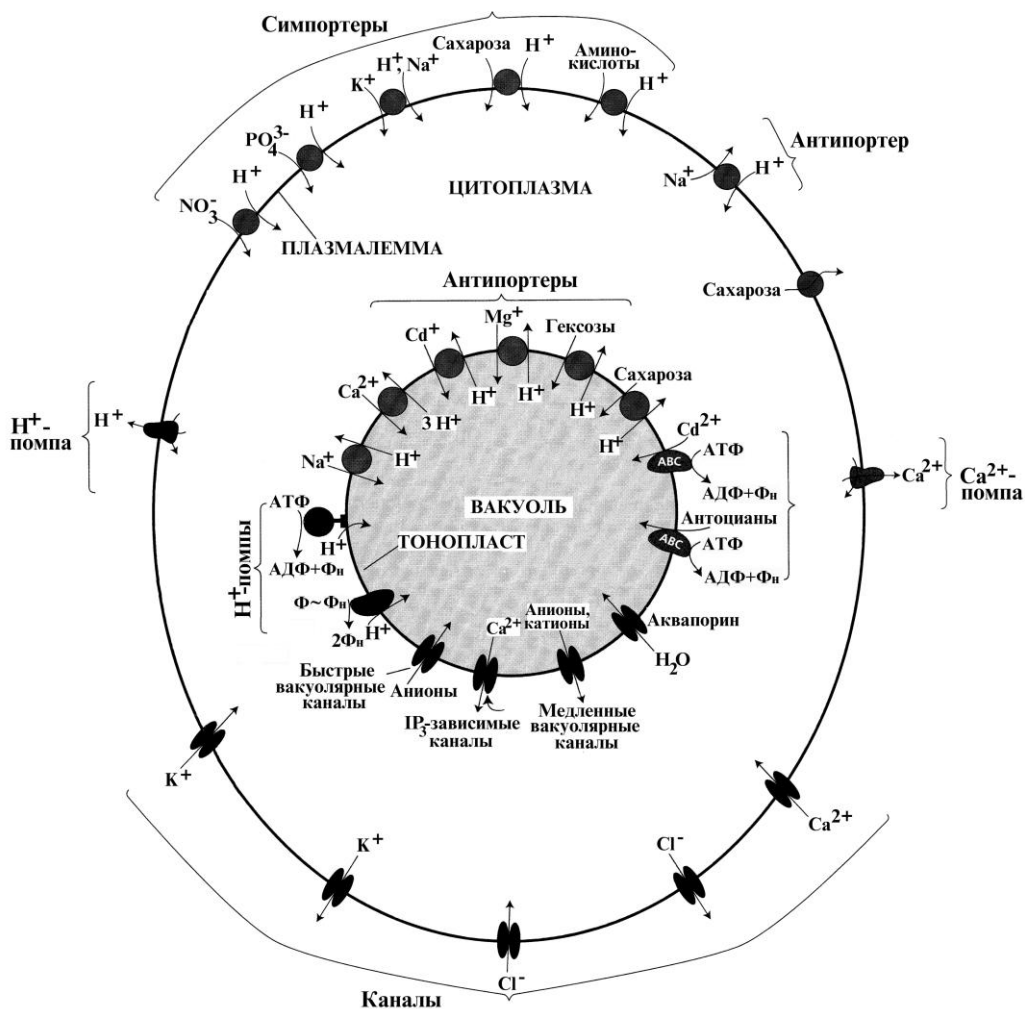


Рис. 5.1. Система мембранного ионного транспорта на плазмалемме и тонопласте растительной клетки (Taiz, Zeiger, 1998)

Активность иона (вещества) a_j связана с его концентрацией c_j через коэффициент активности γ_j :

$$a_j = \gamma_j c_j.$$

Коэффициент активности можно рассматривать как поправочный коэффициент, оценивающий отклонения свойств вещества от его идеального поведения в растворе, поскольку термодинамическая активность иона или нейтральных молекул обычно меньше их концентрации. Для идеальных растворов $\gamma_j = 1$, и активность вещества равна его концентрации (такая ситуация может наблюдаться в случае очень разбавленных водных растворов).

В клетках живых организмов активность ионов обычно выше, чем в наружном растворе; поэтому составляющая $RT \ln a_j$, описывающая вклад активности в электрохимический потенциал, является движущей силой, например для ионов K^+ в сторону внешней среды.

Электрический потенциал системы E в некоторой ее точке используется для описания относительного количества электрической энергии, которой обладает заряженное вещество в этой точке. Электрический потенциал соответствует энергии, необходимой для переноса положительного заряда из этой точки в область нулевого потенциала. Если выразить заряд в кулонах (Кл), а потенциал в вольтах (В), то количество работы (Дж) по переносу равно произведению заряда переносимого иона на разность электрических потенциалов (конечный потенциал минус начальный).

Переносимый ионом j заряд z_j выражается положительным или отрицательным целым числом, которое обозначает количество элементарных электрических зарядов, присущих одному иону. Например, z_j равно $+1$ для катиона K^+ и -2 для сульфат-иона (SO_4^{2-}).

Обычно концентрации, а следовательно, и химические потенциалы большинства ионов в клеточных компартментах неодинаковы. Кроме того, на мембранах, разделяющих клеточные компартменты, поддерживаются градиенты электрических потенциалов. Это является причиной пассивного перемещения ионов в сторону более низкого электрохимического потенциала. Передвижение ионов по градиенту электрохимического потенциала называют *пассивным транспортом*, против градиента — *активным*.

5.2. Виды мембранного транспорта

Можно выделить шесть типов мембранного транспорта ионов:

- первично-активный транспорт;
- вторично-активный транспорт;
- пассивную диффузию;
- облегченную диффузию;
- транспорт через ионные каналы;
- транспорт с помощью ионофоров.

Первично-активный транспорт осуществляется *ионными насосами*, источником энергии для которых служат АТФ, пирофосфат или субстраты, окисляемые в электрон-транспортных цепях митохондрий, хлоропластов и других мембранах.

В ходе *вторично-активного транспорта* процесс переноса веществ через мембрану против градиента его концентрации осуществляется за счет энергии электрохимического градиента протонов или других ионов.

Пассивная (неспецифическая) *диффузия ионов* происходит при появлении в мембране различных гидрофильных пор или при нарушении целостности липидного бислоя. В нормальных условиях транспорт ионов путем *простой диффузии* — процесс маловероятный.

Пассивный перенос ионов через липидный бислой по градиенту их концентрации резко возрастает при появлении в мембране специализированных белков или пептидов, осуществляющих процесс так называемой *облегченной диффузии* или *унипорта*. В основе облегченной диффузии лежит обратимое связывание транспортируемого вещества с белком-переносчиком, который проходит через мембрану с высвобождением иона на другой стороне. Существуют три отличия простой и облегченной диффузии.

Во-первых, при обычной диффузии поток ионов пропорционален их концентрации. Зависимость же скорости транспорта ионов от их концентрации в ходе облегченной диффузии имеет нелинейный характер с выходом на плато, т. е. происходит насыщение. Во-вторых, переносчики, обеспечивающие облегченную диффузию, обладают специфичностью к определенным ионам и селективно транспортируют один вид ионов, но не взаимодействуют с другими. И, в-третьих, процесс облегченной диффузии подавляется специфическими ингибиторами. Путем облегченной диффузии (унипорта) может осуществляться мембранный транспорт многих ионов и низкомолекулярных органических соединений.

Диффузионным (пассивным) путем идет также транспорт ионов через *селективные ионные каналы*, которые обеспечивают быстрое трансмембранное перемещение ионов в направлении градиента их электрохимического потенциала. Особенностью транспорта ионов через каналы является значительное снижение энергетических затрат на перенос иона через мембрану.

По *стереоспецифичности* мембранные транспортеры делят на переносчики и каналы. *Переносчики* связывают свои субстраты с высокой стереоспецифичностью и насыщением при определенной концентрации, выше которой не происходит ускорения транспорта, поскольку все молекулы переносчиков заняты переносимыми субстратами. Процесс мембранного транспорта с участием переносчиков, как и ферментативный катализ, описывается уравнением Михаэлиса—Ментен и имеет характерные V_{\max} и K_M .

Отличительной особенностью *ионных каналов* является то, что в открытом состоянии они обеспечивают относительно постоянный поток ионов в одном направлении при конкретной величине мембранного потенциала и в определенной ионной среде. Большинство каналов состоит из нескольких субъединиц, в то время как многие белки-переносчики — мономеры. Проницаемость единичного канала составляет более сотни ионов в секунду, что на три порядка быстрее, чем транспорт, катализируемый помпами и переносчиками, и на 11 порядков выше, чем простая диффузия ионов через мембрану.

5.3. Первично-активный транспорт ионов. Ионные насосы

Неравновесное распределение ионов между цитоплазмой и внешней средой, цитоплазмой и органеллами лежит в основе ключевых процессов жизнедеятельности клетки. Термин "*ионный насос*" используется для описания различных систем первично-активного транспорта, способных перекачивать ионы против градиента электрохимического потенциала и формировать определенную концентрацию ионов в клеточных компартментах. Большинство ионных насосов для мембранного транспорта использует энергию АТФ или пирогосфата. Первично-активный транспорт ионов в клетках растений осуществляется за счет транспортных АТФаз, пирогосфатаз и АВС-переносчиков. Транспортные АТФазы делят на F-, P- и V-типы. Об АТФазах F-типа, называемых также АТФ-синтазами, которые участвуют в синтезе АТФ на сопрягающих мембранах митохондрий и тилакоидов, уже было рассказано ранее (см. главы 2 и 3).

Активный транспорт ионов может быть электронейтральным или электрогенным. Транспортная система *электронейтральна*, если при ее функционировании происходит обмен внутриклеточных ионов на внеклеточные в эквивалентных количествах. При работе электронейтрального насоса система активного транспорта является лишь средством поддержания концентрационных градиентов ионов и непосредственно не участвует в создании мембранного потенциала клетки. При выключении насоса ингибитором мембранный потенциал будет падать.

В том случае, когда количество зарядов, переносимых в одном направлении в единицу времени, не компенсируется суммой зарядов, переносимых в противоположном направлении, транспортный механизм непосредственно участвует в создании дополнительной разности потенциалов на мембране, т. е. транспорт является *электрогенным*.

5.3.1. Транспортные АТФазы P-типа

Большинство АТФаз P-типа имеет сходное строение, их молекулярная масса лежит в пределах 100 кДа, все они содержат 10 трансмембранных доменов. АТФазы P-типа характеризуются способностью образовывать ковалентный фосфорилированный интермедиат ($E \sim \Phi_n$), участвующий в реакционном цикле. При гидролизе АТФ в процессе функционирования P-типа АТФаз остаток фосфорной кислоты переносится на карбоксильную группу аспартата активного центра и образуется фосфорилированная форма фермента ($E \sim \Phi_n$). Очень эффективным ингибитором АТФаз P-типа является *ванадат*, который способен вместо фосфата специфически связываться с активным центром фермента. АТФ-азы P-типа отличаются друг от друга по чувствительности к любым другим модификаторам, кроме ванадата, который является сильным ингибитором именно этих ферментов. АТФазы P-типа делят на четыре группы: P3A — протонные помпы плазмалеммы, P2A и P2B — кальциевые помпы, P1B — АТФазы, участвующие в транспорте тяжелых металлов.

В геномах арабидопсиса и риса выявлено около 40 генов, кодирующих Р-тип АТФаз. Из них 12 генов кодируют протонные помпы плазмалеммы, 14 — кальциевые помпы, а 7 генов — АТФазы тяжелых металлов. Продукты остальных генов уточняются.

Протонные АТФазы плазматической мембраны. Протонные помпы плазмалеммы (H^+ -АТФаза) играют центральную роль в процессах мембранного транспорта растительной клетки, обеспечивая АТФ-зависимую секрецию ионов H^+ в экстраклеточную среду, что приводит к созданию на плазматической мембране электрохимического градиента ионов H^+ . Работа протонных помп плазмалеммы играет важную роль в поддержании рН цитоплазмы, регуляции роста клеток растяжением, открывании устьиц, загрузке флоэмных окончаний и солеустойчивости. Энергия электрохимического градиента ионов H^+ обеспечивает работу большинства белков-переносчиков, участвующих в процессах вторично-активного транспорта. Поэтому функционирование протонных АТФаз играет важную роль не только в поступлении элементов минерального питания в растение из почвы, но и в обеспечении минеральными ионами каждой клетки растительного организма. В частности высокоспецифичное ($K_M = 10\text{—}30\text{ мкМ}$) поглощение ионов K^+ калиевыми переносчиками может обеспечиваться H^+ -АТФазой плазмалеммы, которая активируется уже микромолярными концентрациями калия во внешней среде. Насыщение H^+ -АТФазы наступает при концентрации ионов K^+ более 200 мкМ. Они способны аккумулировать калий клетками при 100-кратном градиенте его концентрации на мембране.

H^+ -АТФаза представляет собой полипептид молекулярной массой около 100 кДа, который может олигомеризоваться с образованием ди-, тетра- и гексамеров. Строение мономера H^+ -АТФазы показано на рис. 5.2. Протонная АТФаза плазмалеммы содержит 10 трансмембранных доменов (М), автоингибиторный домен на С-конце (R), нуклеотидсвязывающий домен (N), приводной домен (А) и домен, который фосфорилируется в ходе катализа (Р). В геноме арабидопсиса выявлено 12 генов, кодирующих АТФазы плазмалеммы (АНА1—АНА12). Два из них экспрессируются во всех органах, экспрессия остальных ткане- и органоспецифична.

Регуляция активности H^+ -АТФаз чаще осуществляется не на уровне синтеза, а на уровне посттрансляционных модификаций — путем фосфорилирования и дефосфорилирования, а также регуляторными 14-3-3 белками. В неактивном состоянии автоингибиторный домен R подавляет работу фермента. Фосфорилирование предпоследнего остатка треонина на С-конце является триггером для присоединения 14-3-3 белка, что приводит к снятию автоингибирования и активации H^+ -АТФазы. При этом может происходить образование комплекса, состоящего из 6 мономеров H^+ -АТФаз и шести 14-3-3 белков. Процесс формирования комплекса идет следующим образом (рис. 5.3). Вначале происходит формирование димера из двух H^+ -АТФаз, к которым присоединены два 14-3-3 белка. Затем к этому димеру присоединяется еще один и образуется тетрамер. На завершающем этапе после

присоединения к тетрамеру еще одного димера формируется гексамер, структура которого похожа на колесо. При этом 6 мономеров H^+ -АТФаз оказываются на периферии, а шесть 14-3-3 белков — внутри комплекса.

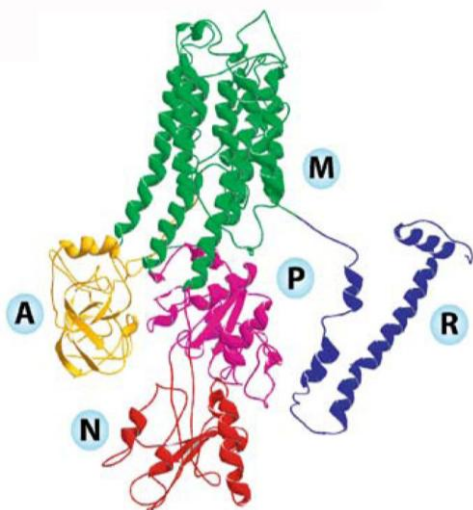


Рис. 5.2. Строение мономера H^+ -АТФазы (Duby, Boutry, 2009)

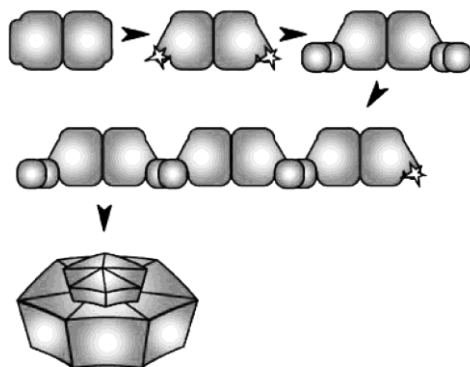


Рис. 5.3. Формирование комплекса, состоящего из 6 мономеров H^+ -АТФаз и шести 14-3-3 белков (Duby, Boutry, 2009)

Ca^{2+} -АТФазы. Система активного транспорта ионов Ca^{2+} необходима для осуществления по крайней мере четырех важных функций растительной клетки: во-первых, пополнения запасов кальция в клеточных компартментах для последующего его высвобождения через Ca -каналы в ходе проведения сигналов; во-вторых, поддержания низкой концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме для формирования пространственно-временных параметров Ca -сигнала; в-третьих, снабжения кальцием биохимических процессов в органеллах клетки; в-четвертых, обеспечения ионами Ca^{2+} межмембранных взаимодействий, например таких, как транспорт везикул, их слияние и секрецию.

Активный транспорт ионов Ca^{2+} обеспечивается Ca -АТФазами и H^+/Ca^{2+} -обменниками (рис. 5.4). Ca^{2+} -АТФазы обладают более высоким сродством к кальцию ($K_M = 0,1—2,0$ мкМ) и меньшей мощностью по сравнению с H^+/Ca^{2+} -обменниками ($K_M = 10—15$ мкМ). Кальциевые АТФазы относятся к суперсемейству АТФаз Р-типа, поскольку в ходе ферментативного мембранного переноса ионов Ca^{2+} образуют фосфорилированный интермедиат ($E \sim F_n$), подавляются ортованадатом и для транспорта ионов используют непосредственно энергию АТФ. В качестве эффективного ингибитора Ca -АТФаз часто применяется также эритрозин Б в концентрации 0,5 мкМ.

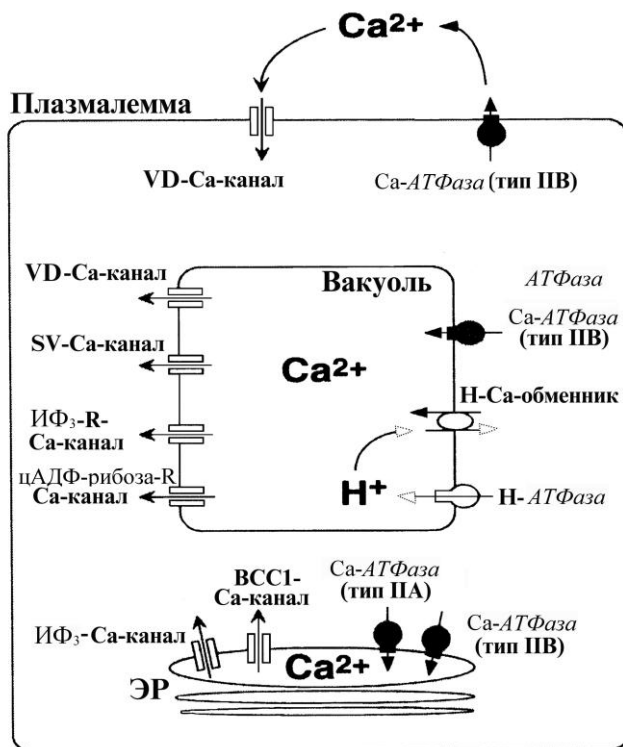


Рис. 5.4. Транспорт ионов Ca^{2+} в растительной клетке (Sze et al., 2000). *Ca-АТФазы*:
тип IIВ — плазмалеммный тип *Ca-АТФаз*, чувствительный к кальмодулину;
тип IIА — *Ca-АТФаза*, не чувствительная к кальмодулину, относящаяся к типу *Ca-АТФаз* эндоплазматического ретикулума. *Ca-каналы*:
VD — потенциалзависимые; **SV** — медленно активируемый вакуолярный;
ИФ₃-R — рецепторуправляемые, активируемые инозитол-1,4,5-трисфосфатом;
цАДФ-рибоза-R — рецепторуправляемый, активируемый циклической АДФ-рибозой;
ВСС1 — потенциалзависимый *Ca-канал* эндоплазматического ретикулума *Brionica dioica*

Основываясь на анализе аминокислотных последовательностей, кальциевые АТФазы растительных клеток (по аналогии с животными) делят на две большие группы: *Ca-помпы плазмалеммного типа* (ПМ-тип) и *Ca-помпы эндоплазматического ретикулума* (ЭР-тип). Эти *Ca-АТФазы* различаются по чувствительности к кальмодулину и циклопиазоновой кислоте.

Основным свойством *Ca-помп* плазмалеммного типа (их называют также *Ca-помпами IIВ-типа*) является активация *Ca*-зависимым белком *кальмодулином*. В отличие от животных, *Ca-помпы* плазмалеммного (IIВ) типа у растений найдены не только в плазмалемме, но и в других мембранах (тонопласт, эндоплазматический ретикулум, другие эндомембраны).

Са-помпы ЭР-типа (называемые также Са-помпами ПА-типа) не чувствительны к кальмодулину и специфически подавляются *циклопиазоновой кислотой* в концентрации менее 0,1 мкМ. Са-АТФазы ПА-типа обнаружены не только в эндоплазматическом ретикулуме, но и в тонопласте и плазмалемме.

На рис. 5.5 приведен возможный порядок укладки полипептидных цепей Са-АТФаз в мембране. В общих чертах строения Са-АТФазы типов ПВ и ПА аналогичны. Они состоят из 10 трансмембранных доменов. Взаиморасположение этих доменов в мембране при их поперечном сечении указано на рис. 5.8, в. С помощью молекулярно-генетического анализа пептидных последовательностей выявлено, что домены 4, 5, 6 и 8 необходимы для передвижения ионов Ca^{2+} через мембрану, а большая центральная петля имеет участки для связывания АТФ и фосфорилирования (Асп-Ф_n). В отличие от ПА-типа, Са-АТФаза ПВ-типа содержит *автоингибиторный домен* (*i*), который служит для взаимодействия с кальмодулином и регулирования, таким образом, активности фермента.

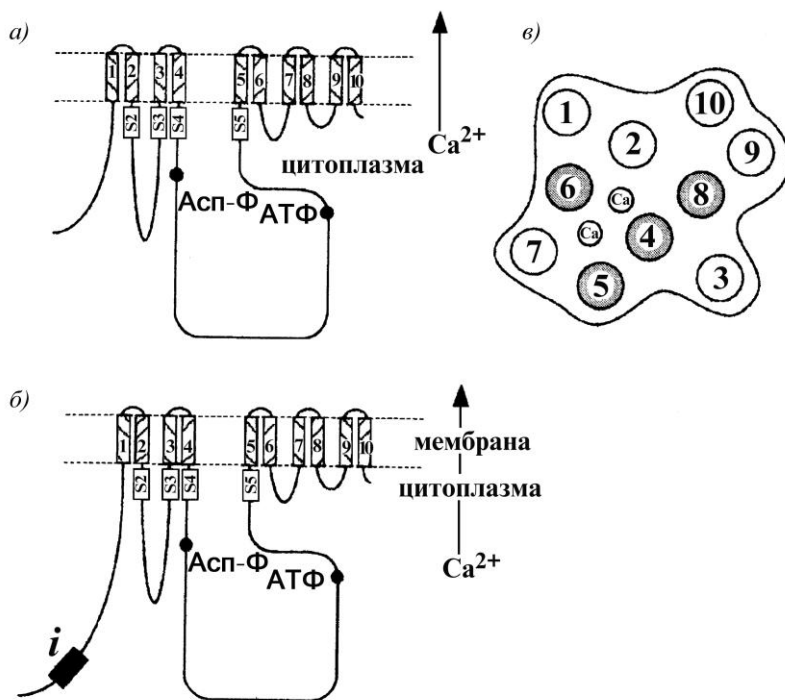


Рис. 5.5. Предполагаемая укладка полипептидных цепей Са-помп в мембране (Sze et al., 2000): *a* — Са-АТФаза ПА-типа; *б* — Са-АТФаза ПВ-типа; *в* — взаиморасположение мембранных доменов Са-АТФазы при их поперечном сечении

P1B-тип транспортных АТФаз — транспортеры тяжелых металлов. Переходные металлы, такие как Fe, Cu, Mn, Zn и Mo, являются обязательными микроэлементами, необходимыми для нормального роста и развития растений. При этом следует иметь в виду, что они могут быть токсичными, если присутствуют в избыточных количествах. Поэтому содержание переходных металлов в растении строго контролируется как на уровне клетки, так и клеточных компартментах за счет системы мембранного транспорта этих металлов. Выявлены десятки белковых переносчиков, обеспечивающих поглощение, распределение и гомеостаз переходных металлов в растениях (Hall, Williams, 2003). К ним относятся белки Nramps (natural resistance-associated macrophage proteins), семейство CDF-белков (cation diffusion facilitator), ZIP-белки (ZRT, IRT-like proteins), катион/ H^+ антипортеры, ABC-переносчики, а также АТФазы — транспортеры тяжелых металлов (HMA, heavy metal ATPases), относящиеся к P1B-типу транспортных АТФаз.

Эволюционно P1B-тип АТФаз представляет собой наиболее древнее семейство ионных помп растений. Структурно они отличаются от других АТФаз P-типа — состоят из 8 трансмембранных доменов, имеют домены для связывания металлов на N- и/или C-конце, а также содержат в шестом трансмембранном домене CPx/SPC мотив (рис. 5.6). Характерный только для P1B-АТФаз CPx/SPC мотив играет очень важную роль в транспорте переходных металлов. Мутации по нему приводят к полной потере транспортной функции АТФаз.

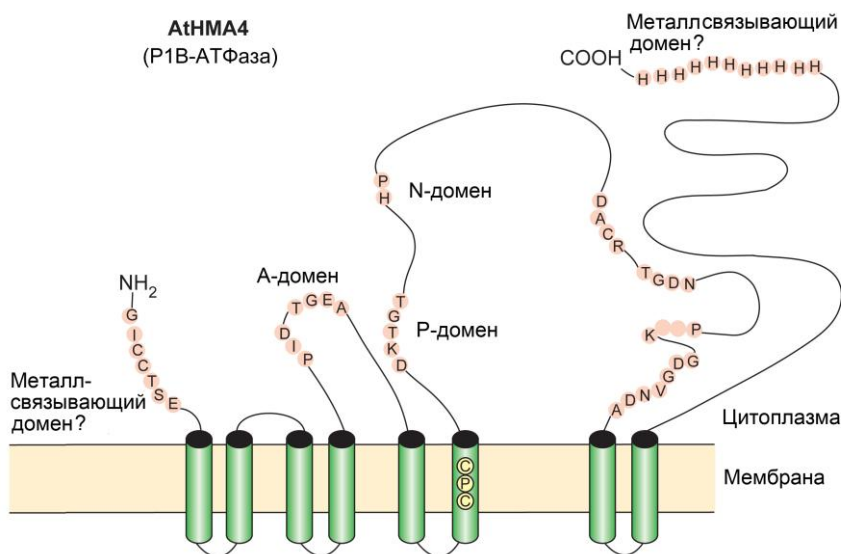


Рис. 5.6. P1B-тип транспортных АТФаз — транспортеры тяжелых металлов (Williams, Mills, 2005)

Помимо этих доменов P1В-тип АТФаз, как и другие Р-АТФазы, содержит нуклеотидсвязывающий N-домен, аспартатсодержащий Р-домен (фосфорилируемый в ходе катализа), а также А-домен, который отвечает за транспорт металлов. У арабидопсиса выявлено восемь P1В-АТФаз (AtHMA1—AtHMA8), которые различаются по своей структуре, функции и способам регулирования. P1В-АТФазы, используя энергию АТФ, активно перемещают через мембраны катионы переходных металлов — Cu, Zn, Cd, Pb и Co, выполняя их доставку к белкам-ферментам и/или обеспечивая детоксикацию цитоплазмы и клеточных органелл.

5.3.2. Протонные АТФазы V-типа

Протонные помпы вакуолярного типа (V-АТФазы, VНА) функционируют не только на вакуолярной мембране, но и на эндомембранах и закачивают протоны не только в вакуоль, но также и внутрь эндоплазматического ретикулума и везикул аппарата Гольджи. АТФазы V-типа блокируются нитратом, бафиломицином А, хаотропными (KSCN) и блокирующими SH-группы реагентами. Ингибитор АТФаз Р-типа ванадат на V-АТФазы не действует. Энергия электрохимического градиента протонов, создаваемая на эндомембранах V-АТФазами, может использоваться для работы переносчиков, обеспечивающих вторично-активный транспорт.

Все V-АТФазы состоят из цитоплазматического комплекса — V_1 , в котором происходит гидролиз АТФ, и интегрального мембранного комплекса V_0 , который отвечает за перемещение протона. На рис. 5.7 показано схематическое строение V-АТФазы.

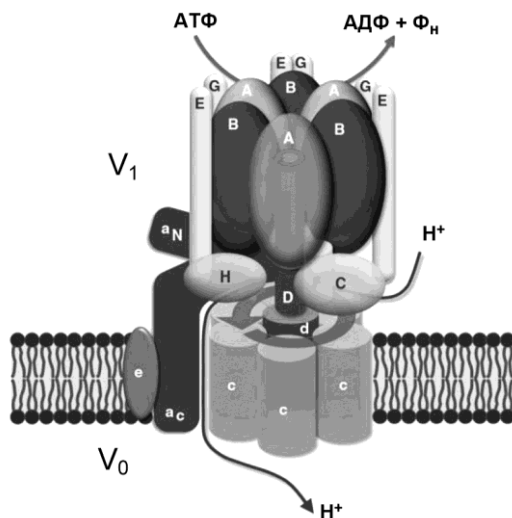


Рис. 5.7. Схематическое строение V-АТФазы (Schumacher, Krebs, 2010)

Комплекс V_0 , молекулярная масса которого около 500 кДа, состоит из 8 типов полипептидов: A (три), B (три), C (один), D (один), E (три), F (один), G (три) и H (один). Каталитический центр, в котором происходит гидролиз АТФ, располагается

на *A* и *B* субъединицах. V_0 -комплекс молекулярной массой около 250 кДа включает субъединицы *a*, *d* и *e*, а также липопротеидное "кольцо", состоящее из одной *c*-субъединицы и пяти *c*-пептидов. Протонный канал формируется между липопротеидным кольцом и *a*-субъединицей. Связь между мембранным (V_0) и цитоплазматическим (V_1) комплексами обеспечивают субъединицы *H*, *C*, *G* и *E*.

На рис. 5.8 приведена так называемая "ротор-статорная" модель V -АТФазы, которая имеет явную аналогию со строением АТФ-синтазного комплекса митохондрий. Механизм транспорта ионов H^+ представляется следующим образом. Через "статор" (субъединицы *H*, *C*, *G* и *E*) каталитическая часть фермента (три *A*- и три *B*-субъединицы) фиксируется в неподвижном состоянии (см. рис. 5.7). При гидролизе АТФ в V_1 -каталитическом комплексе начинается вращение "ротора" (субъединицы *D*, *F*, *d*), который, работая как эксцентрический вал, вращает "кольцо" из *c*-субъединиц против субъединицы *a* V_0 -комплекса, что вызывает передвижение протонов с одной стороны мембраны на другую.

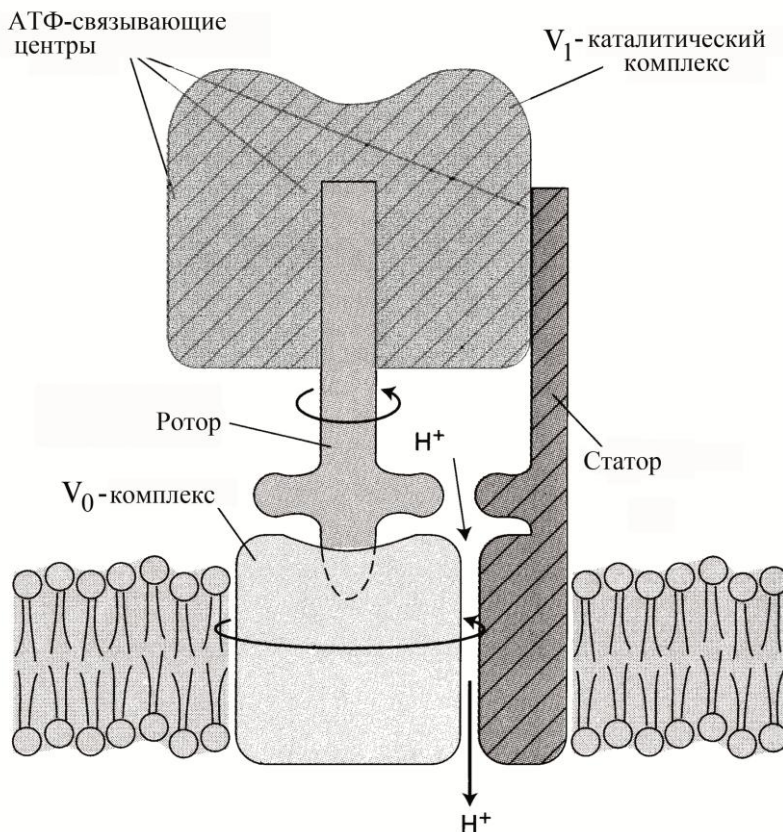


Рис. 5.8. Ротор-статорная модель строения V -АТФазы (Воекета et. al., 1997)

Таким образом, в процессе работы V-АТФазы вначале происходит превращение химической энергии, выделяющейся при гидролизе АТФ, в механическую энергию вращения ротора (*d*, *D* и *F* субъединицы) и "кольца" из *c*-субъединиц, которая трансформируется в энергию электрохимического мембранного градиента ионов H^+ . При гидролизе одной молекулы АТФ через мембрану обычно перемещаются два протона. В последнее время стала появляться информация о том, что V-АТФазы не только обеспечивают энергией процессы вторично-активного транспорта, но также являются очень важными регуляторами процессов эндоцитоза и везикулярной секреции.

5.3.3. Транспортные пирофосфатазы — H^+ -РРазы

H^+ -пирофосфатазы (H^+ -РРазы) представляют собой самые простые первичные протонные помпы. Они найдены у высших растений, а также у некоторых простейших и прокариот. Для мембранного транспорта протонов H^+ -РРазы используют богатую энергией фосфоангидридную связь пирофосфата. У растений имеются два типа H^+ -РРаз, один из которых зависит от уровня ионов K^+ в цитоплазме, а второй — нет. Для функционирования обоих типов H^+ -пирофосфатаз требуются ионы Mg^{2+} , как кофактор. H^+ -пирофосфатазы являются высокогидрофобными белками молекулярной массой около 70—80 кДа, состоят из 16—17 трансмембранных доменов и функционируют чаще, как гомодимеры. Для связывания пирофосфата служит высококонсервативный домен, содержащий аминокислотную последовательность — DVGADLVGKVE (рис. 5.9).

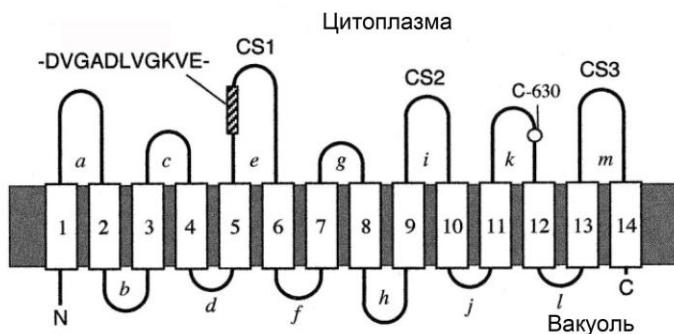


Рис. 5.9. Модель строения транспортной пирофосфатазы (Maeshima, 2000):

1—14 — четырнадцать трансмембранных гидрофобных доменов;

a—m — гидрофильные участки; CS1, CS2, CS3 — консервативные сегменты, находящиеся в цитоплазме; C-630 — остаток цистеина, связывающий N-этилмалеимид,

DVGADLVGKVE — консервативный домен для связывания пирофосфата

H^+ -РРазы катализируют электрогенный транспорт протона из цитозоля в вакуоль, эндоплазматический ретикулум, цистерны аппарата Гольджи, создавая на эндомембранах электрохимический градиент ионов H^+ . Эта энергия используется в процессе вторичного активного транспорта ионов и органических молекул. На долю H^+ -РРаз приходится от 1 до 10% белков тонопласта, поэтому H^+ -РРазы способны создавать почти такой же, как и V-АТФазы, градиент протонов на вакуолярной мембране.

H^+ -пирофосфатазы обеспечивают поддержание рН-гомеостаза в отделенных эндомембранами клеточных компартментах, играют важную роль в эндоцитозе и везикулярной секреции, а также в процессах роста и развития. Уровень и активность H^+ -РРаз возрастает в формирующихся молодых плодах, что, по-видимому, связано с активацией притока ауксина. Показано, что мутация *avp1* (*arabidopsis vacuolar H^+ -pyrophosphatases1*) приводит к падению уровня белков-переносчиков ауксина PIN1 и значительному торможению полярного транспорта ИУК в корневой системе (Li et al., 2005). При этом у мутантов *avp1* также снижается активность H^+ -АТФаз Р-типа, что вызывает увеличение рН в апопласте. Сверхэкспрессия генов *AVP1* приводила к противоположному эффекту — снижению рН апопласта, но не влияла на уровень PIN1.

5.3.4. АВС-переносчики

В последние годы все большее внимание исследователей, занимающихся изучением процессов мембранного транспорта, привлекает большая группа белков с очень широким диапазоном транспортных функций, называемых *АВС-переносчиками* (АТР-binding cassette). АВС-переносчики представляют собой особое суперсемейство систем активного транспорта, найденное у архей, эубактерий и практически всех эукариотических организмов. Большинство АВС-белков являются помпами, некоторые обладают рядом свойств, присущих ионным каналам, или белков, способных модулировать работу каналов и других ионных помп. Часть из них не обладает транспортными функциями. АВС-переносчики осуществляют мембранный транспорт пептидов, аминокислот, сахаров, липидов, ионов металлов, полисахаридов, вторичных соединений, неорганических кислот и конъюгатов трипептида глутатиона. АВС-переносчики обеспечивают активные потоки вышеперечисленных веществ как в экстраклеточное пространство, так во внутриклеточные компартменты. Многие АВС-транспортёры относительно специфичны, однако имеются и такие, которые способны транспортировать различные химические соединения. У арабидопсиса и риса выявлено более чем 120 АВС-белков. В растениях этот тип переносчиков функционирует на плазматической мембране, тонопласте, мембранах митохондрий и хлоропластов.

АВС-транспортёры являются крупными белками с молекулярной массой около 150 кДа. Большинство из них содержит (рис. 5.10) два локализованных в цитоплазме нуклеотидсвязывающих домена и два высокогидрофобных мембранных домена.

У большинства АВС-транспортеров мембранный домен состоит из 6 трансмембранных α -спиралей и формирует специфичный "канал" (пору), по которому субстраты пересекают мембрану. Нуклеотидсвязывающие домены обеспечивают сопряжение процессов гидролиза АТФ и транспорта веществ. Свое название АВС-белки получили именно из-за наличия нуклеотидсвязывающих участков (ATP-binding cassette), называемых также АВС-доменами (ATP cassette domains). У большинства АВС-белков каждый нуклеотидсвязывающий домен включает около 200 аминокислотных остатков и содержит три консервативных аминокислотных последовательности: бокс Walker A, бокс Walker B и АВС-мотив.

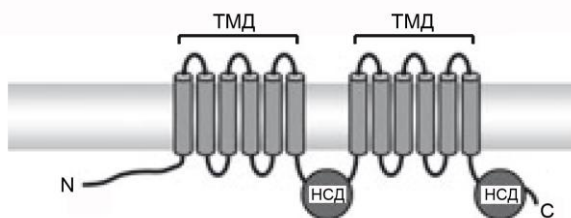


Рис. 5.10. Схематическое строение АВС-переносчика (Wanke, Kolukisaoglu, 2010): ТМД — трансмембранные домены; НСД — нуклеотидсвязывающий домен

Имеются три главные особенности мембранного транспорта, опосредованного АВС-белками. Во-первых, для него необходима Mg-АТФ. Во-вторых, работа АВС-транспортеров нечувствительна к электрохимическому градиенту ионов H^+ , и протонфоры или ионофоры на него не влияют. И в-третьих, этот тип транспорта сильно подавляется ванадатом, который, связываясь с каталитическим центром, блокирует гидролиз АТФ и транспортную активность АВС-белка.

Классификация АВС-переносчиков зависит от их строения и транспортируемых субстратов. Ранее у растений выделяли 13 подсемейств АВС-белков (Rea, 2007). К ним относили следующие АВС-белки: MDR (multidrug resistance), MRP (multi-drug resistance-associated protein), PDR (pleiotropic drug resistance protein), PMP (peroxisomal membrane protein), ATM (ABC transporter of the mitochondrion), NAP, (non-intrinsic ABC protein), PGP (P-glycoprotein) и др. С 2008 г. для унификации номенклатуры АВС-белков животных и растений используется новая классификация этих переносчиков, согласно которой все АВС-транспортеры эукариот делят на 7 групп (ABCA—ABCG) и одну специфичную для растений группу — ABCI (Verrier et al., 2008).

Говоря о функциях АВС-переносчиков в растениях, хотелось бы привести высказывание проф. П. Риа (P. Rea, 2007) из Пенсильванского университета (США), который считает, что "у растительных организмов трудно найти процесс, в котором не участвовал хотя бы один АВС-белок". АВС-белки могут транспортировать

фенольные соединения и алкалоиды, терпеноиды и воска, стероиды и продукты распада хлорофиллов, гербициды и тяжелые металлы. АВС-переносчики участвуют в полярном транспорте ауксина, катаболизме липидов, устойчивости к болезням, работе устьиц и детоксикации липофильных ксенобиотиков.

Процесс детоксикации обычно включает три этапа — активацию, конъюгацию и компартментацию ксенобиотиков. Первый этап связан с их гидролизом (эстеразами или амидазами) или окислением (например, системой цитохрома P₄₅₀). На втором этапе ксенобиотики или их активные метаболиты образуют конъюгаты с такими эндогенными гидрофильными веществами, как глюкоза или глутатион. На третьем этапе неактивные водорастворимые конъюгаты транспортируются АВС-переносчиками из цитоплазмы в вакуоль.

5.4. Вторично-активный транспорт

Вторично-активным (сопряженным) *транспортом* называют процесс переноса через мембрану ионов и органических соединений против градиента их концентрации за счет энергии электрохимического градиента других ионов. У растений для этой цели чаще всего используется электрохимический градиент ионов водорода, создаваемый различными H⁺-насосами. Сопряженный транспорт может осуществляться в режиме *симпорта* (протон и переносимое вещество переносятся через мембрану в одном направлении) или *антипорта* (протон и вещества транспортируются в противоположных направлениях) (рис. 5.11).

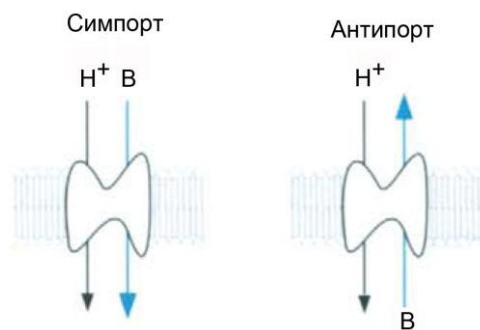


Рис. 5.11. Сопряженный транспорт вещества в режиме симпорта и антипорта

В режиме вторично-активного транспорта через клеточные мембраны переносится большинство элементов минерального питания и низкомолекулярных органических соединений. Вторично-активный транспорт обеспечивает мембранный перенос моносахаридов, аминокислот, пептидов, анионов и ряда катионов. В плазматической мембране растительных клеток найдены симпортеры, которые переносят сахарозу, аминокислоты и такие анионы, как фосфат, нитрат и сульфат, а также антипортеры для ионов K⁺ и Na⁺ (см. рис. 5.1). В тонопласте выявлены "вторично-активные" переносчики для сахарозы, ионов Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ и Cd²⁺.

5.4.1. Переносчики катионов

Мембранный транспорт большинства катионов у растений осуществляется за счет энергии электрохимического градиента ионов H^+ . Таким путем в растительную клетку могут транспортироваться такие катионы, как K^+ , NH_4^+ , Na^+ , Ca^{2+} и Mg^{2+} .

Переносчики ионов K^+ делят на три группы (Gierth, Maser, 2007). К первой группе относят *высокоспецифичные калиевые транспортеры НКТ* (high-affinity K^+ -transporters), вторая группа включает селективные *K^+ -поглощающие пермеазы КТ/КУР/НАК* (K^+ -transporter/ K^+ -uptake permeases/high-affinity K^+ uptake mechanism), а третья — менее специфичные *антипорттеры для одновалентных катионов СРА* (cation/proton antiporters).

НКТ-переносчики по своему строению похожи на K^+ -каналы и состоят из восьми трансмембранных и четырех Р-доменов, формирующих селективную пору. В отличие от K^+ -каналов, НКТ-транспортеры функционируют в виде мономеров.

КТ/КУР/НАК-транспортеры вначале были выявлены у бактерий (КУР) и грибов (НАК), а затем и у растений (КТ). Этот тип переносчиков обладает высоким сродством к ионам K^+ , включает от 10 до 14 трансмембранных доменов, но не содержит порообразующих Р-доменов (рис. 5.12).

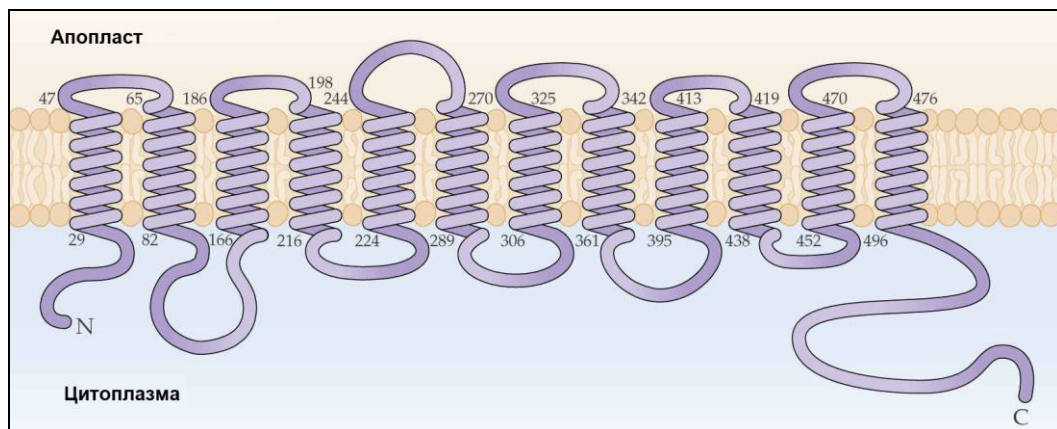


Рис. 5.12. Схематическое строение КТ/КУР/НАК-транспортеров (Kim et al., 1998)

Мембранные потоки NH_4^+/NH_3 обеспечивают интегральные мембранные белки-переносчики *АМТ* (ammonium transporter). Активность этих переносчиков пропорциональна мембранному градиенту ионов H^+ , подавляется протонофорами и ингибиторами H^+ -АТФаз. Следует отметить, что АМТ обеспечивают приток ионов NH_4^+ в клетки корневой системы, транспорт же аммония через тонопласт в вакуоль, в основном, обеспечивается ТИР2-аквапоринами (рис. 5.13). Важную роль в оттоке

восстановленных форм азота, образуемого в процессе азотфиксации клубеньковых бактерий, играют $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ -переносчики перибактеродной мембраны. Экспрессия генов, кодирующих AtAMT1, выявлена в корнях и листьях арабидопсиса, что свидетельствует о том, что эти переносчики обеспечивают не только поглощение аммония из почвы, но также могут участвовать в мембранном транспорте ионов NH_4^+ в клетках надземной части растения.

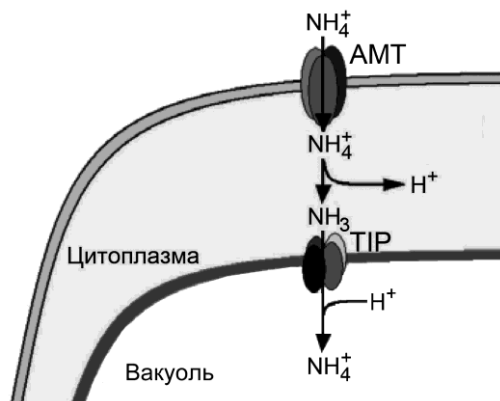


Рис. 5.13. Транспорт ионов NH_4^+ с помощью белков-переносчиков AMT и TIP2-аквапорины (Ludewig et al., 2007)

Наиболее важным элементом системы мембранного транспорта натрия у гликофитов являются Na^+/H^+ -обменники, один из которых — SOS (salt overly sensitive) служит для выкачивания натрия в апопласт, а второй — NHX (Na^+/H^+ -exchanger) обеспечивает закачивание избытка ионов Na^+ в вакуоль (рис. 5.14). Именно эти два антипортера обеспечивают поддержание необходимого уровня ионов Na^+ в цитоплазме в условиях засоления. Показано, что сверхэкспрессия NHX повышает устойчивость к засолению томатов, рапса, риса, кукурузы, пшеницы, хлопчатника, табака и сахарной свеклы (Kronzucker, Britto, 2011).

Активный транспорт ионов Ca^{2+} в клетках растений обеспечивают не только Ca-АТФазы, но и $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменники, которые обладают относительно низким сродством к ионам Ca^{2+} ($K_M = 10\text{—}15\ \mu\text{M}$), но большой мощностью. В тонопласте выявлены два типа ионных обменников (СAX, Ca^{2+} -exchanger), способных к вторично-активному транспорту кальция (рис. 5.15).

СAX1 обладает высокой специфичностью к ионам Ca^{2+} , а СAX2 — более низкой и транспортирует не только кальций, но и другие двухвалентные металлы. Обычно они активируются при резком возрастании содержания кальция в цитоплазме. Активность $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -антипортера наиболее высока на вакуолярной мем-

бране, хотя он обнаружен также и в плазмалемме. Поскольку протонный градиент на вакуолярной мембране формируется в результате работы V-АТФазы, сопряженный $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -транспорт на тонопласте может быть легко выявлен из-за его чувствительности к специфическому ингибитору V-АТФаз бафиломицину или протонофорам. Стехиометрия сопряженного $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -транспорта обычно составляет 3:1.



Рис. 5.14. Транспорт ионов Na^+ в растительных клетках с помощью переносчиков SOS1 и NHX1 (Kronzucker, Britto, 2011)

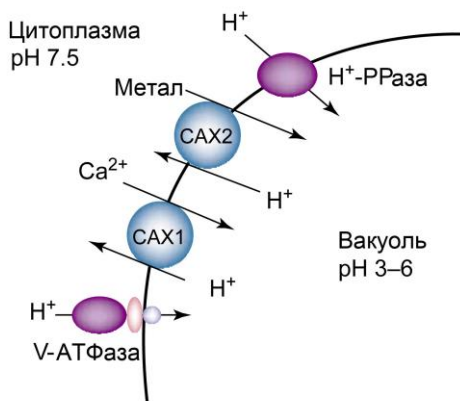


Рис. 5.15. Вторично-активный транспорт металлов (Hirschi, 2001):
CAX1 и CAX2 — H^+ /металл-ионные обменники;
V-АТФаза — вакуолярная АТФаза;
 H^+ -PPаза — транспортная пиррофосфатаза

5.4.2. Анионные переносчики

Мембранный транспорт большинства анионов в растительных клетках осуществляется вторично-активным путем за счет энергии трансмембранного градиента ионов H^+ , создаваемого протонными насосами. Поглощение анионов осуществляется в симпорте с протоном. Таким путем в растительную клетку поступают фосфат, нитрат и сульфат.

Поглощение фосфата клетками идет за счет электрохимического градиента ионов H^+ . Фосфатные симпортеры сгруппированы в три семейства — Pht1, Pht2 и Pht3. Переносчики Pht1 и Pht2 локализованы, соответственно, в плазматической мембране и во внутренней мембране хлоропластов. Белок Pht3 выполняет функции фосфатного транспортера в митохондриях и в плазматической мембране микоризообразующих грибов. На рис. 5.16 показано доменное строение белка Pht1. Как и все фосфатные транспортеры, он содержит 12 трансмембранных доменов, разделенных пополам большой цитоплазматической петлей. В четвертом трансмембранном домене имеется консервативная аминокислотная последовательность GGDYPLSATIxSE, характерная только для фосфатных переносчиков. Имеются участки фосфорилирования (P), гликозилирования (G) и миристилирования (M). Мембранные переносчики фосфата обеспечивают как высоко-, так и низкоаффинный транспорт фосфата в растительную клетку. Высокоаффинные транспортеры закачивают Φ_H в клетку из внешней среды, где его уровень составляет 1—10 мкМ. K_M для низкоаффинных фосфатных симпортеров составляет 0,4 мМ.

Нитратные переносчики, обеспечивающие поступление нитрата в растительную клетку, представлены *NRT1* и *NRT2* (nitrate transporters). При этом *NRT1* обеспечивает, по-видимому, низкоаффинный, а *NRT2* высокоаффинный транспорт нитрата. У растений арабидопсиса выявлено более 50 генов, кодирующих *NRT1*, и 7 генов — *NRT2*-белки. Оба типа нитратных переносчиков состоят из 450—600 аминокислотных остатков и включают 12 трансмембранных доменов.

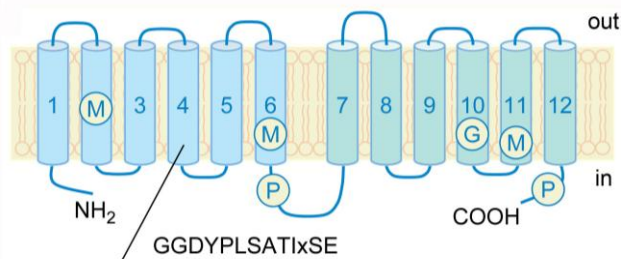


Рис. 5.16. Схематическое строение фосфатного транспортера Pht1 (Karandashov, Bucher, 2005). Показаны участки миристилирования (M), фосфорилирования (P) и гликозилирования (G). GGDYPLSATIxSE — консервативная последовательность, характерная для мембранных переносчиков фосфата

Во всех царствах живых организмов, от архей и бактерий до растений и животных, обнаружены анионные переносчики, которые получили название *CLC* (chloride channel). Этот тип мембранных транспортеров был назван по потенциалзависимым хлоридным каналам (*CLC-0*), впервые выявленным у электрического ската. Однако детальные исследования показали, что как Cl^- -каналы эти переносчики функционируют только в плазматической мембране, а на эндомембранах животных клеток они работают, как электрогенные ($2\text{Cl}^-/\text{H}^+$) антипортеры. Когда же стали выяснять роль *CLC*-генов в растениях, то оказалось, что они кодируют белки, которые функционируют только как нитрат/протонные антипортеры (рис. 5.17).

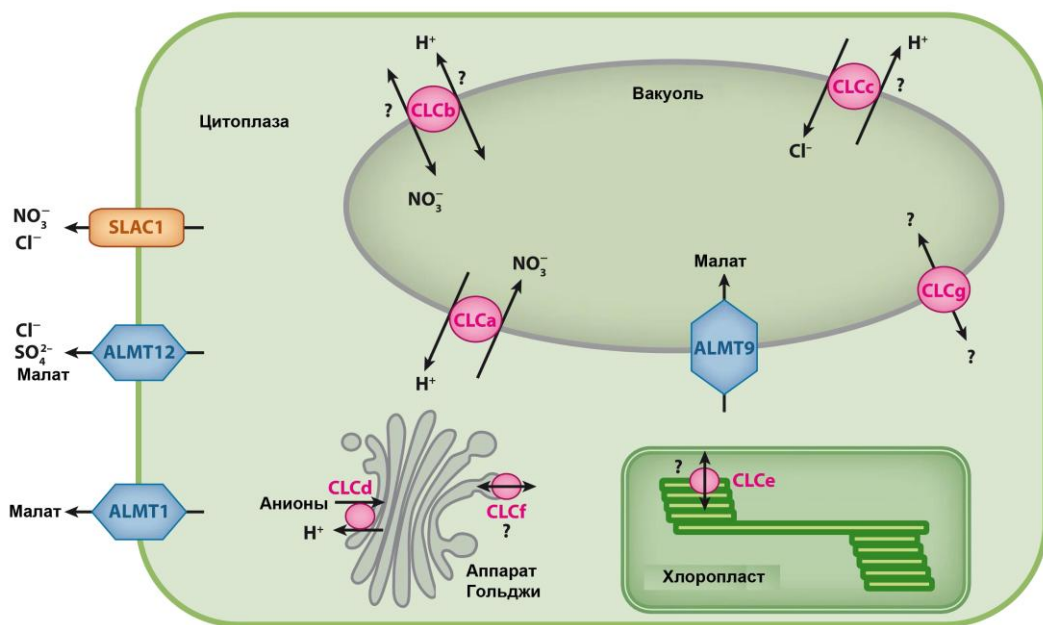


Рис. 5.17. Анионные переносчики арабидопсиса (Barbier-Brygoo et al., 2011): *CLC* — нитрат/протонные антипортеры; *SLAC* и *ALMT* — анионные каналы

У арабидопсиса выявлен кодируемый геном *AtCLCa* переносчик, который осуществляет селективный транспорт нитрата по сравнению с хлоридом. Показано, что *AtCLCa* локализован на тонопласте и функционирует как электрогенный NO_3^-/H^+ -антипортер, транспортирующий нитрат и протоны в соотношении 2 : 1 (De Angeli et al., 2007). Именно этот NO_3^-/H^+ -антипортер способствует накоплению до 50% нитратов в вакуоли. Помимо *AtCLCa* на эндомембранах растительных клеток были выявлены шесть других *CLC*-переносчиков: *AtCLCb*, *AtCLCc* и *AtCLCg* — в тонопласте, *AtCLCd* и *AtCLCf* — в везикулах аппарата Гольджи, *AtCLCe* — в тилакоидных мембранах (рис. 5.17).

H^+ /сульфатные транспортеры (SULTR) по своему строению и свойствам могут быть разделены на несколько групп (Rouached et al., 2009). Первая группа включает локализованные в клетках корней переносчики SULTR1;1 и SULTR1;2, которые обладают очень высоким сродством к сульфату и обеспечивают самые первые этапы поглощения сульфата растением из почвы. Вторая группа белков, например SULTR2;1, отвечает за перемещение сульфата от корней к побегам. Третья группа сульфатных переносчиков локализована в листьях и способствует процессам загрузки сульфата во флоэму (SULTR3;1). Переносчики, которые относят к четвертой группе — SULTR4;1 и SULTR4;2, обеспечивают потоки сульфата из вакуоли в цитоплазму.

5.4.3. Переносчики аминокислот и углеводов

Транспорт большинства аминокислот идет вторично-активным путем. Растения обладают множеством транспортеров (пермеаз) аминокислот, которые отличаются свойствами и механизмами регуляции, обладают различной субстратной и тканевой специфичностью (Williams, Miller, 2001). Выделяют два основных семейства H^+ /аминокислотных переносчиков: APC (amino acid, polyamine, and choline transporter) и AAAP (amino acid/auxin permease). В свою очередь, семейство APC подразделяется на две подгруппы переносчиков: CATs (cationic amino acid transporters) и GABA (4- γ -aminobutyric acid).

Мембранный транспорт сахарозы у растительных организмов обеспечивают H^+ /сахарозные переносчики, называемые SUC- или SUT-белками (sucrose transporter). Они функционируют, например, в клетках-спутниках (см. разд. 2.8.2, рис. 2.35). Транспорт моносахаридов осуществляет семейство переносчиков, называемых STPs (sugar transport proteins). В геноме арабидопсиса выявлено около 60 генов, кодирующих различные изоформы STP (Buttner, 2010). Более 10 из этих белков локализованы в плазматической мембране и обеспечивают поступление моносахаридов в клетку, остальные же функционируют на внутриклеточных мембранах.

5.5. Ионные каналы растений

Впервые наличие ионных каналов предсказали в 1952 г. английские физиологи А. Ходжкин (A. L. Hodgkin) и Э. Хаксли (A. F. Huxley) на основе математического анализа ионных потоков K^+ и Na^+ , возникающих в ходе проведения нервного импульса. Они предположили, что ионные токи идут только через определенные участки мембраны, так называемые *active patches*. Позднее в этих участках действительно были обнаружены потенциалзависимые Na- и K-каналы. В 1963 г. А. Ходжкин, А. Хаксли и Дж. Экклс (J. Eccles) получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине за раскрытие механизма проведения нервного импульса.

У растительных организмов ионные каналы принимают участие в рецепции и амплификации гормональных и стрессовых сигналов, являются необходимым элементом в регуляции водного обмена, дыхания, фотосинтеза и ростовых процессов. Многие макроэлементы и большинство микроэлементов представлены в форме катионов. Высокий отрицательный электрический потенциал на внутренней стороне плазматической мембраны и положительный заряд катионов обеспечивают возможность пассивного поступления этих катионов в растительную клетку по градиенту электрохимического потенциала через ионные каналы.

5.5.1. Строение и функционирование ионных каналов

Ионные каналы формируются интегральными белками, которые пронизывают мембрану таким образом, что в ней образуется гидрофильная пора (рис. 5.18). При этом гидрофильные аминокислоты выстилают стенки поры, а гидрофобные — контактируют с липидной фазой мембраны. В отличие от облегченной диффузии, транспорт ионов через каналы представляет собой процесс, который идет без насыщения и с более высокой скоростью. Особенностью транспорта ионов через каналы является их односторонняя проницаемость.

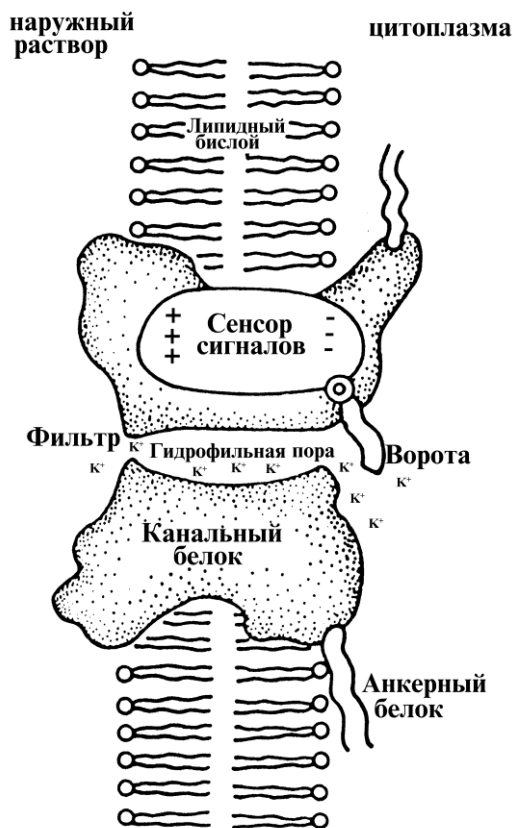


Рис. 5.18. Функциональная модель ионного канала (Satter, Moran, 1988)

Ионные каналы классифицируются по селективности к различным ионам, принципу управления воротным механизмом и локализации. Каналы способны избирательно открываться (или закрываться) при изменении мембранного потенциала, а также при гормональных, механических, осмотических и других воздействиях. Ионные каналы присутствуют в плазматической мембране и мембранах клеточных органелл.

Переход канала в открытое состояние осуществляется с помощью *воротного механизма (ворот)*. Открывание и закрывание воротного механизма является результатом конформационных изменений белка. Открывание и закрывание ионных каналов регулируется мембранным потенциалом, ионами Ca^{2+} , рН, фосфорилированием. В случае потенциалзависимых каналов открывание ворот происходит при изменении мембранного потенциала. При открывании ионного канала регистрируется резкое возрастание электрического тока через мембрану.

Селективность ионного канала обуславливается природой и распределением заряженных групп, особенно тех, которые локализованы непосредственно у входа в канал, где они выполняют функцию *селективного фильтра*. Селективные свойства канала определяются последовательностью аминокислот, входящих в состав фильтра. Последний включает в себя кольцо из атомов кислорода, способных осуществлять дегидратацию ионов.

Проницаемость единичного канала составляет более сотни ионов в секунду, что на 11 порядков выше, чем простая диффузия ионов через мембрану. В процессе транспорта через канал происходит взаимодействие иона с белком, поэтому передвижение ионов по каналам отличается от транспорта воды через аквапорины, в которых эти взаимодействия минимальны. Проводимость канала зависит от заполнения ионами участков на входе и выходе. Выход иона из канала облегчается при появлении на входе другого иона из-за их электростатического отталкивания. Однако при высоких концентрациях электролита может происходить насыщение канала из-за заполнения ионами его входа и выхода и, как следствие, его блокировка.

Кинетические свойства конкретного ионного канала определяются его проницаемостью, селективностью и функционированием воротного механизма. Передвижение иона через пору канала сопряжено с преодолением энергетического барьера, величина которого зависит от диаметра поры, энергии гидратации иона, величины рН, ионной силы и других условий, способных понижать энергию активации при прохождении селективного фильтра. Ионы перемещаются по каналу не путем простой диффузии, а в результате последовательных стадий дегидратации и связывания со стенками поры канала. При этом происходит замещение молекул воды гидратной оболочки иона на полярные группы в полости канала. Поскольку увеличение свободной энергии иона при дегидратации с избытком компенсируется энергией его взаимодействия с полярными группами канала, общая энергия иона снижается, что облегчает его прохождение через канал. Наличие в центре канала полярных групп и фиксированных отрицательных зарядов также способствует снижению энергетического барьера для перехода катионов из раствора в канал.

Основными параметрами, которые применяют для оценки типа и физиологической роли канала, являются селективность, принципы регуляции воротного механизма, проницаемость и фармакологические характеристики. В растениях обнаружены практически все основные типы ионных каналов, известные у животных организмов. На рис. 5.1 суммированы сведения об ионных каналах, функционирующих на различных мембранах растительных клеток.

В плазматической и вакуолярной мембранах растительных клеток с использованием метода петч-кламп выявлены калиевые, анионные и кальциевые каналы. По аналогии с генами, кодирующими ионные каналы у животных и дрожжей, в растениях удалось найти каналы, активируемые циклическими нуклеотидами и глутаминовой кислотой. Многие типы ионных каналов растений имеют явную гомологию с животными, например, активируемые при гипер- или деполяризации калиевые каналы Shaker-типа, хлоридные каналы CLC-типа, каналы, активируемые циклическими нуклеотидами и аспартатом. Некоторые каналы, в частности ALMT- и SLAC-анионные каналы, уникальны и найдены только у растительных организмов.

5.5.2. K^+ -каналы растительных клеток

Калиевые каналы являются мультимерными белками, состоящими из четырех или двух мономеров. Трансмембранная часть мономера K^+ -каналов, называемая α -субъединицей, характеризуется наличием нескольких трансмембранных и одного или двух поровых (P) доменов. Большинство K^+ -каналов блокируется четвертичными соединениями аммония (в частности тетраэтиламмонием). У растительных организмов найдены три типа K^+ -каналов (рис. 5.19), содержащих α -субъединицы. Они называются Shaker, ТРК (tandem-pore K^+ -channels) и Kir (K^+ -inward rectifier) (Lebaudy *et al.*, 2007).

Калиевые каналы ТРК-типа называют также *двухпоровыми*. Их мономеры содержат 4 трансмембранных домена, два P-домена и сайт для связывания ионов Ca^{2+} . ТРК-каналы функционируют в форме димеров. Они локализованы, в основном, на вакуолярной мембране.

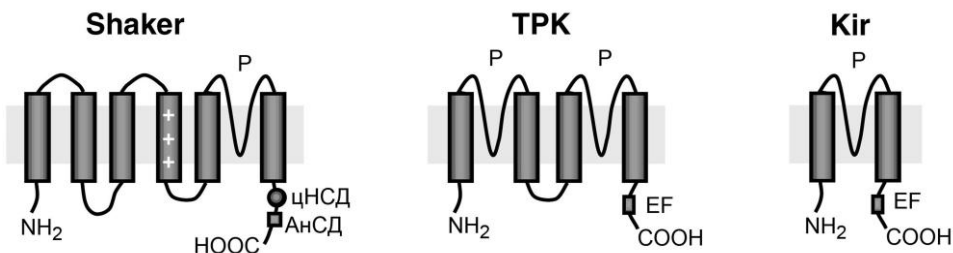


Рис. 5.19. Мономеры трех типов калиевых каналов растений (Lebaudy *et al.*, 2007): P — порообразующий домен; цНСД — домен для связывания циклических нуклеотидов; АнСД — анкиринсвязывающий домен; EF — сайт для связывания ионов Ca^{2+}

Калиевые каналы Kir-типа состоят из двух трансмембранных доменов, одного P-домена и сайта для связывания кальция. Kir-каналы функционируют в форме тетрамеров. У арабидопсиса найден только один K^+ -канал Kir-типа.

К **Shaker-типу** относится большинство потенциалзависимых K^+ -каналов растений. Этот тип K^+ -каналов получил свое название по гену *Shaker*, впервые выявленному у дрозофилы. Мутация *shaker* приводит к тому, что появляются короткоживущие мухи с трясущимися ногами. Мономеры калиевых каналов Shaker-типа состоят из шести трансмембранных доменов и одного порообразующего P-домена (см. рис. 5.19). При этом 4-й домен, несущий суммарный положительный заряд, служит сенсором мембранного потенциала, а 5-й и 6-й домены формируют селективный фильтр — устье канала (P), выявлены также места связывания с циклическими нуклеотидами и белками цитоскелета (анкиринами). В процессе формирования K^+ -каналов их четыре мономера ассоциируют таким образом, что происходит объединение P-доменов (содержащих специфическую аминокислотную последовательность — GYGD/E) с образованием селективного фильтра (рис. 5.20).

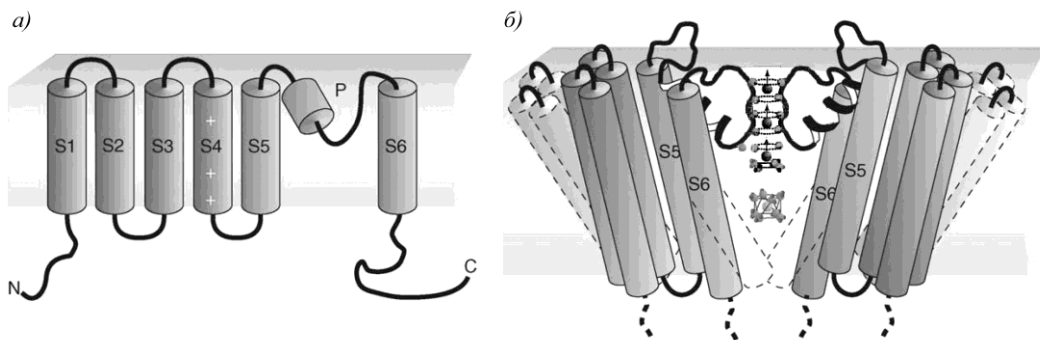


Рис. 5.20. Строение потенциалзависимого K^+ -канала растений (Dreyer, Blatt, 2009): *a* — мономер K^+ -канала (P — порообразующий домен, S1—S6 — шесть трансмембранных доменов); *b* — формирование селективного фильтра калиевого канала его четырьмя мономерами (на рисунке представлены только два из них) и прохождение через него ионов K^+ . Показана дегидратация ионов K^+ и последующее их взаимодействие с кислородными атомами селективного фильтра. Стрелками показано направление движения калия

Потенциалзависимые K^+ -каналы могут активироваться как при деполяризации мембраны, например K^+ -каналы выходящего направления (outward-rectifying), так и при ее гиперполяризации — K^+ -каналы входящего направления (inward-rectifying). Функционирование потенциалзависимых K^+ -каналов определяет уровень калия в цитоплазме, тургор клетки, поступление калия в сосуды ксилемы, движения замыкающих клеток устьиц, генерацию потенциала действия.

K^+ -каналы выходящего направления (K_{out}^+ -каналы) активируются при деполяризации мембраны. В клетках арабидопсиса выявлены два типа K_{out}^+ -каналов — SKOR и GORK. SKOR-каналы (stelar K^+ outward-rectifying), выявленные в клетках стелярной паренхимы корня, обеспечивают поступление ионов K^+ в сосуды ксилемы. Каналы GORK (guard cell outward-rectifying K^+ -channel) принимают участие в закрывании устьиц. После активации GORK ионы K^+ выходят из замыкающих клеток, вызывают потерю воды устьицами и их закрытие. Помимо устьиц, GORK-каналы найдены также в клетках эпидермиса корня.

K^+ -каналы входящего направления (K_{in}^+ -каналы) активируются при гиперполяризации мембраны. Полупериод их активации лежит в пределах 25—200 мс. K_{in}^+ -каналы растений могут оставаться в открытом состоянии несколько минут и обеспечивать, в отличие от аналогичных каналов животных, достаточно продолжительный поток калия в клетку. Функционирование K_{in}^+ -каналов высших растений эффективно модулируется фитогормонами. Селективный фильтр некоторых K_{in}^+ -каналов может также пропускать ионы NH_4^+ и ряд других катионов. Ионы Cs^+ и Ca^{2+} подавляют их работу. У арабидопсиса выявлены две группы K_{in}^+ -каналов — АКТ (Arabidopsis K^+ -transporter) и КАТ (K^+ -channel of Arabidopsis thaliana).

Показано, что АКТ1 обеспечивает поглощение клетками растений калия при содержании его в среде около 1 ммоль/л. В устьицах арабидопсиса функционируют такие K_{in}^+ -каналы, как АКТ1, АКТ2, КАТ1 и КАТ2. Именно они обеспечивают индуцированные гиперполяризацией потоки ионов K^+ внутрь замыкающих клеток, что приводит к открытию устьиц.

Следует особо подчеркнуть, что K_{in}^+ -каналы могут обеспечивать поглощение калия клетками растений при содержании его в среде, равном или более 0,3 ммоль/л. При этом содержание ионов K^+ в цитоплазме растительных клеток колеблется от 60 до 150 ммоль/л. Возможность транспорта калия в клетку по K_{in}^+ -каналам против градиента концентрации достигается за счет того, что функционирующая в плазмалемме H^+ -помпа генерирует отрицательный мембранный потенциал от -120 до -220 мВ. Этот потенциал и позволяет клеткам аккумулировать ионы K^+ по градиенту их электрохимического потенциала через калиевые каналы и переносчики. Такой тип мембранного транспорта калия, вероятно, встречается только у растений и очень важен для минерального питания, поскольку содержание ионов K^+ в почвенном растворе и фазе клеточной стенки обычно варьирует от 0,3 до 15 ммоль/л.

5.5.3. Ca^{2+} -каналы растений

Известные типы Ca^{2+} -каналов обычно подразделяют на две основные группы — потенциалзависимые и лигандуправляемые. Однако такое деление достаточно условно, поскольку для многих потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов показана прямая регуляция лигандами. В свою очередь активность лигандуправляемых каналов может зависеть также и от величины мембранного потенциала. Активность Ca^{2+} -каналов может регулироваться механическим раздражением, взаимодействием с элементами цитоскелета, фосфорилированием и дефосфорилированием. Ca^{2+} -каналы выявлены в плазматической мембране и эндомембранах электрофизиологическими, биохимическими и молекулярно-генетическими методами (см. рис. 5.4). Функционирование системы Ca^{2+} -каналов является наиболее важным элементом в процессе формирования, кодирования и передачи Ca^{2+} -сигналов в растительной клетке.

Потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы по своему строению сходны с Shaker-типом K^+ -каналов. Их мономеры состоят из шести трансмембранных доменов и одного порообразующего P-домена (см. рис. 5.20).

Ca^{2+} -каналы плазмалеммы, активируемые деполяризацией, открываются, когда мембранный потенциал становится ниже -100 мВ. Максимальная активация Ca^{2+} -каналов этого типа происходит при снижении мембранного потенциала до -60 мВ и зависит от конкретных условий эксперимента и объекта. При этом в качестве эффективного механизма деполяризации часто служит поток анионов из клетки через анионные каналы плазмалеммы. Ca^{2+} -каналы, активируемые при деполяризации, имеют большое значение в ответных реакциях растений на внешние воздействия. Целый ряд сигналов, включая синий и красный свет, фитогормоны, нодуляционные факторы и грибные элиситоры, вызывают быструю деполяризацию мембраны, которая достаточна для открывания Ca^{2+} -проницаемых каналов плазмалеммы.

Ca^{2+} -каналы, активирующиеся при гиперполяризации, найдены в плазмалемме клеток корневых волосков, эндодермы, эпидермы и коры корня арабидопсиса. Они более специфичны к Ca^{2+} , чем к K^+ . Ca^{2+} -проницаемые каналы, активируемые гиперполяризацией, могут участвовать в ответных реакциях растений на элиситоры и патогены.

В клетках томатов выявлены Ca^{2+} -каналы, которые активируются при мембранном потенциале выше -120 мВ (например, -160 мВ). В томатах данный тип Ca^{2+} -каналов, вероятно, играет существенную роль при взаимодействии растения и патогенных грибов.

Лигандуправляемыми каналами обычно называют каналы, открывающиеся в результате взаимодействия некоего лиганда (вторичного посредника, гормона) со специфическим рецептором, входящим (или не входящим) в состав канала. У растений этот тип Ca^{2+} -каналов выявлен в плазматической и вакуолярной мембранах.

В растительных клетках найдены лигандуправляемые Ca^{2+} -каналы, которые активируются вторичными посредниками (ИФ₃, циклическая АДФ-рибоза) и фитогормонами (АБК, ИУК).

Ca^{2+} -каналы вакуолярной мембраны. В вакуолярной мембране идентифицированы четыре типа Ca^{2+} -каналов. Два из них являются потенциалзависимыми, два другие — лигандуправляемыми. Один из потенциалзависимых Са-каналов тонопласта активируется при гиперполяризации мембраны, другой — при ее деполяризации.

К Са-каналам, активируемым деполяризацией, относятся *медленные вакуолярные* или *SV-каналы* (slowly activating vacuolar), которые были обнаружены во многих растительных тканях. Они активируются при изменении мембранного потенциала тонопласта от $-30 \dots -50$ мВ до $+10 \dots +30$ мВ. SV-каналы неселективны для катионов и проницаемы не только для Ca^{2+} , но также для Ba^{2+} и Mg^{2+} , а также в меньшей степени для K^+ , Na^+ , Rb^+ и Cs^+ .

После того как в геноме арабидопсиса был выявлен ген, кодирующий *двухпоровый кальциевый канал TPC1* (two-pore channel1), оказалось, что он гомологичен SV-каналу тонопласта. TPC1 содержит 12 трансмембранных и два поровых (P) домена, которые формируют селективный фильтр канала. Между 6 и 7 трансмембранными доменами имеется цитоплазматическая петля, содержащая сайты для связывания ионов Ca^{2+} и регуляторных белков. Сенсоры напряжения находятся в 4 и 10 трансмембранных доменах (рис. 5.21).

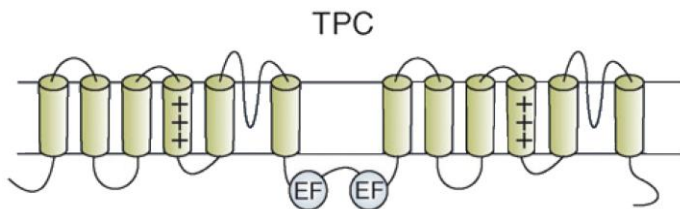


Рис. 5.21. Схематическое строение мономера двухпорового Ca^{2+} -канала (Wheeler, Brownlee, 2008): EF — сайт для связывания ионов Ca^{2+}

Ca^{2+} -каналы тонопласта, активируемые гиперполяризацией, имеют более высокую проницаемость для двухвалентных катионов и обеспечивают при передаче сигналов значительный поток ионов Ca^{2+} из вакуоли в цитоплазму. Эти каналы открываются в диапазоне значений мембранного потенциала тонопласта от -20 до -80 мВ.

К лигандуправляемым Ca^{2+} -каналам тонопласта относятся каналы, активируемые такими вторичными посредниками, как *инозитол-1,4,5-трисфосфат* (ИФ₃) и *циклическая АДФ-рибоза* (цАДФ-рибоза). Эти Са-каналы высокоселективны для двух-

валентных катионов по сравнению с моновалентными. ИФ₃-зависимые каналы вакуоли участвуют в регуляции тургора при гиперосмотическом стрессе и закрытии устьиц, реакции самонесовместимости и ориентации роста пыльцевой трубки. На корнеплодах красной свеклы и замыкающих клетках устьиц показано, что цАДФ-рибоза инициирует Са-зависимые электрические токи из вакуоли в цитоплазму. Каналы, через которые идут эти токи, довольно селективны к ионам Са²⁺ по сравнению с ионами К⁺. Их фармакология сходна с цАДФ-рибозоактивируемым, рианодиновым рецептором эндомембран животных клеток.

5.5.4. Неселективные катионные каналы

В последние годы расшифрованы полностью или частично геномы многих видов растений. Их анализ показывает, что наибольшее число генов, кодирующих ионные каналы, несет информацию о *неселективных катионных каналах* (НКК). Отличительным признаком НКК принято считать их хорошую проницаемость для многих катионов, например для Na⁺, Li⁺, Cs⁺, Ba²⁺, Mg²⁺ и Zn²⁺, плохо проникающих через К⁺- и Са²⁺-каналы (Demidchik, Maathuis, 2007). Термин "неселективные" вначале появился в результате исследований каналов плазматической мембраны клеток животных. НКК демонстрируют высокую селективность для катионов по сравнению с анионами, но низкую селективность для различных катионов.

Первыми катионными каналами, выявленными в плазматической мембране растительных клеток, были *стационарные неселективные катионные каналы* (СНКК). Их делят на три группы:

- потенциалнезависимые;
- активирующиеся при деполяризации;
- открывающиеся при гиперполяризации мембраны (Демидчик, 2010).

Электрофизиологический и фармакологический анализы СНКК показали, что они представляют собой класс ионных каналов высших растений, отличный от К⁺- и Са²⁺-каналов. СНКК проницаемы как для одно-, так и для двухвалентных катионов, не зависят от уровня цитоплазматического кальция и АТФ. СНКК обеспечивают транспорт в растительную клетку не только калия и кальция, но также и таких катионов, как Na⁺, NH₄⁺, Mg²⁺ и Zn²⁺. Активность СНКК регулируется рН и поливалентными катионами, блокируется лантанидами, хинином и модификаторами гистидиновых групп, но не изменяется в присутствии антагонистов Са²⁺-каналов и модификаторов сульфгидрильных групп.

В геноме арабидопсиса выявлено около 20 генов, кодирующих неселективные *катионные каналы, активируемые циклическими нуклеотидами* — CNGC (cyclic nucleotide-gated channel). Эти каналы состоят из 4-х мономеров. Каждый из мономеров имеет 6 трансмембранных доменов, сенсор мембранного потенциала и сайт для связывания нуклеотидов (рис. 5.22). Известны два типа этих каналов — CNG (cyclic nucleotide-gated) и HCN (hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated). Оба

типа каналов аллостерически активируются циклическими нуклеотидами, при этом для активации HCN- K^+ -каналов необходима еще и деполяризация мембраны. Следует отметить, что HCN-каналы проницаемы не только для калия, но и для натрия. Селективность CNG-каналов еще ниже — они проницаемы также для двухвалентных катионов. Предполагается, что CNGC используются, главным образом, для мембранного транспорта ионов кальция, натрия, однако они могут также использоваться для неселективного транспорта других катионов.

Катионная проводимость, активируемая такими аминокислотами, как глутамат и глицин, играет важнейшую роль в синаптической передаче и иммунном ответе у животных организмов. Катионные каналы, ответственные за эти проводимости, называют ионотропными глутаматными рецепторами (iGluR/GLR). После связывания с глутаминовой кислотой GLR формируют катионные каналы с различной селективностью, проводимостью, кинетическими и фармакологическими свойствами. У арабидопсиса найдено около 20 генов, кодирующих гомологичные животным неселективные катионные каналы, активирующиеся после связывания с глутаминовой кислотой (рис. 5.22). *Глутаматактивируемые неселективные катионные каналы* хорошо проницаемы для Ca^{2+} и одновалентных катионов, не обладают выраженной потенциалзависимостью, ингибируются Gd^{3+} , La^{3+} и хинином. Глутаматактивируемые каналы, участвующие в транспорте катионов, выявлены в плазматической мембране клеток корней арабидопсиса. Особенно они активны в клетках эпидермиса.

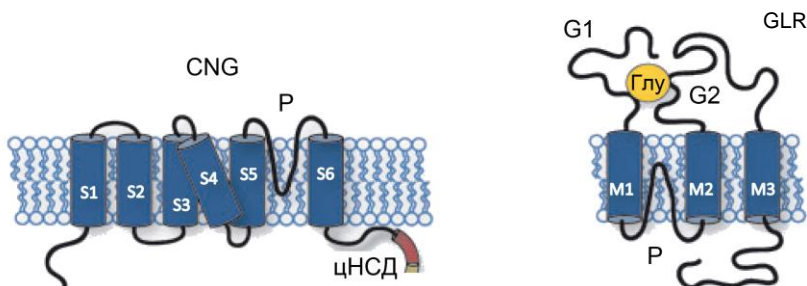


Рис. 5.22. Схематическое строение лигандактивируемых катионных каналов (Dietrich et al., 2010): CNG — катионный канал, активируемый циклическими нуклеотидами; GLR — катионный канал, содержащий рецептор глутаминовой кислоты; S1—S6 и M1—M3 — трансмембранные домены; цНСД — домен для связывания циклических нуклеотидов; G1 и G2 — сайты для связывания глутамата; P — порообразующий домен

5.5.5. Анионные каналы

К основным анионам растительных клеток относятся нитрат, хлорид, фосфат и сульфат, а также органические анионы — малат и цитрат. Эти анионы нейтрализуют положительный заряд катионов и участвуют в поддержании необходимой

осмотичности клетки. Нитрат, фосфат и сульфат — необходимые элементы минерального питания. Малат и цитрат являются важными метаболитами углеродного метаболизма и, как слабые кислоты, принимают участие в регуляции pH. Система мембранного транспорта анионов растительной клетки включает десятки белков-переносчиков, среди которых имеются как ионообменники (см. разд. 5.4), так и анионные каналы, согласованная работа которых обеспечивает необходимый уровень анионов в клеточных компартментах. Наиболее эффективными блокаторами анионных каналов в клетках растений являются стильбеновые дериваты — SITS (4-acetoamido-4'-isothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid) и DIDS (4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid), а также этакриновая и антрацен-9-карбоновая кислоты.

В обычных условиях растительные клетки характеризуются очень высоким электрохимическим градиентом анионов на плазматической мембране. Например, у *Chara* диффузионный потенциал ионов Cl^- на плазмалемме, рассчитанный по уравнению Нернста, достигает +300...+340 мВ. Поэтому открывание анионных каналов вызывает резкие изменения мембранного потенциала. Эта важная особенность физиологии анионных каналов растений отличает их от анионных каналов животных, у которых ионы Cl^- близки к состоянию электрохимического равновесия между клеткой и средой. В растениях, по-видимому, только ионы K^+ находятся в равновесных условиях между цитоплазмой и средой. Для большинства же других ионов (H^+ , Ca^{2+} , Na^+ и Cl^-) электрохимические градиенты на плазмалемме и тонопласте далеки от равновесных. К факторам, которые индуцируют открывание (или закрывание) анионных каналов, относятся изменение мембранного потенциала, их фосфорилирование/дефосфорилирование, а также ионы Ca^{2+} .

В 1992 г. Дж. Шрейдер (J. Schroeder) и Б. Келлер (B. Keller) в плазматической мембране замыкающих клеток устьиц *Vicia faba* методом пэтч-кламп обнаружили два типа потенциалзависимых анионных каналов, активирующихся при деполяризации мембраны: быстрые (rapid) (*R-mun*) и медленные (slow) (*S-mun*). Оба типа анионных каналов имеют более высокую проницаемость для NO_3^- , чем для Cl^- . Анионные каналы S-типа могут находиться в открытом состоянии почти 10 с, что приводит к долговременной деполяризации мембраны. Активация R-каналов длится несколько миллисекунд, что приводит к кратковременному снижению мембранного потенциала. Анионные каналы S- и R-типа найдены во многих видах растений и не только в устьицах, но и в клетках гипокотилей и эпидермиса корня.

В последнее время удалось выявить ряд генов, кодирующих многие анионные переносчики растений (Barbier-Brygoo et al., 2011). Выявлен ген *SLAC1* (slow anion channel 1), который кодирует S-тип каналов, играющий важную роль в процессе закрывания устьиц, индуцируемом АБК (рис. 5.17). Установлено, что R-тип анионных каналов кодируется одним из генов (*ALMT12*), кодирующих ALMT-семейство анионных транспортеров (aluminum-activated malate transporter).

ALMT семейство анионных каналов. Для многих культурных растений, особенно при выращивании на кислых почвах, большой проблемой является токсический эффект, вызываемый ионами Al^{3+} . Для того чтобы приспособиться к избытку алюминия, растения выделяют в почвенный раствор органические кислоты, которые образуют с ионами Al^{3+} нетоксичные комплексы. Выход органических кислот из клеток корня идет по анионным каналам, которые активируются алюминием. Один из таких каналов (ALMT1) впервые был выявлен в плазмалемме клеток корней пшеницы. В дальнейшем у арабидопсиса было найдено 15 генов, которые кодируют активируемые ионами Al^{3+} "малатные" переносчики (AtALMT), выполняющие самые разные функции в растительной клетке (см. рис. 5.17). Так, например, AtALMT9, найденный в тонопласте клеток мезофилла, как малатный канал способствует накоплению яблочной кислоты в вакуоли, а AtALMT12, найденный в замыкающих клетках, участвует в закрытии устьиц.

Анионные каналы клеток корня. В системе мембранного и дальнего транспорта нитрата важную роль играют анионные каналы, функционирующие в клетках эпидермиса и ксилемной паренхимы корня. В клетках ксилемной паренхимы корня найдены три типа анионных каналов, обеспечивающих загрузку анионов в сосуды ксилемы: X-QUAC (xylem-quickly activating anion conductance), X-SLAC (xylem-slowly activating anion conductance) и X-IRAC (xylem-inwardly rectifying anion channel).

В клетках эпидермиса и корневых волосков найдены анионные каналы, названные OR-DAAC (outward rectifying depolarization activated anion channels) и ARAC (Arabidopsis root anion channel) (Barbier-Brygoo et al., 2011). Активируемые при деполяризации плазмалеммы OR-DAAC обладают высокой селективностью для нитрата и обеспечивают его поступление в клетки корневой системы растений. Второй потенциалзависимый анионный канал эпидермиса ARAC обеспечивает выход анионов из клеток корня в почвенный раствор. Ранее этот тип каналов был идентифицирован как R-тип потенциалзависимых анионных каналов (см. ранее).

5.5.6. Механочувствительные ионные каналы

Ионные каналы, которые меняют активность в зависимости от натяжения или смещения мембраны, называют *механочувствительными*. Впервые механочувствительные Ca^{2+} -каналы были выявлены у клеток эндотелия, где они выполняют функции сенсора кровяного давления. Каналы с аналогичными свойствами найдены и у высших растений. Выделяют два типа каналов, чувствительных к натяжению мембраны: SA-каналы (stretch-activated), активирующиеся при ее растяжении, и SI-каналы (stretch-inactivated), которые при растяжении мембраны инактивируются.

В растительных клетках выявлены механочувствительные каналы, проницаемые для катионов (моно- и двухвалентных), а также неселективные, через которые транспортируются и катионы, и анионы (Cl^- , K^+ , Ca^{2+} и др.). Механочувстви-

тельные ионные каналы играют важную роль в ростовых движениях и регуляции работы устьичного аппарата. Наиболее часто в качестве ингибитора используют *гадолиний* (Gd^{3+}), который обратимо блокирует работу механочувствительных каналов в микромолярных (10 мкМ) концентрациях. Однако необходимо иметь в виду, что гадолиний может блокировать также работу ионных каналов других типов.

В плазмалемме клеток эпидермиса лука и замыкающих клеток устьиц обнаружены механочувствительные Ca^{2+} -каналы. Их активность зависит от осмотических характеристик цитоплазмы и апопласта, а также от температуры, pH и мембранного потенциала. Они отличаются специфичностью по отношению к ионам Ca^{2+} (соотношение токов ионов Ca^{2+}/K^{+} составляет от 7 : 1 до 17 : 1) и сравнительно невысокой проводимостью одиночного канала. Механочувствительные Ca^{2+} -каналы могут участвовать в трансдукции механических стимулов, индуцируемых натяжением или сжатием мембраны, а также гравистимуляцией.

Функционирование механочувствительных каналов происходит во взаимодействии с цитоскелетом. Предполагается, что чувствительность каналов к натяжению возрастает, если сила, приложенная к участку мембраны, концентрируется на канале посредством примембранного цитоскелета. Для этого, например, механочувствительные Ca^{2+} -каналы с помощью специальных линкеров (белки анкиринового типа) прикрепляются к актиновым филаментам.

5.6. Ионофоры

Известен ряд соединений (выделенных в основном из бактерий и грибов), которые делают мембрану проницаемой либо для конкретного типа ионов, либо для широкого класса ионов. Эти соединения называются *ионофорами* (табл. 5.1).

Ионофоры отличаются по своей химической природе и делятся на пептиды, депсипептиды, макротетралиды и макроциклические полиэферы. По механизму действия ионофоры делят на нейтральные, в молекуле которых нет ионизированных групп, и карбоксилатные. К последним относятся, например, нигерицин, моненсин, A23187, иономицин. Комплекс катиона с нейтральным ионофором заряжен положительно, а с карбоксилатным — нейтрален. Из ионофоров наиболее высокую селективность имеет циклический депсипептид *валиномицин*, связывающий калий в 1000 раз эффективнее, чем натрий, и обеспечивающий проникновение его через мембраны.

Среди известных Na^{+} -ионофоров по селективным свойствам выделяется *гемисодиум*, относящийся к семейству макрогетероциклических соединений, которые называют *криптами*. При обработке *гемисодиумом* проводимость мембраны для Na^{+} по сравнению с K^{+} составляет 45 : 1. Средство ионофора *моненсина* к натрию по сравнению с калием составляет 10 : 1. Моненсин способен образовывать нейтральный циклический гидрофобный комплекс с переносимым ионом и осуществ-

лять Na^+/H^+ - или K^+/H^+ -обмен через мембрану. Антибиотик *граммицидин А* способен на несколько порядков увеличивать ионную проницаемость мембран для катионов.

Таблица 5.1. Ионофоры, их селективность и тип транспорта

Ионофоры	Переносимые ионы
<i>Мембранные переносчики</i>	
Валиномицин	K^+
Гемисодиум	Na^+
КЦХФГ	H^+
<i>Ионообменники</i>	
A23187	$\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$; $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$
Нигерицин	K^+/H^+
<i>Каналы</i>	
Грамицидин	$\text{H}^+ > \text{Cs}^+ = \text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$
Нистатин	Моновалентные катионы и анионы

Полиэфирный *антибиотик A23187* опосредует электронейтральный обмен Ca^{2+} и Mg^{2+} на два протона. Его сродство к двухвалентным катионам изменяется в ряду: $\text{Mn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$. Более селективным Ca^{2+} -ионофором является полиэфирный антибиотик *иономицин*, еще одним преимуществом которого является отсутствие собственной флуоресценции, что позволяет его использовать в флуоресцентных методах анализа. Иономицин связывает Ca^{2+} и Mg^{2+} лучше, чем A23187, в то же время имеет низкое сродство к Sr^{2+} , Ba^{2+} и одновалентным катионам.

Перенос через мембрану протонов эффективно осуществляется разобщителями окислительного и фотосинтетического фосфорилирования, к которым относятся такие липофильные соединения как 2,4-динитрофенол, дициклогексилкарбодимид (ДЦКД), карбонил-цианид хлорфенилгидразон (КЦХФГ, англ. — *СССР*). В основном это слабые кислоты, диссоциированная форма которых присоединяет протон с образованием нейтральной молекулы. Эта недиссоциированная молекула протонофора пересекает мембрану, двигаясь по градиенту концентрации. Перенос отрицательно заряженной анионной формы в обратном направлении идет под действием электрического поля. Ионофоры являются важным инструментом в исследовании функционирования биологических мембран, имеют большое значение в фармакологии в качестве лекарственных препаратов и часто применяются как компоненты ионоселективных электродов.

5.7. Метод пэтч-кламп регистрации ионного транспорта

Появление метода *пэтч-кламп* (patch-clamp), который позволяет осуществлять локальную (точечную) фиксацию мембранного потенциала и измерять токи через одиночные ионные каналы, в корне изменило методологию исследований электрических процессов и мембранного транспорта. Появилась реальная возможность измерять токи и потенциалы в очень небольших клетках (3—10 мкм), регистрировать токи через одиночные ионные каналы величиной в несколько пикоампер, проводить многие исследования в рамках традиционных электрофизиологических подходов.

Впервые метод пэтч-кламп регистрации ионных токов был введен в исследовательскую практику в 1976 г., когда в журнале "Nature" появилась работа Эрвина Неера (E. Neher) и Берта Сакмана (B. Sakmann) "Токи через одиночные каналы в мембране волокна денервированной мышцы лягушки". Общедоступным же этот метод стал только после выхода в 1981 г. классической работы О. Хэмилла с коллегами (O. P. Hamill et al.) "Усовершенствованный метод пэтч-кламп-регистрации с высоким разрешением от клеток и фрагментов клеточных мембран". В 1991 г. Э. Нееру и Б. Сакману была присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине.

Основой для создания метода пэтч-кламп в его современном виде послужило обнаружение того факта, что при определенных условиях клеточная мембрана формирует необычайно *плотный контакт* с поверхностью кончика стеклянного микроэлектрода. При небольшом разрежении, создаваемом внутри пипетки, между стеклом и мембранным фрагментом формируется контакт, имеющий *гигаомное сопротивление*. В результате образуется электрически изолированный участок мембраны и шум регистрируемого сигнала уменьшается на несколько порядков. Контакт мембраны со стеклом механически настолько прочен, что находящийся под кончиком электрода фрагмент можно либо изолировать от клетки, либо разрушить.

Существует несколько вариантов метода пэтч-кламп (рис. 5.23). Ионные токи через небольшие мембранные фрагменты измеряют с помощью стеклянных пипеток, у которых диаметр кончика сравним с размерами фрагментов. Средняя площадь отверстия кончика пипетки варьирует от 1 до 8 мкм². Наружная поверхность кончиков электродов изолируется хорошо прилипающим к стеклу гидрофобным материалом — силгардовой резиной. Особенностью незастывшего силгарда является его способность растекаться тонкой пленкой по поверхности стекла. Поскольку высокоомные контакты образуются только с чистым стеклом, эту пленку необходимо удалять оплавлением электродов.

Электронная схема для пэтч-кламп-регистрации должна иметь такие параметры, чтобы было возможно зарегистрировать передвижение всего лишь нескольких сотен элементарных электрических зарядов через малый участок клеточной мембраны. Измерительная аппаратура должна иметь максимально сниженные собственные шумы, не превышающие естественные токи.

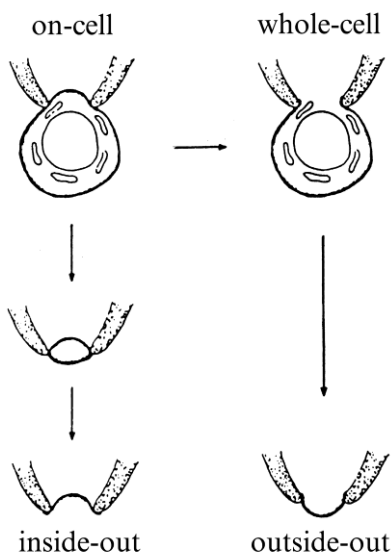


Рис. 5.23. Способы измерения ионных токов методом пэтч-кламп-регистрации: on-cell — на микроучастке (ограниченном кончиком микропипетки) с прикрепленной клеткой (cell-attached); whole-cell — от целой клетки в условиях плотного контакта; inside-out — на изолированном участке мембраны, внешняя поверхность которой обращена внутрь пипетки; outside-out — внешняя часть мембраны обращена наружу

Несмотря на то, что метод пэтч-кламп изначально был разработан для регистрации токов через одиночные каналы, он может быть с успехом использован для измерения токов от целой клетки, особенно когда ее размеры невелики. После образования гигаомного контакта мембранный фрагмент под пипеткой можно разрушить, прикладывая к ней короткие импульсы отрицательного давления. Часто такая манипуляция не нарушает контакта пипетки с мембраной, и в результате между электродом и цитоплазмой устанавливается хорошо изолированный от внешней среды проводящий путь. Такой способ проникновения в клетку наносит ей гораздо меньше повреждений, чем введение стандартного микроэлектрода.

При измерении мембранных потенциалов с помощью классической микроэлектродной техники большая часть клеток диаметром менее 20 мкм повреждается. Метод пэтч-кламп позволяет успешно регистрировать мембранный потенциал клеток диаметром 10 мкм, не разрушая их (рис. 5.24). Сопротивление утечки "микроэлектрод—клетка" при использовании обычных микроэлектродов не превышает 500 МОм, в то время как сопротивление утечки при whole-cell-регистрации может достигать 10 ГОм. И, наконец, если сопротивление кончика обычного микроэлектрода (R_s) составляет более 100 МОм, то сопротивление кончика пипетки при плотном контакте равно 4 МОм. Поэтому метод регистрации при плотном контакте имеет ряд явных преимуществ по сравнению с другими методами.

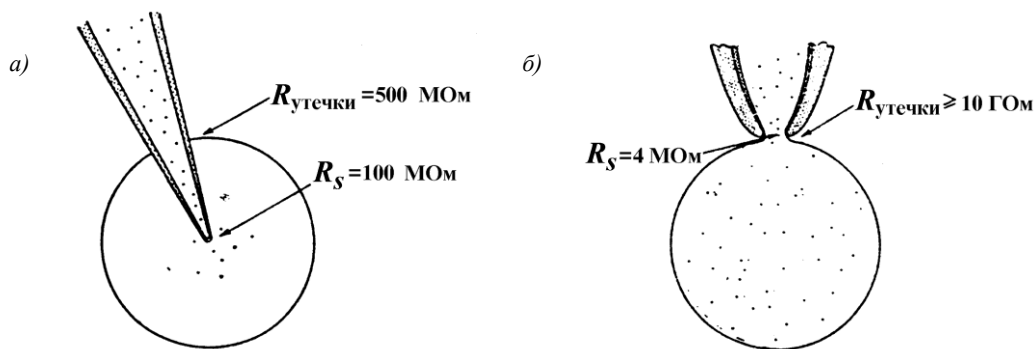


Рис. 5.24. Методы регистрации мембранного потенциала и ионных токов (Марти, Неер, 1987): *а* — обычная микроэлектродная техника; *б* — пэтч-кларп-регистрация от целой клетки (whole-cell) при плотном контакте

Однако наиболее корректную информацию о мембранной проводимости все-таки дает регистрация токов через одиночные каналы, поскольку позволяет избавиться от ряда артефактов, которые могут быть получены при регистрации макроскопического тока. При этом появляется возможность измерить амплитуду тока через открытый канал, различать токи, проходящие через каналы разной проводимости. По записям токов через одиночные каналы можно получать информацию о кинетике работы канала, которую нельзя извлечь из макроскопических измерений. Это преимущество особенно очевидно при регистрации на фрагментах мембран, содержащих только один канал.

5.8. Использование мембранных везикул для изучения мембранного транспорта ионов

Мембранную фракцию из клеток растений, обогащенную, например, фрагментами плазмалеммы, получают путем разделения микросомальных мембран в водной двухфазной системе, содержащей два полимера — ПЭГ и декстран. Особенностью мембранных препаратов, полученных таким образом, является способность фрагментов мембран самопроизвольно замыкаться в везикулы. С помощью осмотического шока везикулы плазмалеммы могут быть заполнены средой, состав которой определяется задачами эксперимента.

Для количественной оценки интенсивности ионных потоков через мембрану используются *флуоресцентные зонды*. В зависимости от конкретных задач эксперимента применяют красители, принадлежащие к трем основным группам зондов: *потенциалчувствительные*, изменяющие свою флуоресценцию при изменении разности потенциалов на везикулярной мембране (аурамин, оксонолы, карбоцианины и др.), *pH-зависимые*, реагирующие изменением флуоресценции на изменение градиента концентрации ионов водорода (акридины), и, наконец, зонды, чувств-

вительные к изменению концентрации какого-либо иона, например *кальция* (квин-2, фура-2, индо-1 и др.).

На рис. 5.25 приведены результаты анализа АТФ-зависимого транспорта ионов Ca^{2+} на везикулах плазмалеммы, которые были получены методом дифференциального центрифугирования из клеток колеоптилей кукурузы. Внутри везикул содержался кальцийчувствительный флуоресцентный зонд индо-1, загруженный с помощью осмотического шока. При добавлении к везикулам ионов Ca^{2+} (10 мкМ) и комплекса Mg-АТФ (3 мкМ) происходило постепенное увеличение флуоресценции зонда, что указывает на поступление ионов Ca^{2+} внутрь везикул.

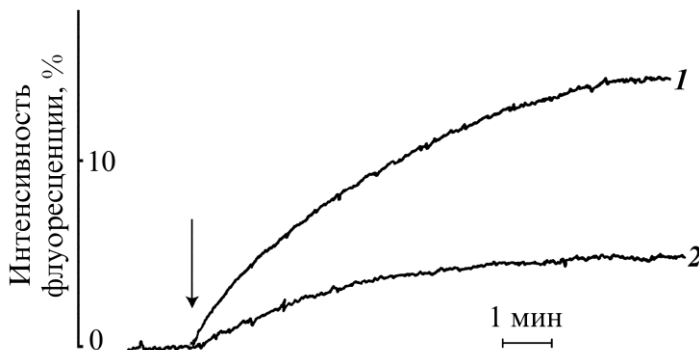
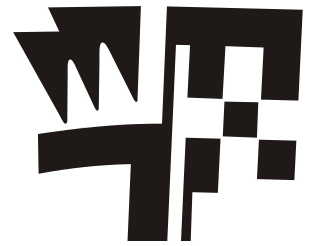


Рис. 5.25. Активный транспорт ионов Ca^{2+} в везикулы плазмалеммы клеток колеоптилей кукурузы. Стрелкой показан момент внесения АТФ (1) или АДФ (2) в инкубационную среду, содержащую ионы Ca^{2+} и везикулы плазмалеммы, загруженные флуоресцентным зондом индо-1



Глава 6

Минеральное питание растений

Раньше на первый план выдвигался уход за землей — удобрения, обработка почвы, именно земледелие. Но ведь главная наша цель в другом — в растениеводстве.

Н. И. Вавилов

Питание растительных организмов представляет собой процесс поглощения и усвоения из окружающей среды химических элементов, необходимых для их жизнедеятельности. *Минеральное питание* включает процессы поглощения минеральных ионов из наружной среды, их связывания (преобразования, ассимиляции) и транспорта по клеткам и тканям к местам возможного потребления. Основателем учения о минеральном питании является немецкий ученый Юстус Либих (J. Liebig). В 1840 г. он выпустил книгу "Химия в приложении к земледелию и физиологии", в которой утверждал, что основа плодородия почв — минеральные соли. Он был также первым, кто предложил вносить в качестве удобрений чистые минеральные вещества.

Элементный минеральный состав биосферы формируется главным образом благодаря поглотительной деятельности корневой системы растений. Не случайно один из известных физиологов растений Е. Эпштейн (E. Epstein, 1972) образно назвал растения шахтерами (*miners*) земной коры, которые обеспечивают необходимыми минеральными элементами не только себя, но также и другие организмы. Из-за большой поверхности и способности поглощать ионы в низких концентрациях корни растений очень эффективно связывают необходимые минеральные элементы, концентрируя их таким образом в биосфере. В этом процессе могут принимать участие также микоризообразующие грибы и азотфиксирующие микроорганизмы.

Наземные растительные организмы в естественных условиях получают необходимые минеральные вещества из почвы. В этом случае корни оказываются в сложной системе биологических и физико-химических взаимоотношений между почвенными частицами, почвенным раствором, почвенными микроорганизмами и грибами. Необходимо также учитывать активность почвенных беспозвоночных и позвоночных животных.

Ионы минеральных солей могут поступать в клетки корневой системы растений как из почвенного раствора, так и в результате контактного обмена с почвенными

частицами. Оба эти процесса обычно связаны с обменом ионов H^+ на катионы и анионов HCO_3^- , OH^- и органических кислот на минеральные анионы. Большая часть питательных минеральных веществ находится не в почвенном растворе, а адсорбирована на почвенных частицах. Поэтому в минеральном питании растений большее значение имеет процесс обменной адсорбции, которая осуществляется как на органической (гумус), так и на неорганической (алюмосиликаты) части почвы. Почвы, в основном, обладают свойствами катионообменников, хотя в них имеются и анионсвязывающие группы.

Из почвы минеральные элементы поглощаются в виде катионов и анионов. Поступление элементов минерального питания в растение осуществляется с помощью системы ионных помп, обменников и каналов, локализованных на плазматической мембране клеток корня (см. главу 5).

Попадая в клетку, одни элементы участвуют в метаболизме в форме свободных ионов, другие связываются с органическими соединениями, не претерпевая при этом никаких изменений, третьи же включаются в состав органических молекул только после ряда окислительно-восстановительных превращений. В последние годы удалось выявить механизмы адаптации растений к уровню питательных веществ в почвенном растворе, особенно для азота и калия. Установлено, что ключевыми сигнальными элементами при этом являются различные протеинкиназы, факторы транскрипции и микроРНК (Yi-Fang Tsay et al., 2011). Именно эти компоненты сигнальных путей позволяют растениям конкурировать за ограниченный уровень питательных веществ в почве и выживать в условиях их дефицита.

Несмотря на то, что в растениях можно найти почти все элементы таблицы Д. И. Менделеева, лишь немногие из них необходимы для жизнедеятельности. Список этих необходимых элементов приведен в табл. 6.1. Первые три элемента — углерод, водород и кислород — растительные организмы получают из воздуха и воды в процессе фотосинтеза, остальные — из почвы. В сухой массе растительных тканей углерод и кислород составляют в среднем по 45%, водород — 6%, азот — 1,5%.

Таблица 6.1. Среднее содержание элементов в тканях растений

Элемент	Содержание в расчете на сухую массу		Относительное количество атомов по сравнению с молибденом
	мкмоль /г	% или ppm	
<i>Элементы, полученные из углекислоты и воды</i>			
Водород	60 000	6	60 000 000
Углерод	40 000	45	40 000 000
Кислород	30 000	45	30 000 000

Таблица 6.1 (окончание)

Элемент	Содержание в расчете на сухую массу		Относительное количество атомов по сравнению с молибденом
	мкмоль /г	% или ppm	
<i>Макроэлементы</i>			
Азот	1 000	1,5	1 000 000
Калий	250	1,0	250 000
Кальций	125	0,5	125 000
Магний	80	0,2	80 000
Фосфор	60	0,2	60 000
Сера	30	0,1	30 000
Кремний	30	0,1	30 000
<i>Микроэлементы</i>			
Хлор	3,0	100	3 000
Железо	2,0	100	2 000
Бор	2,0	20	2 000
Марганец	1,0	50	1 000
Натрий	0,4	10	400
Цинк	0,3	20	300
Медь	0,1	6	100
Никель	0,002	0,1	2
Молибден	0,001	0,1	1

Примечание. Концентрация Н, С, О и макроэлементов выражена в процентах (%), микроэлементов — в частях на миллион (ppm).

В зависимости от содержания минеральные элементы делят на *макро-* и *микроэлементы*. Содержание макроэлементов (N, P, K, Ca, Mg, S, Si) в растительных тканях в расчете на сухую массу варьирует от 1,5 до 0,1% (т. е. более 1 г/кг). Концентрация же микроэлементов (Fe, Zn, Cu, Mn, Mo, B, Cl, Ni) составляет 0,01% и ниже (т. е. менее 100 мг/кг сухой массы).

6.1. Макроэлементы

Содержание отдельных элементов в различных органах растений сильно варьируется и зависит от этапа онтогенеза и от условий внешней среды. Наиболее богаты минеральными элементами листья, у которых зола может составлять от 3 до 15% от массы сухого вещества. Минимальная же концентрация зольных элементов (0,4—1%) обнаруживается в стволах древесных растений.

6.1.1. Азот

Азот входит в состав аминокислот, амидов, белков, нуклеиновых кислот, нуклеотидов и многих других жизненно важных органических соединений. Для растений азот является самым дефицитным элементом питания. Поэтому в обмене веществ азот используется растениями очень экономно и заменяется, где это возможно, на безазотистые соединения. В составе полисахаридов растительной клеточной стенки нет гексозоаминов, входящих в мукополисахариды животных, хитин членистоногих и грибов, а также муреин бактерий. У растительных организмов, в отличие от животных, в продуктах выделения практически нет азотистых веществ. Процессы распада азотистых соединений в растительных клетках завершаются образованием аммиака, который может сразу же реутилизироваться.

При недостатке азота тормозится рост растений, ослабляется образование боковых побегов и кущение у злаков, наблюдается мелколистность. Одновременно уменьшается ветвление корней, однако при этом соотношение массы корневой системы к надземной части может возрастать. Одно из ранних проявлений дефицита азота — бледно-зеленая окраска листьев, вызванная ослаблением синтеза хлорофилла. Длительное азотное голодание приводит к гидролизу белков и разрушению хлорофилла в нижних листьях и оттоку образующихся азотных соединений к молодым тканям. При этом в зависимости от вида растения окраска нижних листьев приобретает желтые, оранжевые или красные тона. При более сильном азотном голодании появляются некрозы, ткани высыхают и отмирают. Дефицит азота ускоряет развитие растения и созревание семян.

Корни растений способны поглощать из почвы азот в форме аниона NO_3^- и катиона NH_4^+ . Основными же формами азота на Земле являются прочно связанный азот литосферы и молекулярный азот (N_2) атмосферы. Молекулярный азот растениями непосредственно не усваивается и переходит в доступную форму только благодаря деятельности азотфиксирующих микроорганизмов. В 1 га пахотного чернозема в среднем содержится до 200 кг доступного для растений азота. На подзолистых почвах его в 3—4 раза меньше.

Ион NO_3^- очень подвижен, вымывается в глубокие слои почвы и может попадать в водоемы. Содержание нитратов в почве особенно возрастает весной, когда создаются благоприятные условия для деятельности нитрифицирующих бактерий. Катион NH_4^+ в почве менее подвижен, хорошо адсорбируется на почвенных коллоидах, меньше вымывается, его концентрация в почвенном растворе значительно выше, чем нитрата. Для своего питания растения нуждаются в значительных количествах азота. Так, растения кукурузы при среднем урожае зерна 35 ц/га и вегетативной массе 50 ц/га выносят с 1 га около 85 кг азота. Поэтому при возделывании сельскохозяйственных культур необходимо обязательно вносить азотные удобрения.

6.1.2. Фосфор

Фосфор входит в состав нуклеиновых кислот, белков, фосфолипидов, фосфорных эфиров сахаров, нуклеотидов, фитина и других соединений. В растительных тканях фосфор присутствует в органической форме и в виде ортофосфорной кислоты и ее солей. Фосфор поглощается в окисленной форме — аниона ортофосфата H_2PO_4^- или HPO_4^{2-} . В таком виде он включается в состав органических молекул и переходит от одного соединения к другому, не претерпевая при этом никаких изменений.

Более 90% содержащегося в почве фосфора находится в связанной форме и недоступно для растений. Основной природный источник поступления фосфора в пахотный слой почвы — это материнская почвообразующая порода, где он содержится главным образом в виде апатитов. Трехзамещенные фосфорные соли кальция и магния, а также железа и алюминия слабо растворимы в воде и мало доступны для растений. Особенно много таких солей в кислых почвах. Двухзамещенные и особенно однозамещенные кальциевые и магниевые соли ортофосфорной кислоты, а тем более фосфорные соли калия, натрия и аммония хорошо растворимы в воде и доступны для поглощения корневой системой растений.

Фосфорные соединения в основном слабо растворимы в почвенном растворе. Это, с одной стороны, снижает потери фосфора из почвы за счет вымывания, но с другой — ограничивает возможности его поглощения корневой системой растения. До 80% потребности растений в фосфоре может обеспечивать симбиоз с микоризообразующими грибами.

Фосфор, как и азот, легко перераспределяется между органами растения, оттекая из стареющих листьев к молодым, в конусы нарастания и формирующиеся плоды. Основной запасной формой фосфора у растений является K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} -соль инозитфосфорной кислоты — *фитин*.

Значительные количества фитина (0,5—2% на сухую массу) накапливаются в семенах. Растения наиболее чувствительны к недостатку фосфора на ранних этапах развития. Внешним симптомом фосфорного голодания является синевато-зеленая окраска листьев нередко с пурпурным или бронзовым оттенком, что связано с накоплением антоцианов. При этом листья становятся мелкими и более узкими, приостанавливается рост клеток и тканей, задерживается переход к репродуктивной фазе развития растений.

В растительном организме с участием фосфора происходят два типа реакций: процессы первичного *фосфорилирования* органических соединений и процессы переноса остатка фосфорной кислоты от одной молекулы к другой. Фосфат постоянно циркулирует между органическим и минеральным пулом, включаясь и высвобождаясь, например в АДФ и АТФ, обслуживая таким образом энергетический обмен клетки.

В энергетическом обмене фосфор играет особую роль, поскольку энергия в клетке запасается именно в форме высокоэнергетических эфирных связей фосфора (C—O ~ P),

в пирофосфатных или полифосфатных связях. Такой способ запасания энергии в живых системах является универсальным и используется почти во всех метаболических превращениях.

Уникальной функцией фосфора является его участие в фосфорилировании белков с помощью протеинкиназ — одной из наиболее важных посттрансляционных модификаций белков. Фосфорилирование, например, ряда мембранных белков вызывает изменение их заряда, энзиматических или транспортных функций.

В нуклеиновых кислотах именно остатки фосфорной кислоты образуют эфирные связи между нуклеотидами, сшивая их в гигантские цепочки молекул ДНК или РНК. Фосфат обуславливает гидрофильность фосфолипидов, тогда как остальная часть молекулы липофильна. В мембранах фосфолипиды ориентируются полярно: остатки фосфорной кислоты находятся снаружи, а липофильная часть молекулы удерживается в липидном бислое.

6.1.3. Калий

Содержание калия достигает до 10% сухого веса растения. Для оптимальной жизнедеятельности концентрация ионов K^+ в цитоплазме и нуклеоплазме, а также в строме хлоропластов и митохондриях должна поддерживаться на уровне 100—150 мМ, т. е. в 100—1000 раз превышать его содержание во внешней среде. Поэтому в плазматической мембране клеток, контактирующих с почвенным раствором, функционирует мощнейшая система ионных насосов, способствующих накоплению ионов K^+ внутри растительного организма (см. разд. 5.4.1).

Содержание калия в почве больше запасов фосфора и азота в 5—50 раз. В почве он находится в минералах, в коллоидных частицах (обменном и необменном состоянии) и в доступных для растений минеральных солях почвенного раствора. По мере потребления доступных форм калия его запасы пополняются обменным пулом этого катиона, а при уменьшении последнего — за счет различных форм связанного калия. Попеременное высушивание и увлажнение почвы, деятельность корневой системы и микрофлоры способствуют переходу калия в доступные для растения формы.

Критический период в снабжении растений калием приходится на первые две недели роста после появления всходов. Наибольшее же его количество поглощается, как правило, в период интенсивного нарастания вегетативной массы. Особенно высока концентрация калия в овощных культурах — огурцах, томатах, капусте. Однако потребление калия подсолнечником превосходит все остальные культуры. Так, при уборке картофеля и злаков вместе с урожаем выносятся 180 кг K_2O на 1 га, при уборке капусты — 280, а подсолнечника — 990 кг/га (!).

При недостатке калия листья начинают желтеть с краев, затем их края и верхушки приобретают бурю окраску, иногда с красными "ржавыми" пятнами и выглядят как бы обожженными, на завершающем же этапе калиевого голодания эти участки отмирают. Дефицит калия тормозит процессы деления и растяжения клеток, что

приводит к образованию розеточных форм растений. Недостаток его угнетает проявление доминирующего эффекта апикальной почки. Калиевое голодание снижает также интенсивность фотосинтетических процессов, прежде всего, за счет уменьшения скорости оттока ассимилятов.

В растении калий концентрируется в растущих тканях с интенсивным обменом веществ — меристемах, камбии, молодых листьях, побегах, почках. В клетке он составляет основную часть катионов, около 80% его сосредоточено в вакуоли. Калий находится в основном в ионной форме, имеет очень высокую подвижность и хорошо реутилизируется. Передвижению калия из старых в молодые листья способствует натрий, который замещает его в тканях растений, прекративших рост.

Калий играет важную роль в регуляции поглощения и транспорта воды по растению, поскольку влияет на водный потенциал растительных клеток. Калий способствует гидратации коллоидов цитоплазмы, регулируя ее водоудерживающую способность. Поступление воды в растение в результате корневого давления на 3/4 обусловлено присутствием в сосудах ксилемы именно ионов K^+ . Он имеет большое значение в процессе открывания и закрывания устьиц. На свету его концентрация в вакуоли возрастает, вода начинает входить в замыкающие клетки, вызывая увеличение тургорного давления и открывание устьиц. В темноте калий выходит из замыкающих клеток, тургорное давление падает и устьица закрываются.

Калий служит главным потенциалобразующим ионом в процессах электрогенеза растительной клетки, поскольку является основой ионной асимметрии между клеткой и внешней средой. K^+ служит также противоионом при нейтрализации отрицательных зарядов органических и неорганических анионов.

Известно более 60 ферментов, для работы которых необходимо присутствие ионов K^+ . Он необходим в процессах включения фосфата в органические соединения, для синтеза белков, полисахаридов и многих других реакций. Дефицит калия нарушает ламеллярно-гранулярное строение хлоропластов и мембраны митохондрий.

6.1.4. Кальций

По отношению к кальцию растения делятся на три группы: кальциефилы, кальциефобы и нейтральные виды. Много кальция содержат бобовые, гречиха, подсолнечник, картофель, капуста, конопля; гораздо меньше — злаки, лен, сахарная свекла. В тканях двудольных растений кальция больше, чем в тканях однодольных. Кальций поступает в корень через Ca^{2+} -проницаемые каналы (см. разд. 5.5.3). В растении кальций накапливается в старых тканях и органах и не реутилизируется. По мере старения клеток кальций концентрируется в вакуоли и связывается в виде нерастворимых солей органических кислот. Большое количество кальция связывается с элементами клеточной стенки, в частности с пектиновыми веществами.

От недостатка кальция страдают в первую очередь молодые меристематические ткани и корневая система. При его дефиците резко возрастает текучесть мембран,

нарушаются процессы мембранного транспорта и биоэлектrogenеза, тормозятся деление и растяжение клеток, прекращаются процессы корнеобразования. Недостаток кальция приводит к появлению коричневых пятен (связанных с окислением полифенолов), набуханию пектиновых веществ, что вызывает нарушение структуры клеточных стенок и замедление роста растений. В меристемах, на плодах и запасующих тканях появляются некрозы. Листовые пластинки при этом искривляются и скручиваются, кончики и края листьев вначале белеют, а затем чернеют. В результате корни, листья и отдельные участки стебля загнивают и отмирают. Большинство почв богато кальцием, поэтому резко выраженное кальциевое голодание встречается редко. Исключения составляют сильнокислые или засоленные почвы, а также торфяники.

Ионам Ca^{2+} принадлежит важная роль в регулировании поглощения ионов клетками растений. Именно кальций чаще всего выступает в роли балансного иона при создании физиологической уравниваемости ионного состава среды, поскольку его содержание в почве достаточно велико. Физиологическая уравниваемость раствора означает, что поглощение всех содержащихся в нем ионов происходит равномерно, при этом не наблюдается резких сдвигов pH. Избыточное содержание многих токсичных для растения катионов (алюминия, марганца, железа и др.) может нейтрализоваться за счет связывания с клеточной стенкой и вытеснения из нее ионов Ca^{2+} в раствор. Присутствие кальция повышает селективное поглощение калия в присутствии высоких концентраций натрия, а также способствует поддержанию необходимого pH растворов. На принципе сбалансированности (уравниваемости) создаются питательные растворы для выращивания растений (такие как растворы Арнона—Хогленда, Гельригеля, Кнопа, Прянишникова, Сакса, Чеснокова—Базириной и др.).

Сигнальные функции ионов Ca^{2+} в растительной клетке. На сигнальную роль ионов Ca^{2+} в мышечных клетках впервые обратил внимание еще в 1883 г. английский физиолог С. Рингер (S. Ringer). Он установил, что активность сердечной мышцы резко снижается при недостатке ионов Ca^{2+} . Почти 100 лет спустя Г. Расмуссен (H. Rasmussen) сформулировал концепцию, согласно которой кальций выполняет в клетке функцию *вторичного посредника* при проведении сигналов, поступающих как из внешней, так и внутренней среды организма. Последующие работы показали, что кальций является универсальным "сигнальным" ионом (вторичным посредником) не только у животных, но и у растительных организмов.

Концентрация ионизированного кальция в цитоплазме покоящихся клеток растений чрезвычайно мала и варьирует от 100 до 200 нМ. В эндоплазматическом ретикулуме и митохондриии его уровень составляет 1 мМ, а в клеточной стенке и в вакуоли достигает 1—10 мМ. Таким образом, на клеточных мембранах имеются чрезвычайно высокие градиенты ионизированного кальция, которые значительно превышают градиенты для других ионов. Регулирование содержания ионов Ca^{2+} в цитоплазме осуществляется за счет Ca^{2+} -каналов, Ca^{2+} -АТФаз и $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -

обменников (см. главу 5), которые обеспечивают не только формирование мембранных градиентов ионизированного кальция, но и осуществляют передачу Ca^{2+} -сигнала.

Процесс формирования и распространения Ca^{2+} -сигнала происходит следующим образом. При воздействии на клетку внешних сигналов (гормоны, свет, патогены, абиотические стрессоры) на клеточных мембранах активируется некая "популяция" Ca^{2+} -каналов, характеризующаяся определенной локализацией, временем нахождения в открытом состоянии, проводимостью и другими параметрами (рис. 6.1). В результате в цитоплазме вблизи внутреннего устья Ca^{2+} -каналов формируются локальные участки с высокой концентрацией ионизированного кальция.

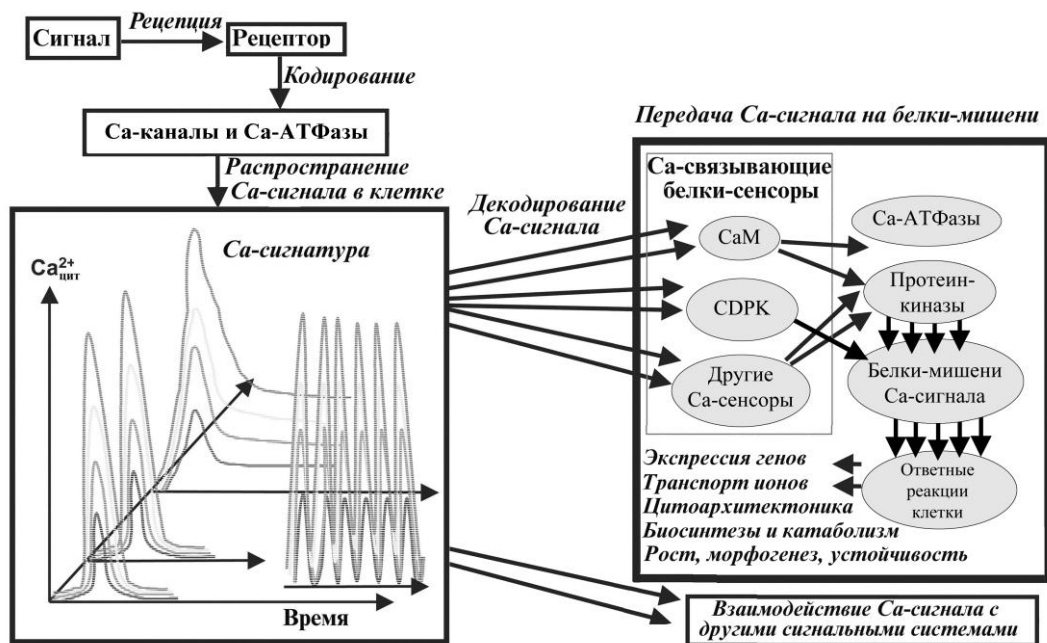


Рис. 6.1. Схема формирования и передачи кальциевого сигнала в растительной клетке [по Rudd, Frankling-Tong (2001) с изменениями]:

$\text{Ca}^{2+}_{\text{цит}}$ — концентрация ионизированного кальция в цитоплазме;
CaM — кальмодулин; CDPK — Ca-зависимая протеинкиназа

Для того чтобы описать разнородность кальциевого сигнала по его амплитуде, частоте и локализации, используют термин "*кальциевая сигнатура*" (signature), или "*код*". Специфичность в кодировании кальциевых сигналов достигается тем, что различные внешние стимулы вызывают отличающиеся друг от друга (по локализации, амплитуде и частоте) колебания уровня ионизированного кальция в цитоплазме. Локальный Ca^{2+} -сигнал, воздействуя на другие типы Ca^{2+} -каналов, способен

иницировать более масштабное возрастание уровня ионов Ca^{2+} в цитоплазме в форме Ca^{2+} -осцилляций и Ca^{2+} -волн, что вызывает распространение сигнала и активацию глобальных клеточных процессов.

Основными внутриклеточными мишенями для ионов Ca^{2+} являются различные *кальций-связывающие белки*. Некоторые из этих белков обеспечивают ионный транспорт, другие выполняют функции своеобразного буфера, поддерживающего низкий уровень кальция в цитозоле и в вакуоли. При связывании ионов Ca^{2+} с такими белками не происходит значительных изменений их структуры.

Если же кальций взаимодействует с белками, которые способны осуществлять регуляторные функции, то после образования Ca^{2+} -белкового комплекса происходят серьезные конформационные изменения структуры белковой молекулы. Именно такие белки, которые называют *Ca^{2+} -сенсорами*, осуществляют *декодирование кальциевого сигнала*. После связывания с ионами Ca^{2+} белки-сенсоры приобретают способность взаимодействовать с другими белками, модулировать их функции, транслировать Ca^{2+} -сигнал далее и регулировать, таким образом, специфические биохимические процессы. У арабидопсиса найдено более 150 белков, которые участвуют в передаче сигналов с помощью ионов Ca^{2+} . Большинство известных Ca^{2+} -связывающих белков-сенсоров содержат состоящую из 12 аминокислотных остатков последовательность, получившую название *EF-рука*, которая связывает Ca^{2+} с высокой специфичностью. Одним из таких белков-сенсоров является кальмодулин (см. приложение 2).

После связывания ионов Ca^{2+} с белками-сенсорами кальциевый сигнал передается (чаще путем обратимого фосфорилирования) на ферменты, белки цитоскелета, факторы транскрипции, ионные каналы, что приводит к инициации Ca^{2+} -зависимых физиологических процессов. "Тушение" кальциевого сигнала осуществляется путем выкачивания избытка ионов Ca^{2+} из цитоплазмы Ca^{2+} -насосами во внеклеточное пространство или депонирования его в клеточных органеллах. При этом происходит дефосфорилирование белков, и клетка возвращается к исходной ситуации.

Таким образом, кальций способен выполнять функции "сигнального" иона и служить эффективным регулятором многих метаболических процессов в клетках растений. Более того, кальций может служить связующим звеном для многих сигнальных путей и способствовать формированию *сигнальной сети*, которая объединяет различные системы клеточной сигнализации.

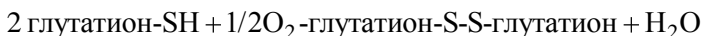
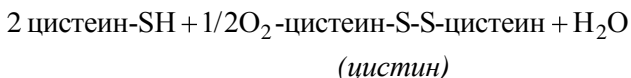
6.1.5. Сера

Этот элемент поглощается растениями только в окисленной форме — в виде сульфат-иона (SO_4^{2-}). Сера содержится в растениях в двух формах — окисленной (сульфат) и восстановленной. Основная часть поглощенного корнями сульфата перемещается в надземную часть растения по сосудам ксилемы к молодым тканям, где он интенсивно включается в обмен веществ.

Попадая в цитоплазму, сульфат восстанавливается (см. разд. 6.3.5) с образованием *сульфгидрильных групп* органических соединений (R-SH). Из листьев сульфат и восстановленные формы серы могут перемещаться как акропетально, так и базипетально в растущие части растения и в запасующие органы. В семенах сера находится преимущественно в органической форме, а в процессе прорастания частично переходит в окисленное состояние. Доля сульфата минимальна в молодых листьях и резко возрастает при их старении в связи с деградацией белков. Сера, как и кальций, не способна к реутилизации и поэтому накапливается в старых тканях растения.

Сульфгидрильные группы входят в состав аминокислот, липидов, кофермента А и некоторых других соединений. Сера входит в состав аминокислот *цистеина* и *метионина*, которые могут находиться как в свободном виде, так и в составе белков. Потребность в сере особенно высока у растений, богатых белками, например, у бобовых растений и у представителей семейства крестоцветных, в больших количествах синтезирующих серосодержащие горчичные масла, в состав которых входят протоксинины — глюкозинолаты. В клетке наибольшее число тиоловых (-SH) групп приходится на долю трипептида *глутатиона* (глу-цис-гли).

Одна из основных функций серы связана с формированием третичной структуры белков за счет ковалентных связей *дисульфидных мостиков*, образуемых между остатками цистеина. Она входит в состав ряда витаминов (*липовой кислоты, биотина, тиамина*). Еще одна важная функция серы заключается в поддержании определенного значения окислительно-восстановительного потенциала клетки с помощью обратимых превращений:



Недостаточное снабжение растений серой тормозит синтез белков, снижает интенсивность фотосинтеза и скорость ростовых процессов. Внешними симптомами дефицита серы являются бледные и пожелтевшие листья, что проявляется вначале у самых молодых побегов.

В почве сера находится в неорганической и органической формах. В большинстве почв преобладают органические формы серы растительных и животных остатков. Основные формы неорганической серы в почве — сернокислые соли кальция, магния и натрия. Они могут находиться в почвенном растворе или быть связанными почвенными коллоидами. В засоленных почвах содержание сульфата натрия может достигать 60% от массы почвы. На затопляемых почвах сера находится в восстановленной форме: (FeS, FeS₂ или H₂S).

6.1.6. Магний

По содержанию в растениях магний занимает четвертое место после калия, азота и кальция. Его содержание в цитоплазме растительной клетки составляет около 0,5 мМ. Особенно много магния в молодых клетках, генеративных органах и запа-

сающих тканях. Накоплению магния в растущих тканях способствует его сравнительно высокая подвижность в растении, что позволяет реутилизировать этот катион из стареющих органов. Однако степень реутилизации магния значительно ниже, чем азота, фосфора и калия, поскольку часть его образует нерастворимые и не способные к перемещению по растению оксалаты и пектаты.

В семенах большая часть магния находится в составе фитина. Около 10—15% Mg входит в состав хлорофилла. Встраивание Mg^{2+} в протопорфирин осуществляет фермент Mg-хелатаза. Функции магния в молекуле хлорофилла уникальны, и ни какой другой элемент не может его заменить. Исключение составляет цинк, обнаруженный в составе бактериохлорофилла у аэробной бактерии *Acidiphilum rubrum*.

Участие магния в обмене веществ растительной клетки связано с его способностью регулировать работу ряда ферментов. Магний является кофактором почти всех ферментов, катализирующих перенос фосфатных групп, необходим для работы многих ферментов гликолиза и цикла Кребса, а также спиртового и молочнокислого брожения. Магний в концентрации не менее 0,5 мМ требуется для формирования рибосом и полисом, активации аминокислот и синтеза белков. При повышении концентрации магния в растительных клетках активируются ферменты, участвующие в метаболизме фосфата, что приводит к возрастанию содержания в тканях органических и неорганических форм фосфорных соединений.

Магниевое голодание растения испытывают в основном на песчаных и подзолистых почвах. Недосток его в первую очередь сказывается на фосфорном обмене и соответственно на энергетике растения. Дефицит магния также тормозит превращение моносахаридов в полисахариды и вызывает серьезные нарушения в процессах синтеза белка. Магниевое голодание приводит к нарушению структуры пластид — граны слипаются, ламеллы стромы разрываются и не образуют единой структуры, вместо них появляется много везикул.

Внешним симптомом дефицита магния является *межжилковый хлороз*, связанный с появлением пятен и полос светло-зеленого, а затем желтого цвета между зелеными жилками листа. Края листовых пластинок при этом приобретают желтый, оранжевый, красный или темно-красный цвет. Признаки магниевое голодания вначале проявляются на старых листьях, а затем распространяются на молодые листья и органы растения, причем зоны листа, прилежащие к сосудам, дольше остаются зелеными.

6.1.7. Кремний

Кремний является обязательным элементом для хвощей, а диатомовые водоросли строят свои оболочки, концентрируя его из окружающей среды. Некоторые исследователи считают, что кремний не является необходимым элементом для семенных растений. Однако он содержится во всех растениях и накапливается в больших количествах в клеточных стенках. Кремний откладывается в клеточной стенке и межклетниках в виде гидратированных аморфных силикатов ($SiO_2 \cdot nH_2O$). Он способен также образовывать комплексы с полифенолами и, подобно лигнину,

обеспечивать механическую прочность клеточной стенки — ее жесткость и эластичность. Растения, накапливающие Si, имеют очень прочные стебли. Кремний способствует повышению устойчивости растений к грибным заболеваниям. Дефицит кремния может задерживать рост растений. Недостаток его особенно отрицательно сказывается во время репродуктивной стадии развития растительного организма. При исключении кремния из питательной среды наблюдаются серьезные нарушения структуры клеточных оргanelл. У тех видов растений, которые больше накапливают кремния, выше устойчивость к биотическим и абиотическим стрессорам.

6.1.8. Натрий

Натрий является необходимым элементом минерального питания для галофитов и гликофитов с C_4 - или САМ-путями фотосинтеза, которые в качестве акцептора CO_2 используют фосфоенолпируват (см. разд. 2.6.2 и 2.6.3). Натрий им необходим для регенерации ФЭП из пирувата. Имеются многочисленные факты, указывающие, что натрий может заменять калий (особенно при его дефиците) как кофактор ряда ферментов и как осморегулятор (в процессах роста клеток растяжением и движения замыкающих клеток устьиц).

У некоторых галофитов (например, лебеды) натрий, накапливаясь в высоких концентрациях в вакуоли, вносит существенный вклад в осмотический потенциал растения. Это позволяет растениям поглощать воду из почв с низким водным потенциалом (засоленных почвах, при почвенной засухе). Водные галофиты могут использовать электрохимический градиент ионов Na^+ для активного поглощения нитрата с помощью Na^+/NO_3^- -переносчика.

6.2. Микроэлементы

Микроэлементы представляют собой группу незаменимых минеральных элементов, хотя их содержание в расчете на сухую массу растения не превышает 0,01%. Большинство микроэлементов являются составной частью активного центра ферментов и таким образом принимают участие практически во всех процессах жизнедеятельности растительного организма. Их недостаток вызывает ряд серьезных заболеваний и нередко приводит к гибели растений уже в раннем возрасте.

6.2.1. Железо

Железо часто не относят к микроэлементам, исходя из высокого содержания его в тканях и большой потребности в нем растительных организмов. Тем не менее функции, которые выполняет этот элемент в живых системах, сходны с теми, которые характерны для большинства металлов-микроэлементов.

Железо принимает участие в функционировании основных элементов электрон-транспортных цепей дыхания и фотосинтеза, участвует в восстановлении молеку-

лярного азота и нитрата до аммиака, катализирует начальные этапы синтеза молекулы хлорофилла. В составе белков железо может находиться как в гемовой (цитохромы, пероксидаза, каталаза), так и в негемовой форме (например, железосерные кластеры ферредоксина).

Основная масса железа запасается в хлоропластах в форме оранжево-коричневого фосфопротеида — *фитоферритина*. В этом белке содержится 5400—6200 атомов железа в форме оксидов и соединений основного характера, нередко в кристаллической форме — $(\text{FeO} \cdot \text{OH})_8 \cdot (\text{FeO} \cdot \text{OPO}_3\text{H}_2)$, которые покрыты белковой оболочкой толщиной 2—3 нм, что позволяет запастись высокие концентрации железа без ущерба для клетки. Эта оболочка имеет молекулярную массу 480—510 кДа и состоит из 20—24 идентичных субъединиц. Молекулярная масса всего комплекса 900 кДа. Поскольку молекулы фитоферритина велики, их удалось идентифицировать микроскопией в ксилеме и флоэме, что свидетельствует о возможности его передвижения по растению. Процессы иммобилизации железа в фитоферритине осуществляются с участием таких ферментов, как ксантиноксидаза и НАДН-цитохром-*c*-редуктаза.

Железо присутствует в почве чаще всего в окисленной форме (Fe^{3+}) и для усвоения растением должно быть восстановлено (до Fe^{2+}). Недостаток железа, который часто имеет место при переувлажнении на карбонатных почвах, проявляется в пожелтении (хлорозе) листьев и снижении интенсивности окислительно-восстановительных процессов. Адаптивные реакции растения на дефицит элементов питания, в том числе и железа, связаны в первую очередь с повышением их растворимости и доступности для поглощения корневой системой. Повышение доступности различных форм железа в почве достигается за счет его восстановления (Fe^{3+} в Fe^{2+}), уменьшения рН ризосферы и продуцирования растением специальных хелатирующих соединений. Различают два типа адаптивных реакций растений на дефицит железа, которые обозначают как стратегия I и стратегия II.

Первый тип усвоения железа растениями (*стратегия I*), характерный для всех двудольных и многих однодольных растений, заключается в восстановлении Fe^{3+} в Fe^{2+} на поверхности корня (рис. 6.2).

Восстановление железа катализируется Fe-редуктазой, локализованной в плазмалемме клеток корней, и (или) специально секретируемыми фенольными соединениями, такими как *пара*-кумаровая, хлорогеновая и кофейная кислоты. Этому процессу способствует высокая активность H^+ -АТФазы плазмалеммы, которая поддерживает оптимальную кислотность ризосферы на уровне рН 5. Восстановленная форма железа (Fe^{2+}) с помощью специального переносчика поступает в клетки корня и включается в метаболизм.

Второй тип поступления железа в растительный организм (*стратегия II*), имеющий место у злаков, заключается в выделении во внешнюю среду *фитосидерофоров* — непротеиногенных аминокислот, которые способны специфично связывать

ион Fe^{3+} и переносить его внутрь клетки. К таким сидерофорам относятся, например, *мугеневая* и *явневая* кислоты (рис. 6.3), синтез которых инициируется при недостатке железа в почве.

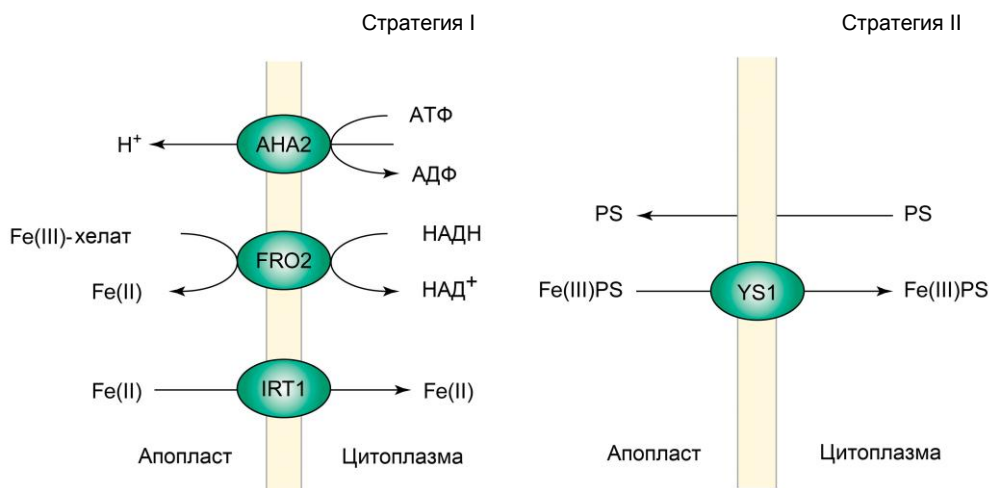


Рис. 6.2. Механизмы поглощения железа растениями (Schmidt, 2003): ANA2 — H^+ -АТФаза; FRO2 — Fe(III)-хелатредуктаза; IRT1 — Fe(II)-переносчик; PS — фитосидерофор; YS1 — переносчик комплекса PS-Fe

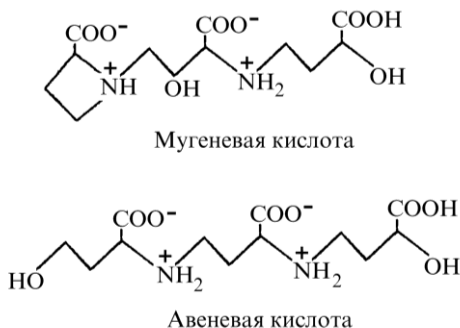


Рис. 6.3. Фитосидерофоры

Интересно, что в ходе эволюции растительных организмов происходило постепенное снижение содержания железа и замена его функций в клетке другими металлами. Из табл. 6.2 следует, что в тканях высших растений его содержание гораздо меньше, чем в низших. Вероятно, многие окислительно-восстановительные реакции с участием железа стали катализироваться другими металлами — марганцем,

молибденом и медью. При этом наиболее сильные изменения в ходе эволюции коснулись отношений Fe/Mn и Fe/Mo.

Таблица 6.2. Содержание железа и соотношение металлов в различных группах растительного царства и хлоропластах (Бойченко и др., 1972)

Растительные объекты	Содержание Fe, мг/кг	Fe/Cu	Fe/Mn	Fe/Mo
Водоросли	1800	70	36	4000
Археогониальные растения	650	50	2	1480
Покрывтосеменные растения	180	10	1	300
Хлоропласты	720	10	1	240

6.2.2. Медь

Медь связана в клетках с ферментами и участвует в окислительно-восстановительных превращениях ($\text{Cu}^{2+} + e^- \leftrightarrow \text{Cu}^+$). Ионы меди образуют стабильные комплексы с органическими соединениями в большей степени, чем другие металлы. Поэтому почти вся медь прочно связана с белками. У арабидопсиса выявлено более 100 белков, в состав которых входит медь.

Около 50% меди, находящейся в хлоропластах, сконцентрировано в составе голубого белка *пластоцианина*, осуществляющего перенос электронов между фотосистемами II и I. Медь входит в состав рецепторов фитогормона этилена. В восстановленной форме медь легко передает электроны прямо на кислород. Она входит в состав таких оксидаз, как цитохромоксидаза, супероксиддисмутаза, полифенолоксидаза и аскорбатоксидаза.

При дефиците меди в первую очередь нарушается лигнизация клеточных стенок, снижается интенсивность процессов дыхания и фотосинтеза. Начальные симптомы недостатка меди проявляются в темно-зеленой окраске и некротических пятнах на молодых листьях. При ее недостатке наблюдается задержка роста и цветения, потеря тургора, завядание и ранний листопад. У злаков при острой нехватке меди белеют кончики листьев, и колос не развивается; у плодовых деревьев появляется суховершинность. В Австралии встречаются бедные медью пустынные почвы, где не выживают ни растения, ни животные.

Высокая реакционная способность ионов меди делает их токсичными даже в небольших концентрациях. В частности медь нарушает тиоловые мостики, что приводит к нарушению третичной структуры белковых молекул. Поэтому транспорт меди осуществляется в виде комплекса со специальными белками-шаперонами. Обнаружены белки *металлотIONEИНЫ*, которые синтезируются в ответ на воздействие по-

вышенных концентраций тяжелых металлов. Эти небольшие белки, состоящие на 30% из цистеина, способны связывать до 6—7 атомов таких металлов, как медь, цинк, кадмий и ртуть. В детоксикации меди и кадмия могут также участвовать и *фитохелатины* — низкомолекулярные пептиды, обогащенные цистеином.

6.2.3. Цинк

В растениях цинк присутствует только в двухвалентной форме и в окислительно-восстановительных реакциях не участвует (в отличие от других микроэлементов-металлов).

Ионы Zn^{2+} входят в состав многих ферментов гликолиза, а также карбоангидразы, карбоксипептидазы, супероксиддисмутаза, алкогольдегидрогеназы, щелочной фосфатазы, фосфолипазы, РНК-полимеразы. Установлено, что цинк входит в состав активного центра рецептора ауксина — белка AVR1. Цинк также необходим для синтеза аминокислоты триптофана, который является предшественником фитогормона индолилуксусной кислоты. Поэтому подкормка цинком способствует увеличению содержания ауксинов в тканях и активизирует рост растений. Идентифицированы факторы транскрипции, у которых имеются цинксодержащие домены, называемые *цинковыми пальцами*.

При дефиците цинка нарушается фосфорный обмен: возрастает содержание неорганического фосфата, замедляется его превращение в органические формы, снижается содержание фосфора в составе нуклеотидов, нуклеиновых кислот и фосфолипидов. Весьма чувствительны к дефициту этого элемента плодовые деревья и особенно цитрусовые. Наиболее характерный признак цинкового голодания — задержка роста междоузлий и листьев, что внешне проявляется в мелколистности и розеточности.

6.2.4. Марганец

Необходимость марганца как кофермента оксидаз впервые показал еще в 1897 г. французский биохимик Г. Бертран (G. Bertrand). Он же первым высказал предположение, что микроэлементы являются составной частью ферментов. Установлено, что марганец необходим для работы ФЭП-карбоксилазы, Mn-супероксиддисмутазы, ФЭП-карбоксикиназы, малик-энзима, изоцитратлиазы. Марганец активирует отдельные реакции цикла Кребса, азотного обмена и вторичного метаболизма, необходим для работы РНК-полимеразы II и ауксиноксидазы. Марганец участвует в фотолизе воды, функционируя в составе кислородвыделяющего комплекса фотосистемы II.

При недостатке марганца резко снижается выделение кислорода при фотосинтезе и содержание углеводов, особенно в корневой системе. Симптомы дефицита марганца проявляются у двудольных растений в форме *межжилкового хлороза*, у злаков — в виде зеленовато-серых пятен на листьях. Листья приобретают светло-зеленый, серый или красный оттенок.

6.2.5. Молибден

Лишь немногие из растительных белков содержат молибден. Молибден поступает в растения в форме аниона (MoO_4^{2-}) и концентрируется в молодых растущих органах. Наибольшее содержание молибдена характерно для бобовых растений. Его больше в листьях, чем в корнях и стеблях, а в листе он сосредоточен в основном в хлоропластах. Молибден иногда называют *микроэлементом азотного обмена*, поскольку он входит в состав активного центра таких ферментов, как *нитратредуктаза* и *нитрогеназа*. При недостатке Mo в тканях накапливается большое количество нитратов, не развиваются клубеньки, тормозится рост растений, деформируются листовые пластинки.

Молибден, как и железо, необходим для синтеза *леггемоглобина* — белка-переносчика кислорода в клубеньках. При его дефиците клубеньки приобретают желтый или серый цвет, нормальная же их окраска красная. Известно более 20 Mo-содержащих ферментов, к числу которых относятся альдегидоксидаза (катализирует, например, превращение абсцизового альдегида в фитогормон абсцизовую кислоту), сульфитоксидаза (осуществляет окисление SO_3^{2-} до SO_4^{2-}), ксантиндегидрогеназа. В вышеперечисленных ферментах молибден присутствует в виде молибдоптерина, называемого молибденовым кофактором (Mo-co), что обеспечивает устойчивость молибдена к окислению (рис. 6.4).

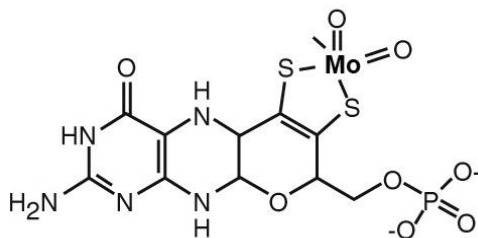


Рис. 6.4. Молибденовый кофактор — молибдоптерин

Молибден необходим растениям в меньших количествах, чем другие микроэлементы. Его дефицит растения часто испытывают на кислых почвах, т. к. в них молибден малоподвижен. Внешне признаки недостатка молибдена напоминают азотное голодание растений: тормозятся ростовые процессы и из-за нарушения синтеза хлорофилла растения выглядят бледно-зелеными. В пораженных участках тканей появляются перфорации, а по краям листьев — разрывы. Наиболее чувствительны к дефициту молибдена растения рода *Brassica*. Для них характерен специфический симптом недостатка молибдена — нитевидность листьев (удлинение листа происходит быстрее, чем развивается листовая пластинка).

6.2.6. Бор

Бор является одним из наиболее важных микроэлементов растений, хотя не требуется животным и грибам. В растениях бор может находиться в свободной форме — $B(OH)_3$, $B(OH)_4^-$ и в виде комплексов с органическими соединениями. Мембранный транспорт бора может осуществляться пассивной диффузией, с помощью аквапоринов (NIPs), а также активным путем — анионными обменниками (BORs).

В отличие от микроэлементов-металлов, бор не является компонентом или активатором ферментов. Тем не менее, он принимает участие в метаболизме фенолов, углеводов и нуклеиновых кислот, ауксиновом обмене, в формировании структуры клеточных стенок, регуляции процессов роста и развития.

В клетке большая часть бора представлена комплексными соединениями с полисахаридами клеточной стенки. До 60—80% бора клеточных стенок связано с пектиновым полисахаридом — *рамногалактуронаном II*. Считают, что бораты сшивают мономеры рамногалактуронана II в димеры, что необходимо в процессе роста растяжением растительной клетки.

Предполагают, что ряд физиологических эффектов, вызываемых бором, может быть связан с регулированием в клеточных компартментах содержания ионизированного кальция. Бор является хорошим комплексообразователем и так же, как и кальций, легко образует координационные связи с веществами, имеющими соседние ОН-группы в *цис*-положении. Следовательно, существует возможность прямой конкуренции между бором и кальцием за места связывания на полимерах клеточной стенки.

Без бора в первую очередь нарушаются процессы формирования репродуктивных органов, созревания семян и плодоношения. Он усиливает рост пыльцевой трубки, увеличивает количество цветков и плодов. Обнаружено значительное содержание бора в цветках, особенно в рыльце и столбиках. В этом элементе особенно нуждаются двудольные растения, которым он необходим в течение всего развития. Бор не может реутилизироваться, и поэтому типичным симптомом его дефицита является отмирание конусов нарастания и подавление роста корней. В отличие от двудольных, злаки при недостатке бора могут развиваться нормально вплоть до формирования репродуктивных органов.

6.2.7. Кобальт и никель

Кобальт необходим высшим растениям для фиксации молекулярного азота бактероидами и поэтому он концентрируется в клубеньках. В растениях кобальт встречается в ионной форме и как порфириновое соединение — *цианокобаламин (витамин B_{12})*. Растения, как и животные, не способны синтезировать витамин B_{12} . Он вырабатывается бактероидами клубеньков бобовых и небобовых растений. Внешние проявления дефицита кобальта похожи на симптомы азотного голодания.

Никель и кобальт тесно связаны геохимически, их атомные массы близки и поэтому они оказывают сходное воздействие на физиологические процессы. В высших

растениях никель входит в состав фермента *уреазы*, расщепляющей мочевины на аммиак и углекислоту. Этот фермент с молекулярной массой 590 кДа состоит из шести субъединиц, каждая из которых содержит по два атома никеля.

6.2.8. Хлор

Хлор является необходимым микроэлементом для высших растений. В растительных тканях хлор находится в виде аниона или в связанном состоянии. Наиболее важная функция, которую хлор выполняет в растениях, — это участие в фотоокислении воды и выделении кислорода. Ионы Cl^- (наряду с калием) могут принимать участие в регулировании осмотического давления в вакуоли, где хлор концентрируется в значительном количестве. Ионы Cl^- служат противоионом при нейтрализации положительных зарядов органических и неорганических катионов, а также (наряду с калием) принимают участие в процессах электрогенеза растительной клетки.

Большинство почв содержит достаточное количество хлоридов. Однако в районах с большим количеством осадков, а также на песчаных почвах растения могут испытывать дефицит этого элемента. При этом наблюдаются увядание и преждевременное старение листьев, на поверхности стебля появляются трещины, подавляются процессы деления и растяжения клеток.

6.3. Ассимиляция неорганических ионов растениями

Ассимиляцией называют процесс включения минеральных элементов в органические соединения. Для ассимиляции минеральных элементов (особенно азота и серы) необходим целый комплекс биохимических реакций, в том числе и с затратой энергии. Например, в ходе редукции NO_3^- до NH_4^+ расходуется 12 молекул АТФ, в ходе фиксации N_2 требуется 16 молекул АТФ для восстановления одного атома азота, а на пути от SO_4^{2-} до цистеина расходуется 14 молекул АТФ. Процесс ассимиляции ряда других элементов, особенно Ca^{2+} , Mg^{2+} и микроэлементов, включает формирование комплексов, в которых металлы связываются с органическими соединениями координационными связями с образованием хелатов. Эти металлоорганические комплексы очень стабильны и при удалении металла теряют свои функции.

6.3.1. Превращение азота в почве микроорганизмами

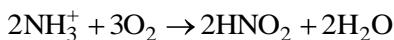
Живые организмы различаются по способности ассимилировать различные формы азотистых соединений. Микроорганизмы способны усваивать молекулярный азот, растения могут использовать лишь минеральные формы азота, а животные — только азот органического происхождения. У растительных организмов первичное

включение азота в аминокислоты происходит только в аммонийной форме. Именно с аммония начинается азотный обмен растения, аммонием он и завершается. Поэтому Д. Н. Прянишников назвал аммиак "альфой и омегой азотного обмена".

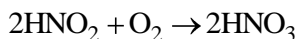
При возделывании сельскохозяйственных культур запасы азота в почве можно пополнить за счет минеральных удобрений. В естественных же условиях это осуществляется различными группами микроорганизмов, одни из которых способны превращать недоступный для растений органический азот в NH_4^+ и NO_3^- , а другие связывают молекулярный азот атмосферы. Фундаментальные исследования биологических процессов, происходящих в почве с участием микроорганизмов, были проведены С. Н. Виноградским, которого считают основателем *почвенной микробиологии*.

Аммонификация. Процесс разложения органических азотистых соединений (растительных и животных остатков, а также гумуса) гетеротрофными микроорганизмами и превращение их в минеральную форму азота (NH_4^+) называется *аммонификацией*. Бактерии-аммонификаторы используют в качестве источника углерода **и энергии** аминокислоты, что требует от них соответствующего набора ферментов, катализирующих протеолиз белков и пептидов и дезаминирование всего набора аминокислот. В эту группу микроорганизмов входят представители родов *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Proteus*. Следует отметить, что аммонификаторы способны использовать широкий набор органических соединений, в том числе сахаров и органических кислот, которые они, как правило, предпочитают белкам.

Нитрификация. Нитрифицирующие бактерии получают энергию за счет окисления восстановленных форм азота (аммиак, азотистая кислота). Впервые определил хемолитоавтотрофную природу этих бактерий и получил их чистые культуры в 1892 г. С. Н. Виноградский. Процесс нитрификации идет в два этапа и осуществляется двумя группами микроорганизмов. Бактерии родов *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosolobus*, *Nitrosospira* и *Nitrosovibrio* окисляют аммиак до азотистой кислоты:



а затем уже бактерии родов *Nitrobacter*, *Nitrospina* и *Nitrococcus* окисляют нитрит до нитрата:



Нитрит обычно в почве не накапливается, поскольку обе группы микроорганизмов функционируют последовательно. Именно благодаря деятельности этих бактерий в Чили появились огромные запасы натриевой селитры (NaNO_3). Следует отметить также, что нитрификаторы окисляют и аммонийный азот удобрений, переводя его в нитратную форму.

Денитрификация. Содержание доступного растениям азота в почве определяется не только процессами аммонификации, нитрификации, азотфиксации и вымыванием

его из почвы, но и потерями его в ходе процесса *денитрификации*. Процесс денитрификации осуществляется анаэробными прокариотами, которые способны восстанавливать NO_3^- до NO_2^- и газообразных форм азота (N_2O , N_2). В наибольшей степени способность к денитрификации распространена у бактерий родов *Bacillus* и *Pseudomonas*. Физиологическое значение этого процесса — способность генерировать АТФ в анаэробных условиях, используя в качестве конечного акцептора электронов в дыхательной цепи не кислород, а нитрат (*нитратное дыхание*) или нитрит. Наиболее распространенными формами денитрификаторов являются те, которые способны восстанавливать NO_3^- или NO_2^- до N_2 . Все денитрифицирующие бактерии — факультативные анаэробы, переключающиеся на денитрификацию только в отсутствие O_2 . Поэтому этот процесс особенно активно идет на влажных затопляемых слабоаэрируемых почвах. Потери азотных удобрений в результате денитрификации могут достигать до 80%. Во избежание этих потерь применяют рыхление почвы или различные ингибиторы денитрификации.

Азотфиксирующие микроорганизмы. Способностью к фиксации молекулярного азота обладают исключительно прокариоты. Основная масса азота, содержащегося в живых организмах, своим происхождением обязана деятельности уникальной группы микроорганизмов, которые ассимилируют молекулярный азот атмосферы, восстанавливая его до аммиака. Микроорганизмы, осуществляющие процесс фиксации молекулярного азота, делятся на свободноживущих азотфиксаторов и живущих в симбиозе с растениями.

Впервые свободноживущие бактерии, способные к азотфиксации в анаэробных условиях, были выделены С. Н. Виноградским в 1893 г. и названы *Clostridium pasteurianum* в честь Луи Пастера (L. Pasteur). Позднее в 1901 г. Мартин Бейеринк (M. Beijerinck) открыл свободноживущие аэробные азотфиксирующие бактерии рода *Azotobacter*. Группа *свободноживущих азотфиксаторов* включает бактерии родов *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Bacillus*, *Klebsiella*, некоторые штаммы *Clostridium*, цианобактерии родов *Anabaena*, *Calothrix*, *Gloeotrichia*, *Nostoc*, фотосинтезирующие бактерии родов *Chromatium* и *Rhodospirillum*, археи *Methanococcus*.

6.3.2. Фиксация азота клубеньковыми бактериями

Заслуга открытия *клубеньковых бактерий* в клубеньках бобовых растений принадлежит основоположнику отечественной микологии и фитопатологии М. С. Воронину. Еще в 1866 г. он дал описание и рисунки этих микроорганизмов в различные фазы развития клубенька настолько точно, что они мало отличаются от современных. К группе *симбиотических азотфиксаторов* относятся бактерии родов *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Photorrhizobium*, *Rhizobium* и *Sinorhizobium*, образующие клубеньки на корнях бобовых растений, а также некоторые *актиномицеты* (актинобактерии) и *цианобактерии*. Насчитывается более 200 видов небобовых растений, относящихся к родам *Alnus*, *Coriaria*, *Myrica*, *Casuarina*, *Elaeagnus*, *Hippophaea*, *Shepherdia*, *Ceanothus*, *Discaria*, которые способны в симбиозе с микро-

организмами фиксировать молекулярный азот. Эти растения представлены главным образом древесными формами (ольха, восковница, лох, облепиха и др.).

Клубеньки, формирующиеся на корнях ольхи и некоторых других небобовых растений, заселены актиномицетами (актинобактериями) рода *Frankia*. Этот тип растительно-бактериального симбиоза, называемый *актиноризой*, выявлен более чем у 20 родов покрытосеменных растений.

У травянистых растений рода *Gunnera* клубеньки образуются на стеблях цианобактериями рода *Nostoc*. Фиксирующие азот цианобактерии рода *Anabaena* поселяются в полостях листьев водного папоротника *Azolla*.

Nod-факторы. Процесс симбиотической азотфиксации идет в клубеньках — специализированных органах растения-хозяина (рис. 6.5).

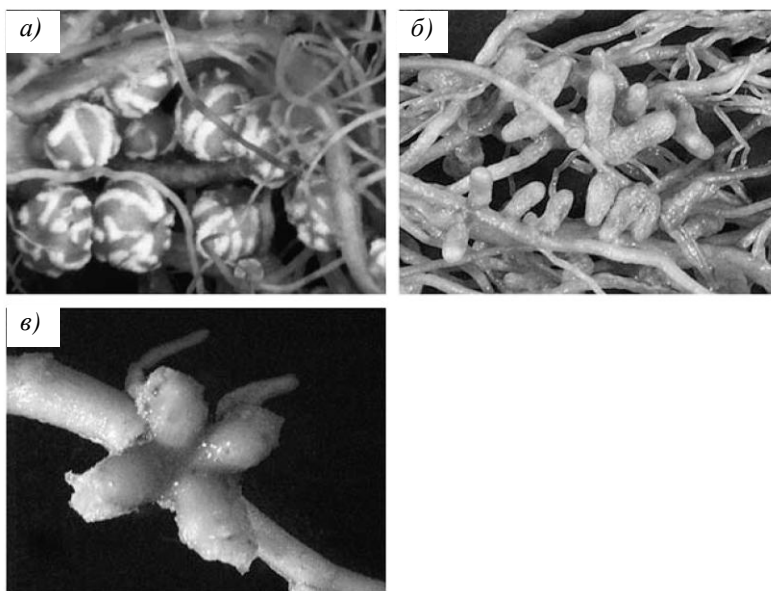


Рис. 6.5. Клубеньки, вызванные инфицированием ризобиями у сои *Glycine max* (а) и гороха *Pisum sativum* (б) и актиноризные клубеньки (в) у датиски *Datisca glomerata* (Vessey et al., 2005)

Формирование клубеньков инициируется сигнальными молекулами липо-олигосахаридной природы — *Nod-факторами*. Жирные кислоты, входящие в состав *Nod-факторов*, содержат 16—20 атомов углерода, а количество молекул ацетилглюкозамина составляет 3—5 (рис. 6.6).

Nod-факторы синтезируются *клубеньковыми бактериями (ризобиями)* в ответ на определенные виды флавоноидных соединений (см. разд. 15.2.3), выделяемых семенами и корнями бобовых растений. Флавоноиды активируют у ризобий гены вирулентности, которые называются *nod-генами* (nodulation — клубенькообразование).

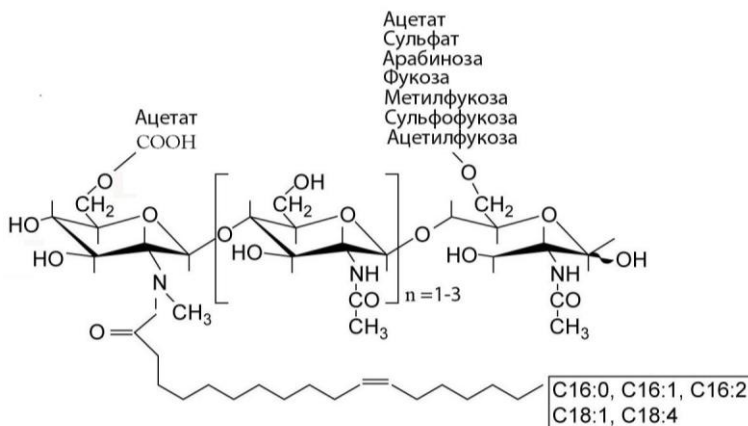


Рис. 6.6. Структура Nod-фактора

Найдено около 50 *nod*-генов, мутации в которых нарушают способность ризобий к формированию клубеньков. Гены, связанные с образованием клубеньков бобовых растений, делят на три группы. Первая группа включает гены, которые найдены у всех ризобий и являются для них общими (гомологичными): *nodA*, *nodB*, *nodC*. Ко второй группе относятся гены, отличающиеся у различных видов или даже штаммов клубеньковых бактерий: *nodP*, *nodQ*, *nodH*, *nodF*, *nodE*, *nodL*. Именно эта группа генов определяет специфичность бобово-ризобиального симбиоза.

К третьей группе относится ген *nodD* — единственный конститутивно работающий ген вирулентности ризобий, в то время как экспрессия других *nod*-генов является индуцибельной. Ген *nodD* начинает экспрессироваться на самых первых этапах взаимодействия бобовых растений и ризобий, когда секретируемые корнями аттрактанты (различные изофлавоноиды, флавоноиды и бетаины) индуцируют передвижение бактерий в направлении растения-хозяина. Аттрактанты вызывают активацию регуляторного NodD-белка, который приобретает способность индуцировать транскрипцию остальных *nod*-генов. Процесс транскрипции инициируется при связывании NodD-белка с консервативной последовательностью, называемой *nod-box*, которая расположена в промоторах индуцибельных генов вирулентности. Бактериальные гены, ответственные за формирование клубеньков, обычно называют *nod*-генами, а гены растительных клеток — *Nod*-генами.

Большинство *nod*-генов кодирует синтез ферментов, участвующих в синтезе Nod-факторов. Гены, общие для всех ризобий (*nodA*, *nodB*, *nodC*), кодируют образование ферментов, необходимых для формирования основной структуры (остова) Nod-фактора. Его специфичность определяется строением жирно-кислотной цепи или рядом других замещений, катализируемых ферментами, которые кодируются уже другими генами. Структура Nod-фактора определяет специфичность и характер взаимодействия бактерий с корневой системой растения.

Рецептором Nod-фактора является локализованная в плазмалемме клеток эпидермиса корня рецепторная киназа LysM-RLK (lysine motif receptor-like kinase). После взаимодействия Nod-фактора с рецептором индуцируются два типа процессов:

- инфицирование ризобиями клеток эпидермиса;
- формирование клубеньков в клетках коры корня.

В процессе инфицирования в цитоплазме клеток эпидермиса происходит генерация спайков ионизированного кальция, которые через кальмодулин запускают экспрессию генов *ENOD* (early nodulation gene). В передаче нодуляционного сигнала также принимают участие белки NSP1 и NSP2 (nodulation signaling pathway), SCR (SCARECROW), а также репрессоры гиббереллинового сигнала — DELLA-белки (Giles et al., 2008).

Формирование клубеньков. Nod-фактор способствует связыванию ризобий с клетками корневых волосков (рис. 6.7, а), вызывает их искривление (рис. 6.7, б) и локальное разрушение клеточной стенки в месте изгиба (рис. 6.7, в). В процессе разрушения клеточной стенки участвуют гидролитические ферменты обоих партнеров формирующегося симбиоза. Затем происходит впячивание плазмалеммы в цитоплазму, и бактерии попадают внутрь корневого волоска. Вокруг бактерий за счет секреции пузырьков аппарата Гольджи начинает формироваться особая полость, которая называется *инфекционной нитью*.

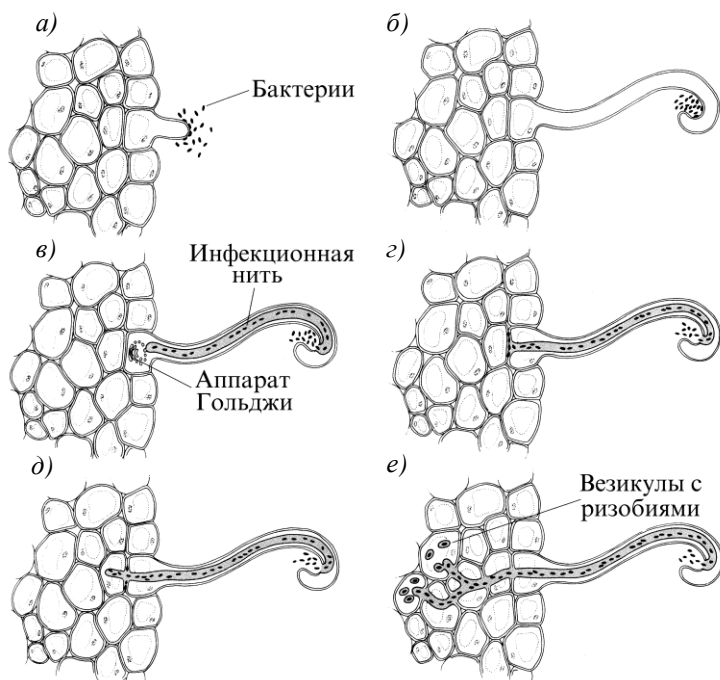


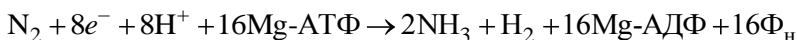
Рис. 6.7. Процесс инфицирования ризобиями клеток коры корня бобовых растений (Taiz, Zeiger, 1998)

Инфекционная нить растет, ветвится, достигает клеток коры корня и вызывает их дедифференцировку (рис. 6.7, *з, д*). Клетки начинают делиться, формировать ограниченную зону внутри коры, называемую *клубеньковым примордием*, из которого затем образуется клубенек. Этот процесс контролируется цитокининами и ауксинами.

В этот же период бактерии из инфекционной нити путем эндоцитоза переходят в другие клетки растения-хозяина (рис. 6.7, *е*). При этом бактерии окружаются так называемой *перибактероидной мембраной* и превращаются в особые симбиотические формы — *бактероиды*. Последние имеют другую форму и большие (в 3—5 раз) размеры, чем свободноживущие ризобии. Именно в них идет процесс симбиотической азотфиксации. Бактероиды, окруженные перибактероидной мембраной, иногда называют *симбиосомами*.

По мере развития в клубеньке формируется собственная сосудистая система и очень плотный, "кожистый" слой клеток, который отделяет его от клеток коры корня и обеспечивает внутри него анаэробные условия. Основными структурами клубенька являются: ткани, в клетках которых идет фиксация молекулярного азота бактероидами; проводящие ткани, по которым осуществляется снабжение клубенька фотоассимилятами и отток азотистых соединений; клетки меристемы, обеспечивающие рост клубенька.

Молекулярный механизм азотфиксации. Нитрогеназа. Молекула азота N_2 ($N \equiv N$) чрезвычайно прочна и химически инертна. Тем не менее большая группа микроорганизмов обладает способностью ассимилировать молекулярный азот путем восстановления его до аммиака с помощью фермента *нитрогеназы*. Процесс редукиции N_2 до NH_3 нитрогеназой, осуществляемый за счет переноса 6 электронов, сопряжен с восстановлением H^+ до H_2 . Суммарно эти реакции можно записать следующим образом:



В состав нитрогеназного комплекса входят два компонента — Fe-белок и Mo-Fe-белок. Азотфиксирующей способностью обладает только комплекс обоих компонентов (рис. 6.8). *Fe-белок* состоит из двух субъединиц, каждая из которых (в зависимости от организма-азотфиксатора) имеет молекулярную массу от 30 до 72 кДа. *Fe-белок* содержит один железосерный кластер (Fe_4S_4), который очень чувствителен к кислороду. *Mo-Fe-белок* имеет 4 субъединицы общей молекулярной массой от 180 до 235 кДа. Два атома молибдена связаны в двух Mo-Fe-S-кластерах. Этот белок также содержит несколько железосерных кластеров и инактивируется кислородом.

В реакциях, связанных с восстановлением азота, принимают участие *ферредоксин* и *флаводоксин*, которые служат донором электронов в процессе восстановления Fe-белка нитрогеназы (рис. 6.8). На следующем этапе с Fe-белком связывается АТФ. Далее происходит гидролиз АТФ, инициирующий конформационные изменения Fe-белка, который приобретает способность восстанавливать Mo-Fe-белок. На заключительном этапе электроны через Mo-Fe-S-кластеры поступают на N_2 и восстанавливают его до NH_3 .

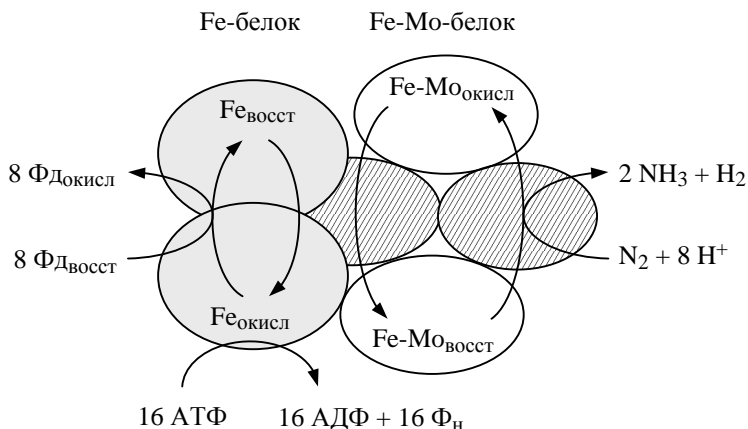


Рис. 6.8. Схематическое строение и процессы, катализируемые нитрогеназой

Нитрогеназа может восстанавливать не только N₂, но также и другие субстраты (например, N₂O → N₂, C₂H₂ → C₂H₄, 2H⁺ → H₂). Экспериментаторы часто используют для оценки активности нитрогеназы способность фермента восстанавливать C₂H₂ до C₂H₄ (для прямого же измерения процесса фиксации N₂ необходим масс-спектрометр).

Поскольку нитрогеназа разрушается в присутствии кислорода, у азотфиксирующих микроорганизмов имеется ряд механизмов ее защиты. У ризобий эту функцию выполняет кислородсвязывающий гемопротеид *леггемоглобин* (легоглобин), придающий клубенькам розовую окраску. Леггемоглобин присутствует в цитоплазме клеток клубенька в очень высокой концентрации (0,7 мМ в клубеньках сои). Белок глобин синтезируется в клетках растения-хозяина, а гем — в клетках, содержащих бактериоды.

Леггемоглобин обладает очень высоким сродством к кислороду, его полунасыщение наступает уже при 10—20 нМ O₂, в то время как у гемоглобина крови оно наблюдается при 126 нМ O₂. Этот белок обеспечивает транспорт O₂ к бактериодам и защищает таким образом нитрогеназу от разрушения.

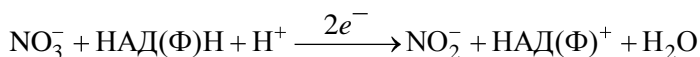
В бактериодах функционирует цикл Кребса, который не только снабжает (через ферредоксин) нитрогеназу электронами, но такжеставляет дыхательные субстраты для синтеза АТФ и снабжает бактериоды кетокислотами (2-оксоглутаровой и др.), которые взаимодействуют с аммиаком и образуют аминокислоты, транспортируемые в надземную часть растения. Основными транспортными формами азота у большинства бобовых растений являются *глутамин*, *аспарагин* и *уреиды* — аллантоин, аллантоиновая кислота и цитруллин.

Расчеты показывают, что на связывание 1 г молекулярного азота растение затрачивает до 12 г углерода органических соединений. При этом необходимо учитывать, что эффективность азотфиксации снижается за счет того, что до 30—60% энергии

может расходоваться (и теряться) на процесс восстановления H^+ до H_2 , поскольку протоны конкурируют с молекулярным азотом за электроны, поступающие в каталитический центр фермента. Однако некоторые ризобии имеют фермент гидрогеназу, который, расщепляя H_2 , может поставлять электроны для редукции молекулярного азота. Эффективность использования энергетических субстратов у азотфиксаторов-симбионтов выше, чем у свободноживущих микроорганизмов, поскольку, например, *Azotobacter* для восстановления 1 г N_2 использует до 28—40 г углерода органических соединений.

6.3.3. Ассимиляция нитрата

Нитрат, попадая в растение, восстанавливается до аммония, который затем включается в аминокислоты. Процесс *редукции нитрата* в растениях осуществляется в два этапа. На первом этапе происходит восстановление нитрата до нитрита, сопряженное с переносом двух электронов и катализируемое ферментом *нитратредуктазой*:



Нитратредуктаза высших растений является димером, который состоит из двух идентичных субъединиц с молекулярной массой 100 кДа. Каждая белковая субъединица включает молибденовый кофактор (МоСо), молекулы гема и ФАД (рис. 6.9).

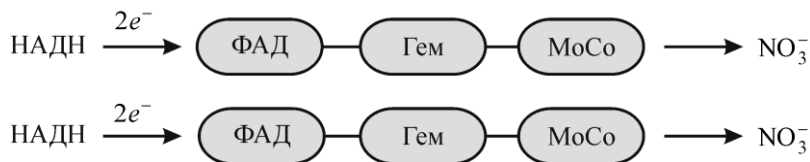


Рис. 6.9. Димер нитратредуктазы

Молибден включается в фермент в виде комплекса (хелата) с соединением, называемым *птерином* (см. рис. 6.4). В процессе восстановления нитрата электроны от НАДФ передаются на ФАД-содержащий домен, а затем через гем-содержащий домен поступают на молибденовый комплекс фермента и далее на нитрат. В каждой из субъединиц имеет место двухэлектронный перенос. Редукция нитрата непосредственно идет на Мо-содержащем комплексе фермента.

Нитрит — очень активный и токсичный ион, поэтому в растениях он быстро восстанавливается до аммония нитритредуктазой. *Нитритредуктаза* состоит (рис. 6.10) из полипептида с молекулярной массой 63 кДа и включает три домена: ферредоксин-связывающий, содержащий железосерный кластер (Fe_4S_4) и сирогем (рис. 6.11).

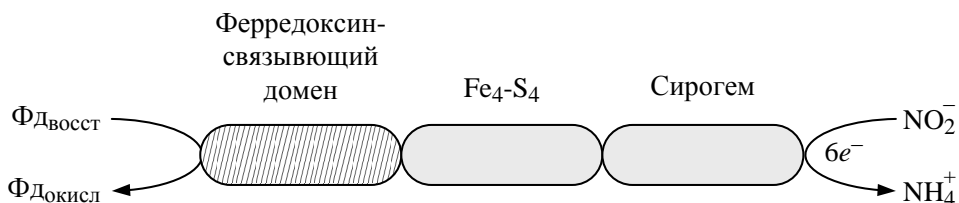


Рис. 6.10. Нитратредуктаза

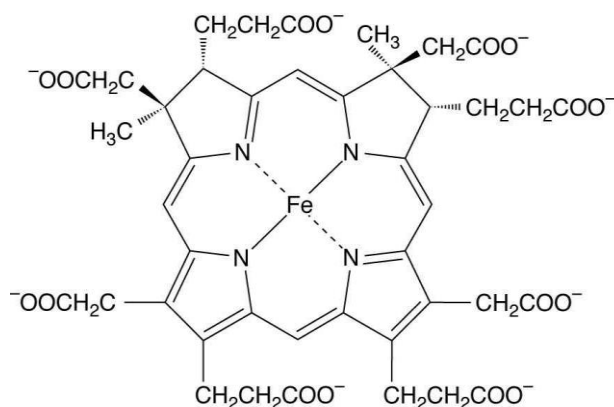
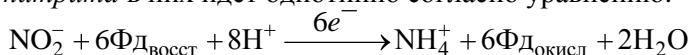


Рис. 6.11. Сирогем

Следует отметить, что железосерный кластер (Fe_4S_4) нитритредуктазы принимает участие не только в восстановлении нитрита, но и в процессе редукции сульфата. Несмотря на то, что листья и корни содержат разные формы этого фермента, процесс *редукции нитрита* в них идет однотипно согласно уравнению:



Нитритредуктаза осуществляет перенос шести электронов от 6 молекул восстановленной формы ферредоксина ($Ф_{Д_{восст}}$) на нитрит с образованием аммиака. Восстановление ферредоксина в листьях происходит за счет фотосинтетического транспорта электронов, а в гетеротрофных тканях — за счет окисления НАДФН, синтезируемого в пентозофосфатном пути окисления глюкозы.

Анализ кинетики процесса восстановления нитрита показывает, что пара переносчиков электронов Fe_4S_4 -гем (работающая в сопряженном режиме) связывает нитрит на ферменте и восстанавливает его сразу до аммония. Поэтому превращение $NO_2^- \rightarrow NH_4^+$ происходит без образования (накопления) каких-либо промежуточных продуктов во внешней среде.

Нитритредуктаза листьев кодируется ядерным геномом, синтезируется в цитоплазме, транспортируется в хлоропласт, где осуществляется окончательная сборка фермента. Нитрат, свет и сахара активизируют процесс транскрипции нитритредуктазных мРНК, а аспарагин и глутамин подавляют этот процесс.

Следует отметить, что ассимиляция нитрата может успешно идти как в побегах, так и в корнях растения. Если нитрата мало, он ассимилируется в корнях. Когда ионов NO_3^- много, они поступают в листья, где восстанавливаются до аммония.

6.3.4. Ассимиляция аммония

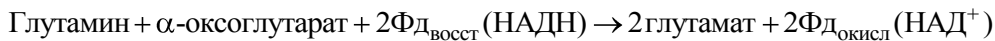
Ионы аммония, образовавшиеся при восстановлении нитратов, фиксации молекулярного азота или поступившие из почвы, усваиваются далее растениями путем образования различных аминокислот и амидов. Первичные пути этого процесса связаны, в первую очередь, с активностью двух ферментов — глутаминсинтетазы и глутаматсинтазы.

Глутаминсинтетаза (ГС) присоединяет ион аммония к глутаминовой кислоте (глутамат) с образованием амида глутамина. Эта реакция требует АТФ и ионов Mg^{2+} :



Фермент глутаминсинтетаза состоит из 8 почти идентичных субъединиц, молекулярная масса всего комплекса достигает 350 кДа. В растениях имеются две формы глутаминсинтетазы, которые отличаются по структуре, свойствам и функциям. Одна из них локализована в цитоплазме, а вторая — в хлоропластах и пропластидах.

Активность *глутаматсинтазы* (называемой также ГОГАТ — глутамин-2-оксоглутаратаминотрансфераза) стимулируется при увеличении содержания глутамина. Этот фермент осуществляет перенос одной аминокислотной группы глутамина на α -оксоглутаровую кислоту с образованием двух молекул глутаминовой кислоты:

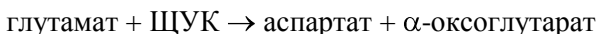


В растениях встречается два типа ГОГАТ: донором электронов для первого типа фермента является НАДН, а для второго — восстановленный ферредоксин. НАДН-зависимая ГОГАТ функционирует в корнях (участвует в ассимиляции поглощенного аммиака) и в сосудах молодых листьев (обеспечивает реутилизацию азота глутамина, поступающего из стареющих листьев). Ферредоксин-зависимый тип ГОГАТ синтезируется в цитоплазме и с помощью специального пептида переносится в хлоропласты, где принимает участие в образовании глутамата.

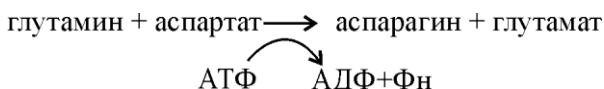
Помимо основного способа ассимиляции аммония, связанного с активностью глутаминсинтетазы и глутаматсинтазы, в растительном организме имеются и альтернативные пути, в которых участвуют другие ферменты. *Глутаматдегидрогеназа* катализирует реакцию, которая приводит к синтезу глутаминовой кислоты:



Аспаратаминотрансфераза способна переносить аминогруппу с глутамата на щавелевоуксусную кислоту (ЩУК) с образованием аспарагиновой кислоты (аспартат):



Именно таким путем в растительных клетках образуется большинство аспартата. *Аспарагинсинтетаза* обеспечивает переброс аминогруппы с глутамина на аспарагиновую кислоту с образованием амида — аспарагина:



Сильное освещение и высокий уровень углеводов повышают активность ферментов основного пути ассимиляции аммония (ГС и ГОГАТ), но угнетают активность аспарагинсинтетазы. При снижении интенсивности фотосинтеза аспарагинсинтетаза активируется и возрастает содержание аспарагина — основной запасной и транспортной формы азота в тканях растения.

6.3.5. Ассимиляция сульфата

Процесс включения серы в органические соединения состоит из трех этапов. На первом этапе происходит активация сульфата под действием фермента *АТФ-сульфуриказы*, который катализирует отщепление пирофосфата от молекулы АТФ и замещение его на сульфат:

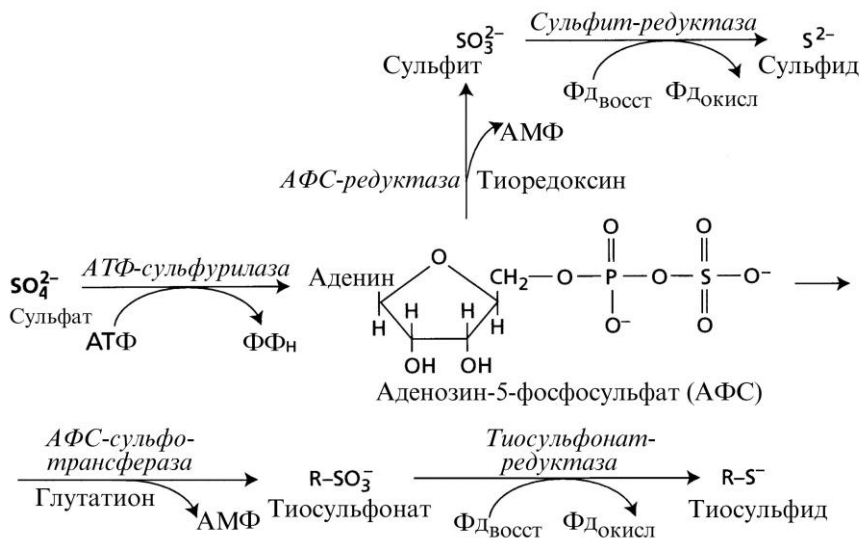
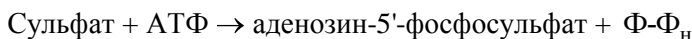


Рис. 6.12. Восстановление аденозин-5'-фосфосульфата до сульфита и затем до сульфида

В результате этой реакции относительно инертный сульфат преобразуется в аденозин-5'-фосфосульфат (АФС) и приобретает, таким образом, способность включаться в обмен веществ.

На втором этапе ассимиляции происходит восстановление сульфата АФС вначале до *сульфита* (SO_3^{2-}), а затем до *сульфида* (S^{2-}). В ходе редукции сульфата АФС может также иметь место образование комплекса фермент-тиосульфат ($\text{R}-\text{SO}_3^-$), который далее восстанавливается в тиосульфид ($\text{R}-\text{S}^-$) (рис. 6.12).

На третьем этапе тиосульфид ($\text{R}-\text{S}^-$) или сульфид (S^{2-}) взаимодействуют с О-ацетилсерином с образованием *цистеина* и уксусной кислоты (рис. 6.13).

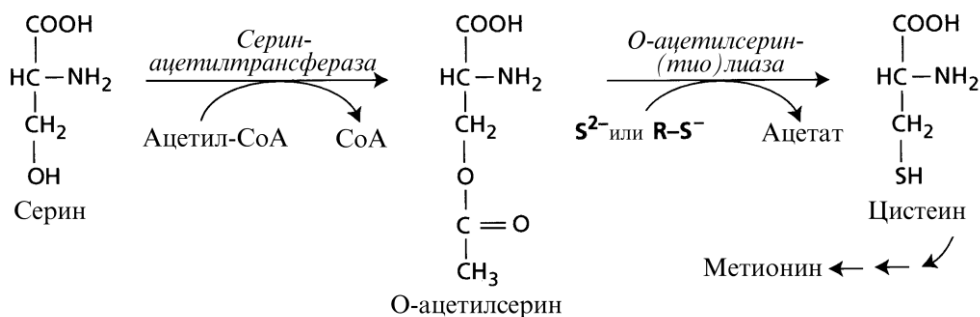


Рис. 6.13. Синтез цистеина из ацетилсерина

Фермент О-ацетилсеринтиолиаза, участвующий в синтезе цистеина, обнаружен в цитоплазме, пластидах и митохондриях растительных клеток. Цистеин в свою очередь служит предшественником еще одной серосодержащей аминокислоты — *метионина*.

В процессе превращения сульфата до цистеина происходит изменение валентности серы от +6 до -4, что требует притока 10 электронов. Донорами электронов на различных этапах восстановления сульфата служат глутатион, ферредоксин (Фд), тиоредоксин, НАД(Ф)Н и О-ацетилсерин. Процесс редукции сульфата обычно активнее идет в листьях, поскольку фотохимические реакции, протекающие в хлоропластах, обеспечивают восстановление ферредоксина и тиоредоксина, а в процессе фотодыхания синтезируется серин, из которого образуется О-ацетилсерин, необходимый для синтеза цистеина.

Транспорт ассимилированной в листьях серы к местам синтеза белков осуществляется в форме трипептида *глутатиона* (глу-цис-гли). Глутатион также является сигнальной молекулой, которая координирует процессы поглощения сульфата корневой системой и его ассимиляции в надземной части растения.

6.4. Микориза

Процессы "добывания" элементов минерального питания в естественных условиях у большинства растений могут быть модифицированы при образовании ассоциации с грибами, образующими микоризы. *Микориза* представляет собой симбиоз между грибом и корневой системой растения. Микоризные симбиозы представляют собой континуум от мутуалистических до паразитических взаимоотношений, и положение в нем определяется видовой принадлежностью симбионтов, факторами окружающей среды и возрастной стадией симбиоза. Более 80% наземных растений принимает участие в микоризных симбиозах.

Микориза может отсутствовать у корней на сухих и засоленных почвах, при выращивании растений в гидропонике, при избытке или нехватке удобрений, а также у растений с коротким циклом развития. Существуют два типа *микоризообразующих грибов* — эктотрофные и эндотрофные.

Эктотрофные микоризные грибы формируют толстый чехол грибного мицелия вокруг корня растения и лишь некоторые гифы его внедряются между клетками коры корня (рис. 6.14). При этом гифы не проникают внутрь клетки, а образуют межклеточную структуру, называемую *сетью Хартига* в честь немецкого ботаника Теодора Хартига (Th. Hartig). Нередко масса мицелия сравнима с массой корня. Мицелий гриба проникает также и между частицами почвы. Эктомикориза чаще имеет место у древесных видов растений или кустарников. Эктомикоризу формируют около 6 тыс. видов грибов и 5—6 тыс. видов растений.

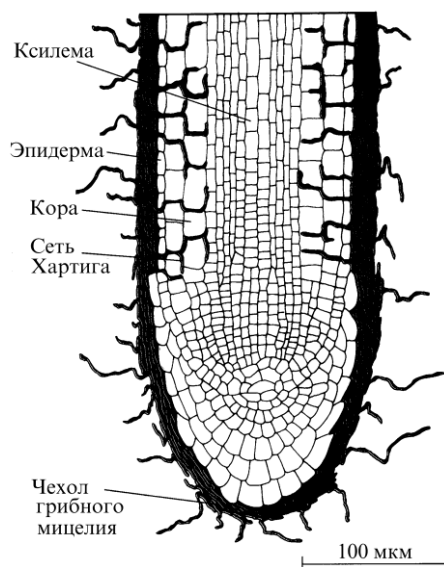


Рис. 6.14. Корень, инфицированный эктотрофными микоризообразующими грибами (Rovira et al., 1983)

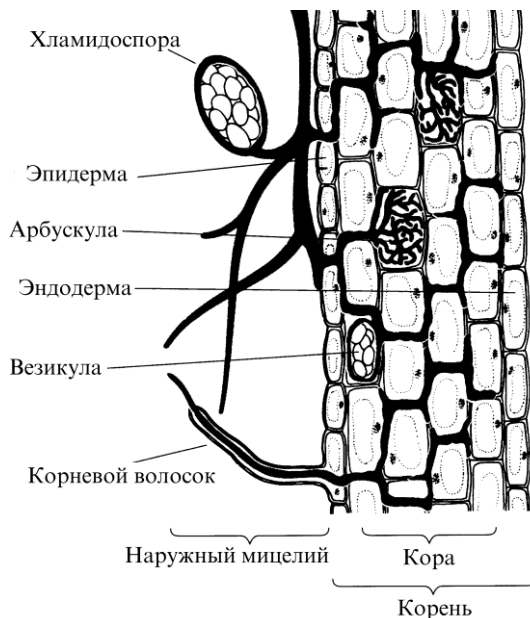


Рис. 6.15. Ассоциация везикулярно-арбускулярных микоризообразующих грибов с клетками коры корня (Mauseth, 1988)

Эндотрофные микоризные грибы формируют *арбускулярную микоризу*, которая составляет не более 10% массы корня (рис. 6.15). При этом гифы глубоко внедряются между клетками коры корня и проникают в отдельные клетки. Внутри клетки коры корня гифы образуют два типа структур: овальные, называемые *везикулами*, или разветвленные, которые называют *арбускулами*. Местом передачи элементов питания между растением-хозяином и грибом являются именно арбускулы. Арбускулярную микоризу формируют более 200 видов грибов и около 300 тысяч видов растений. На расстоянии нескольких сантиметров от корня гриб формирует структуры — *хламидоспоры*, имеющие отношение к спорообразованию.

Микориза облегчает поглощение корнями труднодоступных соединений фосфора, а также азота, меди и цинка. Посчитано, что гифы арбускулярной микоризы могут обеспечить до 80% фосфора и до 25% азота от общей потребности растения. Интересно, что если растение обеспечено минеральными элементами в достаточной степени, микориза не образуется. В том случае, когда какого-либо элемента питания не хватает, микориза начинает формироваться.

6.5. Удобрения

Получение новых знаний о процессах, происходящих в природе, ценно само по себе, поскольку это является основой общечеловеческой культуры. Однако, в конечном счете, процесс научного поиска обязательно имеет и прикладное значение.

Теоретическая основа современного растениеводства и индустрии удобрений была заложена исследованиями в области минерального питания растений российских агрохимиков А. Т. Болотова, И. И. Комова и Д. Н. Прянишникова, швейцарца Никола́ Теодора Соссюра (N.Th. Saussure), французского агрохимика Жана Батиста Буссенго (J.V. Boussingault) и целой плеяды немецких исследователей — Юстуса Либиха (J. Liebig), Вильгельма Кнопа (W. Кноп), Юлиуса Сакса (J. Sachs) и Германа Гельригеля (H. Hellriegel). Выращивая растения без почвы на водных растворах солей, удалось выявить, какие химические элементы, в каких количествах и в какой период вегетации необходимы для нормального развития растительного организма.

Азотные удобрения делятся на четыре группы:

- нитратные (*селитры*) — NaNO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$;
- аммонийные и аммиачные — сульфат аммония $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, аммиачная вода NH_4OH , жидкий безводный аммиак;
- аммонийно-нитратные — аммиачная селитра NH_4NO_3 ;
- амидные — мочевины $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, цианамид кальция CaCN_2 .

Фосфорные удобрения, например суперфосфат $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, получают при действии серной кислоты на фосфориты или апатиты, которые имеют сходное строение и являются трехзамещенными кальциевыми солями фосфорной кислоты, содержащими различные примеси: $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ или $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{HF}_2$. В качестве фосфорных удобрений также используются фосфоритная мука (размолотый фосфорит), преципитат (CaHPO_4) и томасшлак — побочный продукт переработки железных руд, содержащий $4\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5$ и некоторые микроэлементы.

Калийные удобрения подразделяются на хлоридные (KCl) и сульфатные (K_2SO_4 , калимагнезия). Долгое время основным источником калия служила зола, что нашло отражение в названии этого элемента (potassium). Основным калийным удобрением является хлористый калий. Под культуры, которые чувствительны к избытку хлора, вносят сульфат калия. Калимагнезию ($\text{K}_2\text{SO}_4 \cdot \text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) обычно применяют на бедных калием и магнием песчаных и супесчаных почвах. Калий так же, как и фосфор, слабо мигрирует в пахотном слое, поэтому и калийные, и фосфорные удобрения можно вносить осенью и необходимо заделывать на глубину, соответствующую расположению корневой системы. При попадании в почву 25—80% калия связывается почвенными коллоидами, вытесняя при этом в почвенный раствор другие катионы. По своему характеру калийные удобрения являются физиологически кислыми солями, способствующими накоплению в почве хлорной и серной кислот. Поэтому на кислых почвах эффективность калийных удобрений без известкования снижается.

Комбинированные удобрения, к которым относятся нитрофосы, нитроаммофосы, нитрофоски, нитроаммофоски, азофоски и экофоски, содержат сразу несколько минеральных элементов. Азот, фосфор и калий находятся в них в виде растворимых соединений (NH_4NO_3 , NH_4Cl , KNO_3 , KCl , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, CaHPO_4 и др.).

Микроудобрения являются наиболее радикальным средством устранения дефицита микроэлементов у растений. Их применение также важно для эффективного использования растениями макроэлементов. Железо в питательные субстраты вносится в виде комплекса с хелаторами. Цинк, медь и марганец обычно используют в форме сернокислых солей ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, MnSO_4), а молибден — в виде молибдата аммония. Основой большинства боросодержащих удобрений служит борная кислота. В растениеводстве часто используют комбинированные удобрения, обогащенные микроэлементами.

Органические удобрения (навоз, птичий помет, торф, компосты) являются дополнительными источниками основных минеральных элементов, а также органических веществ, которые способствуют улучшению структуры почвы. Они более эффективны при совместном внесении с минеральными удобрениями.

Современное растениеводство немыслимо без удобрений. Именно от их производства и правильного применения зависят высокие урожаи. Почти линейная зависимость наблюдается между урожайностью и количеством внесенных удобрений. При этом необходимо учитывать, что в растение попадает не более половины от минеральных элементов, внесенных в почву. Вторая половина связывается с почвой, вымывается в грунтовые воды или попадает в атмосферу, загрязняя водные источники и воздух.

6.6. Выращивание растений без почвы

Растениеводство чаще всего связано с возделыванием сельскохозяйственных культур в открытом грунте. Это приводит к загрязнению водоемов и сельскохозяйственных угодий минеральными удобрениями и пестицидами, эрозии почв и ухудшению общей экологической обстановки. С другой стороны, большинство овощеводческих хозяйств располагается вблизи промышленных центров, т. е. в зонах с повышенным содержанием производственных отходов и выбросов, что затрудняет получение качественной растительной продукции. Выращивание растений в теплицах в почве или на почвогрунтах также не позволяет получить экологически чистые продукты, поскольку, помимо загрязненности грунтов, в них идут неуправляемые микробиологические процессы разложения органического вещества, связанные в том числе с образованием нитратов и нитритов.

Избежать отрицательных эффектов загрязнения (и растительной продукции, и окружающей среды) можно за счет внедрения более перспективного в экологическом отношении *гидропонного способа* выращивания растений. Первые питательные смеси для выращивания растений без почвы в водной культуре были разработаны еще в XIX в. немецкими исследователями Вильгельмом Кнопом (Wilhelm Knop) и Юлиусом Саксом (Julius Sachs). Попытка внедрения в практику выращивания растений на питательных растворах была сделана в 1930 г. в Калифорнии (США) В. Герике (W. F. Gericke). Он назвал свою систему питания *гидропоникой* (от греч. *hydro* — вода и *ponos* — работа). В России основы промышленного выращивания

растений в гидропонной культуре были заложены в 1940—1960 гг. профессором Ленинградского государственного университета В. А. Чесноковым.

Под термином "гидропонная культура" понимают способы выращивания растений без применения почв и почвогрунтов с использованием специальных питательных растворов. За многолетнюю историю беспочвенного выращивания растений накоплено более 500 рецептов питательных растворов, составы которых можно найти в специальных справочниках.

Среди гидропонных технологий выделяют как минимум три способа выращивания растений:

- без каких-либо субстратов (водная и водно-воздушная культуры);
- на инертных субстратах (керамзит, песок, гравий);
- на активных субстратах (ионообменные смолы, цеолиты).

Гидропонные технологии позволяют в значительной степени облегчить процесс выращивания растений за счет автоматизации минерального питания, температурного и светового режимов.

Одним из важных преимуществ гидропоники является возможность формировать необходимые параметры ионного состава растительной продукции в онтогенезе растений за счет программированного минерального питания. В гидропонной культуре растения отличаются высокими темпами роста, быстрее переходят к цветению и плодоношению, дают более ценную в биологическом отношении продукцию с повышенным содержанием витаминов, сахаров, органических кислот, но с меньшим — нитратов, и более высокие урожаи, чем при выращивании в почве.



Глава 7

Выделение веществ растениями

Если у вас нет денег на фундаментальные исследования, займитесь прикладными проблемами. Если вы будете последовательны, то вскоре придете к фундаментальным исследованиям.

Э. Рэкер

Термином "выделение" обозначают процессы выведения из организма продуктов обмена веществ — воды, солей и органических соединений. У растений процессы выделения веществ происходят как на уровне клетки, так и на уровне ткани или органа и являются такой же необходимой функцией, как и для любого другого организма, осуществляющего постоянный обмен с окружающей средой.

Растения выделяют воду и минеральные соли, моносахариды и полисахариды, аминокислоты и белки, вещества вторичного происхождения и газы. Процессы синтеза и выведения веществ из клеток, идущие с затратой энергии, называют *секрецией*. Процесс пассивного выделения веществ из клетки по градиенту их концентрации называют *экскрецией*. В ходе секреции выделяемые вещества или выносятся на поверхность растения, или накапливаются внутри клеток и тканей. Путем секреции осуществляются такие функции клетки, как ее рост, регуляция объема и осмотического давления, выведение (транспорт) продуктов метаболизма из одних компартментов в другие или во внешнюю среду.

7.1. Способы секреции веществ у растительных организмов

Различают три типа секреции веществ у растительных организмов: мерокриновый, апокриновый и голокриновый (Саламатова, Зауралов, 1991).

Мерокриновый тип секреции (мерос — часть, крино — отделяю) в свою очередь имеет две разновидности:

- *эккриновую* секрецию, т. е. активный транспорт веществ через мембраны в мономолекулярной форме, которая идет с затратой энергии и обеспечивается различными мембранными переносчиками и ионными насосами (см. главу 5);

□ *гранулокриновую* секрецию, т. е. процесс транспортировки и выделения секретируемых веществ в мембранной упаковке (внутри секреторных везикул).

Именно таким путем в пузырьках аппарата Гольджи происходит транспорт и секреция материала для синтеза плазмалеммы и клеточной стенки (см. рис. 1.12). Такая секреция особенно интенсивна в клетках с апикальным типом роста (корневые волоски, пыльцевая трубка).

Апокриновая секреция осуществляется путем отрыва вместе с секретируемыми веществами либо части цитоплазмы, либо головок солевых желез, что часто имеет место у галофитов.

Голокриновый тип секреции связан с разрушением клеточной мембраны и выделением в окружающую среду всех содержащихся в клетке веществ, при этом вся клетка превращается в секрет. Полагают, что этот способ секреции является эволюционно наиболее древним. Позже необходимость сохранения целостности клетки и всех ее компонентов привела к возникновению других типов секреции.

Клетки и группы клеток, специализирующиеся на выделении больших объемов секретируемых веществ, называют *секреторными*. У растений при описании процессов секреции обычно подробно рассматривается деятельность таких специализированных секреторных структур, как железистые волоски, железки, нектарники, смоляные каналы, млечники и другие образования. По существу же, функция секреции свойственна в той или иной степени любой клетке растительного организма и представляет собой важную часть ее обмена. Именно секреторным путем осуществляются процессы транспорта, накопления и синтеза различных соединений в клеточных компартментах. Тем не менее в тканях высших растений формируются одиночные клетки (идиобласты) и клеточные комплексы, для которых процесс секреции является основной функцией.

Секреторная деятельность клеток может быть очень специфичной, на что указывает преобладание определенных веществ в составе выделяемого секрета. При этом одни железистые структуры (гидатоды, нектарники, солевые железки) секретируют гидрофильные вещества, другие же (масляные железки, клетки смоляных ходов) выделяют липофильные соединения.

7.2. Наружные секреторные структуры

К наружным секреторным структурам растений относятся железки, железистые волоски, нектарники и гидатоды.

7.2.1. Железки, железистые волоски

К простым секреторным структурам относятся *железистые трихомы* (или *железистые волоски*), которые представляют собой чисто эпидермальные образования без участия нижележащих тканей (рис. 7.1, а—е).

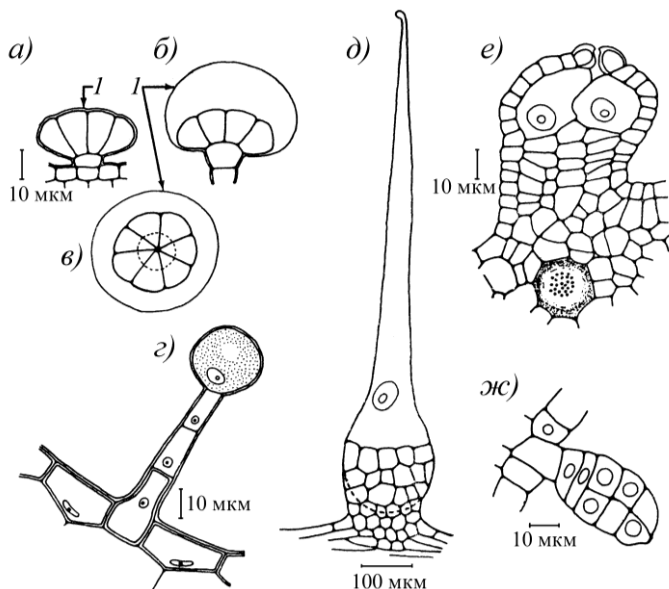


Рис. 7.1. Наружные секреторные структуры (Эзау, 1980): *а, б, в* — железистые волоски листа лаванды *Lavandula vera*: *а* — исходная ситуация, *б* и *в* — кутикула (*l*) растянута накапливающимся секретом; *г* — железистый волосок с одноклеточной головкой у стебля *Pelargonium*; *д* — жгучий волосок крапивы *Urtica urens*; *е* — перламутровая железка листа винограда *Vitis vinifera*; *ж* — железистый волосок листа хлопчатника *Gossypium arboreum*

У пеларгонии, например, железистый волосок состоит из многоклеточной ножки и одноклеточной головки, которая выделяет эфирные масла в пространство между клеточной стенкой и кутикулой (рис. 7.1, *г*). При разрыве кутикулы экскрет изливается наружу, после чего может образовываться новая кутикула, под которой вновь начинают накапливаться эфирные масла. У хлопчатника железистый волосок образован несколькими клетками — производными эпидермы (рис. 7.1, *ж*). К наружным секреторным структурам относятся также *жгучие* волоски крапивы (рис. 7.1, *д*). Верхняя часть волоска напоминает тонкую капиллярную трубку с закругленным концом. Когда волосок соприкасается с кожей, его кончик обламывается по заранее намеченной линии. В результате волосок приобретает форму иглы шприца и поэтому легко проникает в кожу. Секрет, содержащийся внутри него, под давлением попадает в образовавшуюся ранку.

Железками называют состоящие из большого числа клеток высоко дифференцированные секреторные структуры. У *перламутровой* железки винограда эпидерма, покрывающая крупные секреторные клетки, имеет открытое устье, через которое секрет выделяется наружу (рис. 7.1, *е*). Специальные *эфирно-масляные* железки, которые имеются на всех надземных органах черной смородины *Ribes nigrum*, продуцируют эфирные масла. К секреторным тканям, выделяющим белки (гликопротеины), относятся *пищеварительные* железки насекомоядных растений (*Pinguicula*), а также железки, имеющиеся на листьях таких растений, как тополь и ива (*Populus, Salix*).

7.2.2. Нектарники

Выделение сахаров на цветках и на вегетативных частях растения обеспечивают специализированные секреторные образования — *нектарники*. По локализации в растении обычно различают цветковые нектарники, приуроченные к различным частям цветка, и внецветковые, образующиеся на вегетативных надземных органах, чаще всего на черешке, по краю и в основании листовой пластинки.

Цветковые нектарники у большинства растений располагаются у основания различных частей цветка, что вызывает необходимость проникновения насекомого внутрь него (рис. 7.2). Секреторная ткань нектарника либо состоит только из эпидермальных клеток, либо в ее формировании принимают участие также клетки, подстилающие покровные ткани. Нектарники снабжены проводящими пучками.

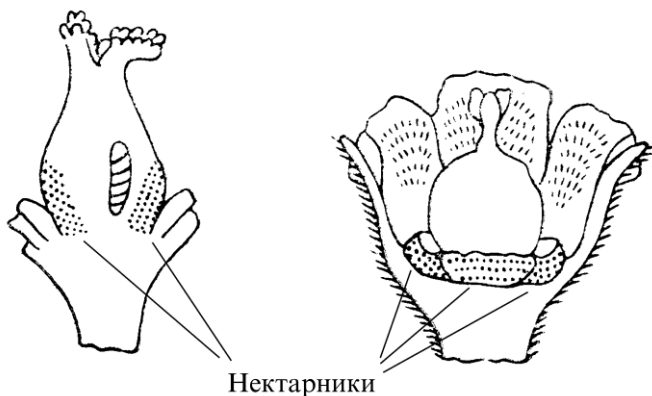


Рис. 7.2. Возможные варианты расположения нектарников в цветке (Васильев, 1977)

Появление нектарников, окрашенного венчика и определенного аромата цветков явилось результатом длительной сопряженной эволюции определенных видов насекомых-опылителей и цветковых растений. Железки, расположенные в различных частях цветка, вырабатывающие эфирные масла и определяющие его запах, называют *осмофорами*.

Основу *нектара* составляет флоэмный сок, куда входят сахара (глюкоза, фруктоза и сахароза), минеральные ионы (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , фосфаты), органические кислоты, витамины, белки, иногда липиды. Самые простые нектарники не имеют секреторных клеток, а состоят из межклеточных полостей, к которым с одной стороны примыкают устьица, а с другой — элементы флоэмы. В этом случае нектар представляет собой выделяющийся через устьица флоэмный сок.

7.2.3. Солевые железки и волоски

У растений имеются три группы секреторных эпидермальных образований, участвующих в выделении минеральных веществ: солевые железки, солевые волоски и секреторные клетки насекомоядных растений. Последние участвуют в выделении не только ионов и воды, но и гидролитических ферментов.

Солевые железки рассматриваются как приспособления, участвующие в поддержании солевого баланса путем секреции избытка соли. Основным источником секретируемых соединений в них является транспирационный поток веществ. На рис. 7.3 приведена схема строения солевой железки у кустарника гребенщика *Tamarix aphylla*, встречающегося на песчаных и засоленных почвах. Солевая железка представляет собой комплекс из шести секреторных и двух базальных (собирательных) клеток. Соль входит в железку из собирательных клеток по плазмодесмам, накапливается в микровакуолях, которые, сливаясь с плазмалеммой, секретируют ее в фазу клеточной стенки. Из клеточной стенки через специальные поры соль выходит на поверхность клетки, откуда может смываться дождем. Обратный поток соли предотвращается кутином кутикулярного слоя.

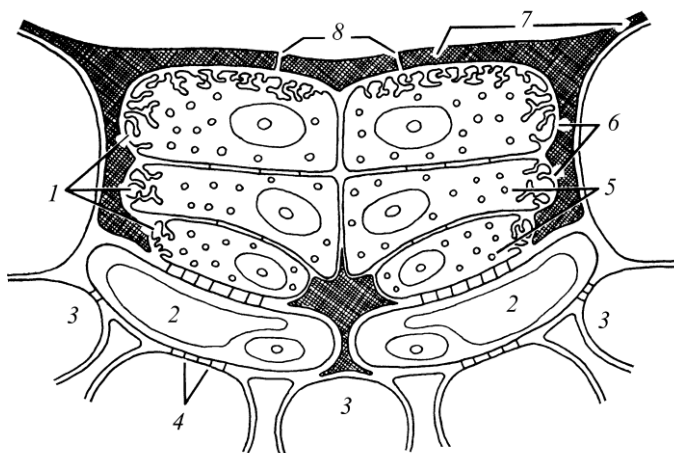


Рис. 7.3. Схема строения солевой железки гребенщика *Tamarix aphylla* (Thomson, 1969):

- 1 — секреторные клетки; 2 — собирательные клетки; 3 — клетки мезофиллы;
4 — плазмодесмы; 5 — микровакуоли; 6 — протуберанцы клеточной стенки, содержащие секрет; 7 — кутикула и кутинизированная клеточная стенка; 8 — поры

Солевые волоски на листьях обычно состоят из двух клеток — "ножки" и "головки" (рис. 7.4). У некоторых видов лебеды (*Atriplex*) часть ионов, переносимых по сосудам ксилемы, доставляется в *пузыревидные* клетки, прикрепленные к эпидерме. В пузыревидной клетке ионы секретируются в крупную центральную вакуоль. После того как их уровень достигнет определенной концентрации, верхняя часть солевого волоска разрушается, а соль откладывается на поверхности листа.

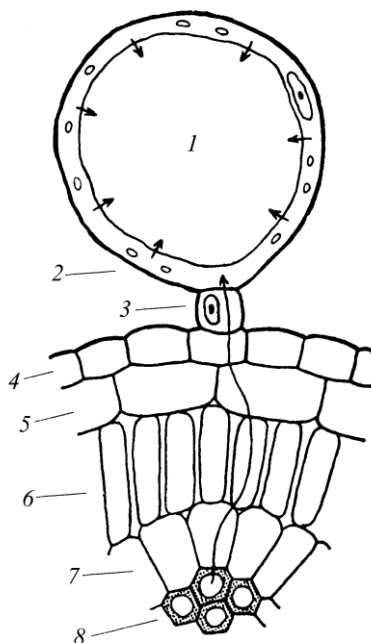


Рис. 7.4. Схема секретирующей соль трихомы вместе с частью листа лебеды *Atriplex halimus* (Эзау, 1980): 1 — вакуоль; 2 — пузыревидная клетка; 3 — клетка-ножка; 4 — эпидерма; 5 — гиподерма; 6 — хлоренхима; 7 — обкладка пучка; 8 — ксилема. Длинной изогнутой стрелкой показано движение ионов из сосудов ксилемы к пузыревидной клетке трихома. Короткие стрелки показывают выход ионов в вакуоль

7.2.4. Гидатоды

Выделение жидкости в растении происходит через специализированные группы клеток — гидатоды, обычно расположенные по краю листа или на его верхушке. Процесс выделения воды на поверхность листа из его внутренних частей через гидатоды называется *гуттацией*.

Гидатоды включают в себя специализированную ткань — *эпитему*, которая представлена тонкостенными бесхлорофильными клетками с большими межклетниками между ними (рис. 7.5).

Для клеток эпитемы характерно также наличие в клеточной стенке протуберанцев, образованных выростами плазматической мембраны. К эпитеме вплотную подходят окончания проводящих пучков. Вода проходит через эпитему и покидает лист через так называемое *водяное устье*, которое, в отличие от обычных, лишено способности к движению. Состав гуттационной жидкости варьирует от чистой воды до сложной смеси органических и неорганических соединений. Одни гидатоды выделяют воду пассивно под действием корневого давления, другие же являются настоящими железами, способными к активной секреции воды. Однако в термодинамическом

плане вода в гидатодах не транспортируется активно, ее передвижение по железистым клеткам поддерживается градиентами осмотического потенциала, формируемого градиентами концентрации ряда минеральных и органических веществ.

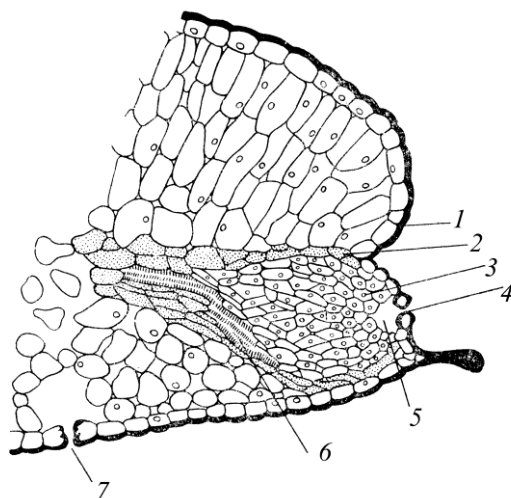


Рис. 7.5. Строение эпитемной гидатоды листа камнеломки (*Saxifraga umbrosa*) (Эзау, 1980):
 1 — кутикула; 2 — транспортные клетки; 3 — клетки эпитемы; 4 — водяное устье; 5 — субэпидермальная полость; 6 — сосуды; 7 — воздушное устье

Замечательной особенностью высокогорных видов камнеломок (*Saxifragaceae*) является способность к отложению на поверхности листьев углекислого кальция. У видов, которые обладают такой способностью, гидатоды расположены в углублениях по краю листа или только на его кончике. У камнеломок с зубчатыми листьями эти углубления находятся у основания зубцов (рис. 7.5). В растворенном виде CaCO_3 из проводящего пучка поступает в ямку, где после испарения воды остается осадок, к которому снизу добавляются все новые и новые порции углекислого кальция. Постепенно известковым налетом заполняются не только углубление, в котором расположена гидатода, но и близлежащие участки листа. Предполагается, что отложения углекислого кальция на листьях снижают потери воды и служат защитой от слишком интенсивного освещения.

7.3. Внутренние секреторные структуры

К внутренним секреторным структурам относят различные полости и каналы, которые образуются или за счет разъединения ранее плотно прилежавших друг к другу клеток, или путем их лизиса. В последнем случае секрет вырабатывается клетками до их разрушения. Таким образом, формируются смоляные, слизевые и камеденосные ходы (рис. 7.6). Секреты, накапливающиеся в полости, образуются эпители-

альными (обкладочными) клетками каналов, которые изолируют содержимое от соседних тканей. Секретируемые вещества находятся в канале до тех пор, пока растение не будет повреждено.

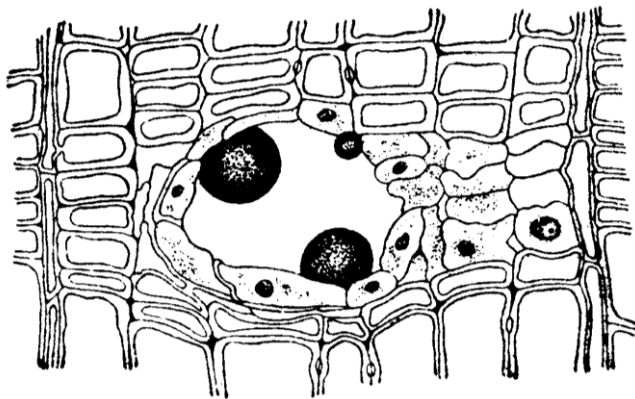


Рис. 7.6. Смоляной ход древесины сосны (*Pinus silvestris*) на поперечном срезе (Васильев, 1977)

В состав секрета *смоляных ходов*, который чаще называют *смолой*, или *бальзамом*, входят терпеноиды, флавоноиды, спирты, фенолы. Особенно много в смоле производных дитерпенов — смоляных кислот. У хвойных растений эфирные масла и смолы образуются исключительно в смоляных ходах. *Камедь* состоит из полисахаридов, терпенов и некоторых других органических и неорганических веществ. Камеди выделяются при поранении растений (насекомыми, животными) и затвердевают, закрывая рану.

Одиночные секреторные клетки, служащие для накопления каких-либо веществ, называют *идиобластами*. Обычно они отличаются по размерам или форме от окружающих клеток. Примерами идиобластов могут служить клетки, содержащие кристаллы оксалата кальция, эфирно-масличные и слизевые клетки. У идиобластов секретируемые вещества накапливаются в центральной вакуоли. В некоторых идиобластах и осмофорах находятся только эфирные масла, в состав которых может входить до 1000 различных органических соединений (рис. 7.7). Большую часть эфирных масел составляют терпены. *Эфирным маслом* называют секреты жидкой консистенции, твердые же терпеноидные секреты называют *смолой*.

Секреторные идиобласты образуют *полисахаридную слизь*, которая накапливается (например, в корневом чехлике) между клеточной стенкой и плазмалеммой, оттесняя цитоплазму к центру клетки. Слизь может вырабатываться и эпидермой слизевых ходов, а также специализированными волосками и железками на листьях и стеблях. Особенностью слизиобразующих клеток является повышенная активность аппарата Гольджи, который находится в состоянии гиперсекреции и содержит многочисленные диктиосомы с множеством секретируемых пузырьков.

Выделяемая клетками слизь выполняет самые разные функции: предохраняет кончик корня от повреждения при передвижении в почве, выполняет ловчие функции у насекомоядных растений, помогает удержанию воды на поверхности растительных тканей и пыльцы на поверхности рыльца, участвует в регуляции прорастания семян.

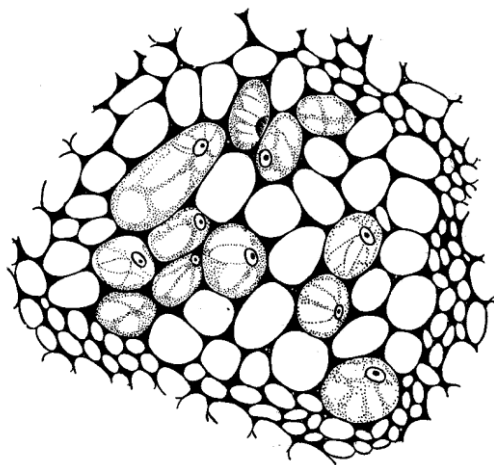


Рис. 7.7. Идиобласты с эфирным маслом в черешке листа герани

Млечники представляют собой живые одиночные клетки или ряды связанных клеток, которые содержат в вакуолях млечный сок (латекс), вытекающий из них при поранении. Обычно млечный сок молочно-белого цвета, но иногда он имеет и другую окраску (у чистотела, например, ярко-оранжевую). Секрет у млечников накапливается в центральной вакуоли, которая занимает практически весь объем клетки. Чаще всего млечники являются хранилищем различных терпеноидных соединений, которые накапливаются в виде гидрофобных капелек. Поэтому содержимое вакуоли представляет собой эмульсию, похожую на молоко. В млечниках накапливаются каучук, эфирные масла, алкалоиды (морфин, кодеин и папаверин), сахара, воска, танины, белки и крахмал.

Млечники (по происхождению) могут быть простыми и сложными. Простые млечники представляют собой одиночные клетки, сложные млечники возникают из рядов клеток. Млечники обоих типов могут быть ветвистыми и неветвистыми.

Простые млечники (например, у фикусов) называются *нечленистыми* (рис. 7.8). Нечленистый млечник представляет собой одну гигантскую клетку, которая, возникнув у зародыша, более не делится, а непрерывно растет, удлиняется и ветвится.

Сложные млечники (у маковых, сложноцветных), называемые также *членистыми*, возникают из многих отдельных клеток, у которых в местах соприкосновения

происходит разрушение (растворение) смежных стенок (см. рис. 7.8). При этом отдельные протопласты и вакуоли с млечным соком сливаются в сплошную разветвленную систему.

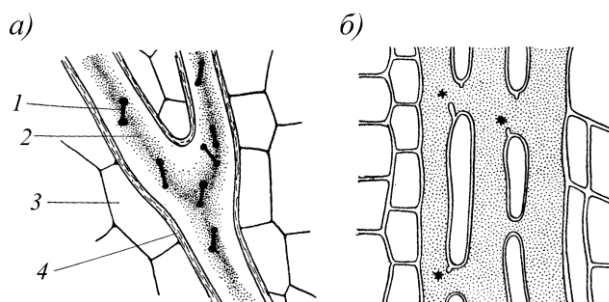


Рис. 7.8. Млечники (Васильев и др., 1978): *а* — продольный срез нечленистого (простого) млечника стебля молочая (*Euphorbia splendens*): 1 — крахмальные зерна; 2 — млечный сок; 3 — паренхима; 4 — оболочка млечника; *б* — продольный срез членистого (сложного) млечника стебля латука (*Lactuca virosa*)

Млечники встречаются у представителей более чем 20 семейств растений (*Euphorbiaceae*, *Asteraceae*, *Papaveraceae*, *Campanulaceae* и др.). Источником для промышленного получения каучука являются растения родов *Hevea* и *Manihot*, относящиеся к семейству *Euphorbiaceae*. Хорошими каучуконосами также являются индийское каучуконосное растение *Ficus elastica* семейства *Moraceae* и несколько родов растений из семейства *Asteraceae* (одуванчик *Taraxacum*, осот *Sonchus*, латук *Lactuca*).



Глава 8

Гормональная система растений

Одним из основных принципов жизни является "организация"; мы понимаем под этим, что при объединении двух вещей рождается нечто новое, качества которого не аддитивны и не могут быть выражены через качества составляющих его компонент.

А. Сент-Дьёрдьи

Впервые идея о гормональной (химической) регуляции ростовых процессов в растениях была высказана Ч. Дарвином в 1880 г. на основе анализа ростовых движений (тропизмов) в его книге "Способность к движению у растений" ("The Power of Movements in Plants"). В дальнейшем учение о гормональной регуляции роста и морфогенеза растений получило развитие в трудах выдающихся отечественных и зарубежных физиологов: Д. Н. Нелюбова, Н. Г. Холодного, Ф. Вента (F. Went), Ф. Кегля (F. Kögl), К. Тиманна (K. V. Thimann), Ф. Скуга (F. Skoog), М. Х. Чайлахяна, О. Н. Кулаевой, В. В. Полевого, Г. С. Муромцева и ряда других исследователей.

С помощью фитогормонов в растениях осуществляется регуляция функций и ответных реакций на внешние воздействия, обеспечивается целостность организма, контролируются морфогенетические программы развития. Фитогормоны очень редко функционируют независимо друг от друга. Даже если клетки обработать одним фитогормоном, наблюдаемый эффект будет определяться не только им, но зависеть и от его взаимодействия с другими эндогенными гормонами. Взаимодействие фитогормонов в организме растения может осуществляться как в процессе их синтеза, транспорта и катаболизма, так и на уровне рецепции и передачи гормонального сигнала.

Среди внешних факторов важнейшими для растений являются свет, гравитация, температура и влажность, а среди внутренних — многочисленные химические и физические сигналы, которые клетки генерируют и которыми они обмениваются. Фитогормоны можно рассматривать как интегральные химические сигналы состояния внутренней среды растительного организма, регулирующие рост и развитие растений. В настоящее время классическими фитогормонами признаются ауксины, цитокинины, гиббереллины, абсцизовая кислота и этилен. Многие исследователи также относят к фитогормонам брассиностероиды, оксипирины, салициловую кислоту и ряд пептидов.

8.1. Понятие фитогормона

Термин "*гормон*" происходит от греческого слова "hormáo", что означает "побуждаю к действию". Впервые в физиологии растений термин "гормон" был применен в 1909 г. немецким ботаником Г. Фиттингом к содержащемуся в пыльце орхидных химическому регулятору (ауксину, как выяснилось впоследствии), благодаря которому даже при обработке рыльца пестика прокипяченным экстрактом пыльцы происходит разрастание завязи.

Долгое время стратегия исследований фитогормонов определялась известной "формулой" Ф. Вента — "без ростовых веществ нет роста", поскольку физиологическая роль фитогормонов в растениях часто сводилась исследователями только к регулированию процессов роста и морфогенеза. Поэтому фитогормоны долгое время называли ростовыми гормонами, регуляторами роста или ростовыми веществами. Однако по мере изучения различных аспектов действия фитогормонов постепенно выявилось, что их функции не ограничиваются только регуляцией роста. Стало очевидным, что они являются мощным инструментом, с помощью которого происходит управление практически всем метаболизмом растения в онтогенезе. Фитогормоны принимают участие в процессах формирования пола, старения и перехода к стадии покоя, в транспорте веществ, в передаче сигналов об изменении параметров внешней среды и адаптации к стрессовым воздействиям, в регуляции процессов синтеза органических соединений и их распада.

Давая определение гормонам растений, выдающийся физиолог растений Д. А. Сабинин (1963) писал: "Во-первых, вещества этого рода должны обладать способностью в небольших количествах вызывать прохождение не только отдельных химических процессов, как это имеет место при действии ферментов, а и физиологических процессов, протекающих на основе целой цепи физических и химических изменений. Во-вторых, фитогормоны должны образовываться в растительном организме, будучи продуктом обмена веществ организма. В-третьих, они должны действовать и в иных частях организма, чем те, где они вырабатываются". К этому определению необходимо добавить, что фитогормоны, как и гормоны животных, проявляют регуляторные функции в очень низких концентрациях (10^{-6} — 10^{-12} М), не участвуя непосредственно в тех биохимических превращениях, которые ими вызываются.

Гормональная система растений менее специализирована по сравнению с животными. Гормоны животных организмов образуются в специальных эндокринных железах и оказывают специфическое влияние на некотором расстоянии от места их синтеза. У животных шире спектр гормонов, совершеннее система их транспорта и регулирования активности. Фитогормоны также синтезируются в одних тканях растительного организма и транспортируются в другие, вызывая функциональные изменения этих органов и тканей. Однако, в отличие от животных, у растений гормоны могут действовать и непосредственно в том месте, где они образуются.

Специфика гормонального ответа в растительных тканях определяется, главным образом, типом клеток, на которые действует фитогормон. Воздействие одним

и тем же фитогормоном на разные ткани растения может приводить к различным ответным реакциям. Несмотря на то, что каждый фитогормон полифункционален и способен влиять на многие физиологические процессы, действие каждого из них специфично. С другой стороны, в регуляции одного и того же процесса может принимать участие несколько фитогормонов. Они способны образовывать неактивные комплексы, хранящиеся продолжительное время в тканях. Необходимо также учитывать, что оказываемые фитогормонами физиологические эффекты зависят от их концентрации и условий внешней среды, в которых находится растение.

8.2. Ауксины

История открытия ауксинов восходит к 1880 г., когда Чарльз Дарвин и его сын Фрэнсис, анализируя фототропическую реакцию проростков канареечника канарского *Phalaris canariensis*, показали, что свет воспринимается верхушкой coleoptilya, а фототропический изгиб наблюдается в его нижней части. На этом основании они сделали вывод, что причиной ростового изгиба (при одностороннем освещении) является "некоторый стимул, который перемещается из верхней части (coleoptilya) в нижнюю, заставляя ее изгибаться". Только через 50 лет голландскому исследователю Ф. Венту удалось подтвердить, что верхушки coleoptилей злаков действительно образуют значительные количества вещества, контролирующего рост нижележащих зон. В 1935 г. Ф. Кегль идентифицировал это вещество как индол-3-уксусную кислоту (ИУК). Поскольку это вещество стимулировало рост за счет растяжения клеток, Кегль назвал его *ауксином* (от греч. *áuxein* — увеличиваться, расти).

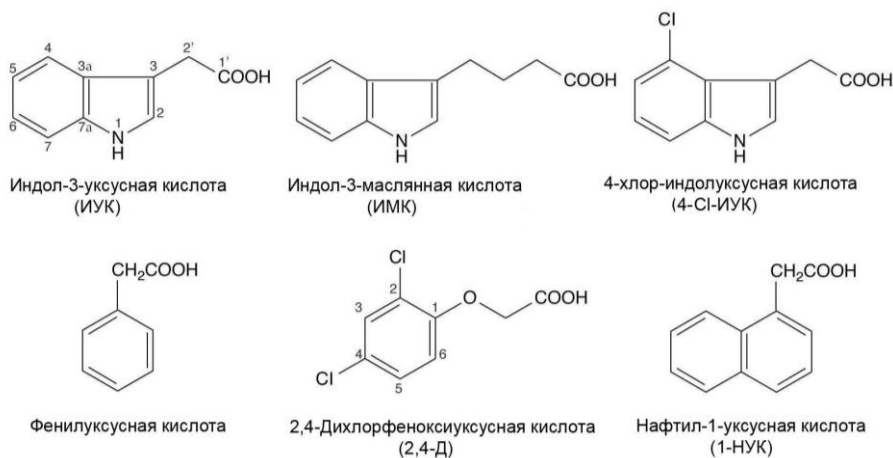


Рис. 8.1. Природные и синтетические ауксины

Самый распространенный природный ауксин — *индол-3-уксусная кислота* (рис. 8.1). Она синтезируется во всех растениях, включая водоросли. У бобовых и сосны также имеется другой очень активный ауксин *4-Cl-ИУК*, который, подобно

Существует несколько путей биосинтеза ИУК в растительных тканях, и три из них основаны на синтезе ауксина из аминокислоты триптофана. В зависимости от вида растения образование ИУК из триптофана может идти через индолил-3-пиридиноградную кислоту, через триптамин и через индолил-3-ацетальдоксим (рис. 8.2). Имеется также возможность триптофан-независимого пути синтеза ИУК. Однако и в этом случае непосредственным предшественником ИУК является либо индолил-3-ацетонитрил, либо индолил-3-ацетальдегид.

Окисление ИУК, по-видимому, катализируют пероксидазы, локализованные в клеточных стенках и вакуолях растений. Показано, что они способны быстро окислять содержащуюся в среде инкубации ИУК по декарбоксилирующему пути с образованием индол-3-метанола, индол-3-альдегида, индол-3-карбоновой кислоты и ряда других соединений. Однако такой способ окисления ауксина пока выявлен только в поврежденных тканях растений.

Более 90% ауксина в растениях находится в конъюгированной, неактивной форме. Известны конъюгаты ИУК с моносахаридами, аминокислотами и пептидами. Она также ковалентно связывается с олигосахаридами (от 7 до 50 молекул глюкозы на одну молекулу ИУК) и гликопротеинами (в семенах злаков). Наиболее распространены эфирные конъюгаты с глюкозой и мио-инозитом, амидные конъюгаты с аспарагиновой и глутаминовой кислотами. Предполагается, что конъюгаты ИУК могут служить запасной или транспортной формой ауксина. При прорастании семян происходит гидролиз эфирных и амидных конъюгатов ИУК.

8.2.2. Полярный транспорт ИУК

Из всех фитогормонов только для ИУК характерно ярко выраженное полярное передвижение по тканям растительного организма. Основной полярный поток ауксина в побегах и корнях направлен сверху вниз, главным образом, по клеткам камбия, флоэмной и ксилемной паренхимы. Полярный транспорт ауксина — активный процесс, идущий с затратой энергии, который тормозится в условиях гипоксии и ингибиторами дыхания.

Для объяснения механизма мембранного транспорта ауксина часто используют хемиосмотическую гипотезу, предложенную П. Рабери (P. Rubery) и П. Шелдрэйком (P. Shelldrake) в 1973 г. Суть ее заключается в следующем: ИУК как слабая кислота (рК 4,75) в слабокислой среде клеточных стенок и межклетников диссоциирована наполовину. Недиссоциированная же часть молекул ауксина липофильна и легко проходит через мембрану по градиенту концентрации (рис. 8.3).

Попав в цитоплазму, рН которой обычно имеет слабощелочное значение, большая часть молекул ИУК диссоциирует на H^+ и анион IUK^- . Выведение из клетки протонов осуществляет H^+ -АТФаза. По мере накопления ауксина в цитоплазме создается градиент его концентрации, по которому анион IUK^- будет стремиться покинуть клетку. Однако анионы IUK^- , которые нерастворимы в мембранных

липидах, не могут свободно диффундировать через плазмалемму и ауксин оказывается "в ловушке" — выход ИУК⁻ из клеток может происходить только с помощью специальных мембранных переносчиков.

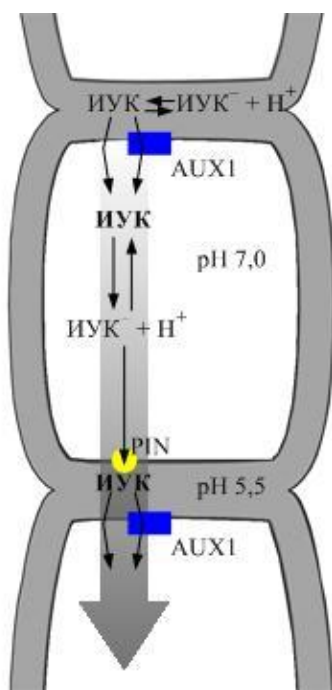


Рис. 8.3. Межклеточный транспорт ИУК по гемииосмотическому механизму (Jones, 1998)

Поступление ИУК в клетку обеспечивают белки AUX1/LAX (от auxin resistant 1/like AUX1). В выведении ауксина из клеток принимают участие два типа переносчиков — PIN-белки и некоторые фосфогликопротеины, например, такие как PGP1 и PGP19 (от P-glycoproteins). Эти фосфогликопротеины осуществляют АТФ-зависимый транспорт ауксина и относятся к ABC-типу мембранных переносчиков.

Главными же переносчиками, формирующими полярные потоки ауксина в растении и обеспечивающими выход ИУК из клеток (см. рис. 8.3), является семейство белков, которые у арабидопсиса называют PIN (pin-formed), поскольку у мутантов по этим белкам формируются шпилькообразные побеги без листьев и цветков (рис. 8.4). У арабидопсиса выявлено 8 генов, кодирующих ауксиновые переносчики этого типа. Благодаря различной мембранной локализации белков этого семейства полярный транспорт ауксина в растении возможен в самых разных направлениях.

Полярный транспорт ИУК в растительных тканях является результатом полярного распределения PIN-белков в клетке путем их везикулярного транспорта по актиновым микрофиламентам. Поэтому грибной токсин брефельдин А, ингибирующий везикулярную секрецию, а также цитохалазин D и латрункулин Б, вызывающие деполимеризацию или фрагментацию F-актина, подавляют процесс полярного транспорта ауксина.



Рис. 8.4. Мутант арабидопсиса по транспорту ауксина *pin1*

Установлено, что распределение PIN-белков в клетке обеспечивают четыре процесса:

- первичный экзоцитоз и равномерное распределение в плазмалемме;
- эндоцитоз (интернализация) везикул, содержащих PIN-белки, и включение их в эндомембраны;
- вторичный экзоцитоз везикул с PIN-белками и их включение в конкретные участки плазматической мембраны;
- транспорт PIN-белков везикулярным путем на гидролиз в протеасомах.

Синтезированные *de novo* белки PIN1 и PIN2 вначале путем экзоцитоза равномерно попадают в плазматическую мембрану и симметрично там распределяются. Затем PIN-белки в составе везикул отпочковываются от плазмалеммы и включаются в эндомембраны. После этого посредством повторного экзоцитоза они направляются уже в определенные участки плазматической мембраны (PIN1 — в базальные, PIN2 — в апикальные). Векторность экзоцитоза PIN-белков при этом задается факторами ARF/GEF (adenosyl ribosylation factor; GDP/GTP exchange factor), кодируемыми геном *GNOM*. Мутация *gnom* приводит к тому, что зародыши не могут сформировать ось (оси) полярности и гибнут на самых ранних стадиях развития. И, наконец, еще один регулятор процесса везикулярного транспорта PIN-белков в клетке — фактор ARF/CAP/VAN3, функционирующий как возможный антагонист белка GNOM, ограничивает уровень PIN-белков в клетке, направляя их на деградацию в протеасомах.

Таким образом, полярные потоки ИУК в растительных тканях зависят от структуры актиновых микрофиламентов, процессов экзо- и эндоцитоза и полярного транспорта везикул с белками-переносчиками ауксина. Сеть актиновых филаментов

вместе с факторами ARF/GEF формирует полярное расположение PIN-белков в плазмалемме и таким способом задает направление полярного транспорта ауксина в растении.

Следует отметить, что большая часть ауксина, синтезируемого в зрелых листьях, распределяется по растению не от клетки к клетке посредством полярного транспорта, а по флоэме. Скорость флоэмного транспорта ауксина (5—20 см/ч) гораздо выше, чем скорость его полярных потоков (0,5—1,5 см/ч). По флоэме также перемещаются конъюгаты ИУК. Флоэмные потоки ИУК и ее конъюгатов, по-видимому, служат основой для поддержания некоего базового уровня свободных и связанных форм ауксина в органах и тканях растения.

Более же тонкая регуляция концентрации этого гормона осуществляется с помощью PIN-белков, обеспечивающих необходимый уровень ауксина в клетках растения. Процессы флоэмного и полярного транспорта ауксина осуществляются независимо друг от друга. Тем не менее есть основания предполагать, что флоэмный пул ИУК может поступать и передвигаться в системе полярного транспорта ауксина, возможность же обратного перехода пока не показана.

8.2.3. Механизм действия ИУК

Несмотря на множественность эффектов ИУК, первичные реакции, которые этот гормон вызывает при взаимодействии с клетками-мишенями, практически во всех случаях одинаковы и начинаются со связывания ауксина с рецептором. Последующий ответ зависит от двух факторов: во-первых, от специализации клетки, определяемой набором генов, которые экспрессируются в момент воздействия гормона, и, во-вторых, от концентрации других сигнальных молекул. Одни клетки в ответ на ауксин начнут расти растяжением, другие станут дифференцироваться и формировать сосуды, третьи — делиться и образовывать примордии боковых корней.

Мембранный механизм действия ауксина. В 1970 г. Д. Рейл (D. Rayle) и Р. Клиланд (R. Cleland), а в 1971 г. А. Хагер (A. Hager) с коллегами на основании сходства действия на рост кислых буферных растворов (эффект "кислого роста") и ауксина высказали предположение, что в механизме действия ИУК функции вторичного посредника могут выполнять ионы H^+ . Согласно их представлениям ауксин индуцирует работу АТФазной протонной помпы в клеточной мембране, в результате чего происходит подкисление фазы клеточных стенок, активация гидролитических ферментов и размягчение клеточной стенки за счет гидролиза ее полимеров. Включение H^+ -помпы инициирует (в режиме вторичного активного транспорта) поток осмотически активных веществ и воды в вакуоль. Это приводит к увеличению размеров вакуоли и растяжению клетки.

Первые экспериментальные подтверждения способности ауксина индуцировать транспорт ионов H^+ из растительных клеток были получены Р. Клиландом, А. Хагером и В. В. Полевым в течение 1971—1973 гг. Они показали, что первичными реакциями, вызываемыми ИУК, являются активация локализованной в плазм-

малемме H^+ -помпы и гиперполяризация мембранного потенциала. Многие исследователи предпринимали попытки получить прямой эффект ИУК на H^+ -АТФазу плазмалеммы; иногда эти попытки были успешными, но чаще нет.

Позже выяснилось, что более ранним эффектом, индуцируемым ИУК, является активация анионных и кальциевых каналов плазмалеммы (рис. 8.5). Находящийся в апопласте ауксин, вероятно, вначале активирует анионные каналы плазмалеммы, что приводит вследствие выхода Cl^- к деполяризации мембраны и активации потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов. При этом одновременно активируются и лигандуправляемые Ca^{2+} -каналы плазмалеммы. Увеличение содержания ионов Ca^{2+} в цитоплазме активирует Ca^{2+} -зависимые K^+ -каналы, индуцирует выход из клетки ионов K^+ и гиперполяризацию плазмалеммы. Возрастание концентрации ионов K^+ снаружи клетки активирует H^+ -АТФазу, которая выкачивая из клетки ионы H^+ и генерирует на плазмалемме электрохимический градиент ионов водорода, служащий источником энергии для поступления ионов K^+ в цитоплазму. Таким образом, ИУК стимулирует секрецию протонов не прямо, а через последовательную активацию анионных, кальциевых и Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов плазмалеммы.

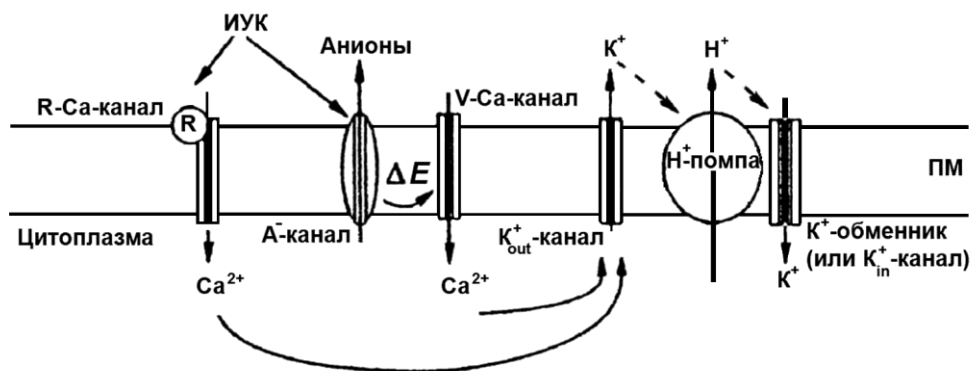


Рис. 8.5. Мембранный механизм действия ИУК: ПМ — плазмалемма; R-Са-канал — рецепторуправляемый Са-канал; А-канал — анионный канал; V-Са-канал — потенциалзависимый Са-канал; K_{out}^+ -канал — Са-активируемый K^+ -канал выходящего направления; K_{in}^+ -канал — K^+ -канал входящего направления

Гены первичного ответа на ауксин. Гены, экспрессия которых стимулируется предшествующими факторами транскрипции, называют *генами первичного ответа*, или *ранними генами*. Такое определение подразумевает, что весь набор белков, необходимый для ИУК-индуцируемой экспрессии генов, присутствует в клетке в момент воздействия гормона. Именно поэтому быстрая транскрипция генов не блокируется ингибитором синтеза белков циклогексимидом. Время, необходимое для экспрессии ранних генов, варьирует от нескольких минут до нескольких часов.

К наиболее хорошо изученным генам первичного ответа, экспрессия которых индуцируется ауксином, относятся гены семейства *Aux/IAA* (*Aux*). К генам, экспрессия которых изменяется уже через 2—15 мин после воздействия ауксина, относятся *Aux1-6* и *Aux9-14* арабидопсиса, а также гены *PS-IAA4*, *PS-IAA5* и *PS-IAA6* (*PISUM SATIVUM-IAA*) гороха. К ранним ИУК-регулируемым генам также относится семейство небольших генов *SAUR* (*SMALL AUXIN UPREGULATED-RNA*), выделенных и клонированных у сои, вигны, гороха и арабидопсиса. Хорошо исследованы также ранние ауксин-зависимые гены семейства *GH* (*GLYCINIA HYPOCOTIL*) — *GH2*, *GH3*, *GH4*, найденные у сои и арабидопсиса.

В промоторной зоне генов первичного ответа найдены специфические консервативные последовательности нуклеотидов, называемые ауксин-отвечающими элементами (*auxin response elements*, *AuxREs*), с которыми связываются ИУК-зависимые факторы транскрипции. В промоторной зоне гена *GH3*, например, идентифицирован консервативный ауксин-отвечающий элемент, состоящий из шести нуклеотидов (5'-TGTCTC-3').

В ауксин-регулируемой транскрипции участвуют два семейства белков: транскрипционные факторы *ARF* (*auxin response factor*) и белки-ингибиторы этого процесса — *Aux/IAA* (рис. 8.6). Белки *ARF* содержат ДНК-связывающий домен, а также домены, обеспечивающие гомо- и гетеродимеризацию. Узнавая соответствующие ауксин-отвечающие элементы, *ARF* связываются с ДНК, димеризуются с последующей сборкой комплекса ДНК-РНК-полимераза II, инициируя транскрипцию ауксин-зависимых генов.

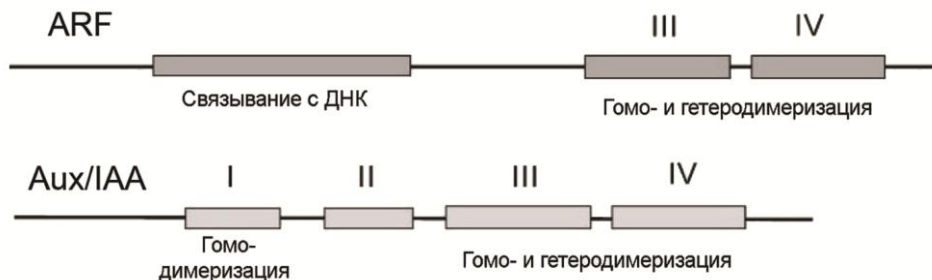


Рис. 8.6. Строение белков *Aux/IAA* и *ARF*, участвующих в трансдукции ауксинового сигнала (по Leysen, 2002). I—IV — функциональные домены

Белки *Aux/IAA* не имеют ДНК-связывающего домена, но обладают доменом, обеспечивающим димеризацию и связывание с *ARF*. После связывания белков *Aux/IAA* с *ARF* происходит блокирование сборки прединициального комплекса транскрипции на ДНК. У арабидопсиса найдено 29 белков *Aux/IAA*, которые препятствуют *ARF* регулировать экспрессию ауксин-зависимых генов. У арабидопсиса обнаружено более 23 *ARF*, которые могут функционировать не только как активаторы транскрипции, но и как репрессоры.

Рецепция и трансдукция ауксинового сигнала. Выявлены два типа рецепторов ауксина — мембранный и внутриклеточный. *Мембранным рецептором ауксина* является полипептид с молекулярной массой ~22 кДа, формирующий гомодимер и локализованный большей частью в эндоплазматическом ретикулуме. Этот белок получил название АВР1 (auxin-binding protein 1). По своей структуре АВР1 — это гидрофильный гликопротеин с сигнальной последовательностью на С-конце (KDEL: лиз–асп–глу–лей), характерной для белков эндоплазматического ретикулума (см. приложение 2. *Рецептор ауксина АВР1*). Оказалось, что белок АВР1 может выполнять функции рецептора, отвечающего только за быстрые ауксин-зависимые реакции, например такие, как изменение ионной проницаемости мембран или набухание протопластов. Установить реальную связь между АВР1 и ауксин-зависимой активацией генов пока не удалось.

В 2005 г. в журнале "Nature" появились сразу две публикации (С. Кепински (S. Kepinski), О. Лэйсер (O. Leyser) и М. Эстель (M. Estelle) с коллегами), в которых сообщалось об открытии нового рецептора ауксина (см. приложение 2. *Рецептор ауксина TIR1*). Им удалось установить, что рецепторами ауксина являются белки F-бокса убиквитин-лигазного комплекса, в частности TIR1 (transport inhibitor response 1). Они показали, что при формировании гормон-рецепторного комплекса (ИУК–TIR1) происходит "узнавание", связывание, убиквитинирование и гидролиз репрессора ауксинового сигнала — Аух/IAА.

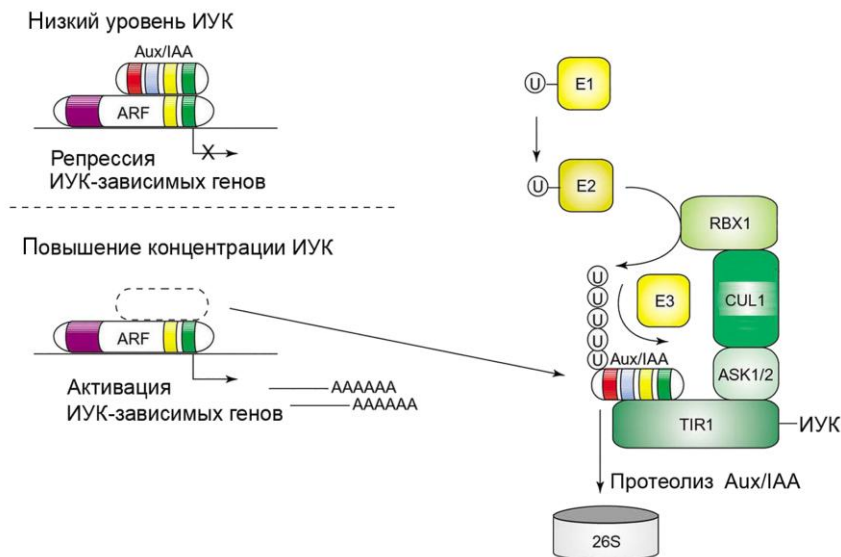


Рис. 8.7. Схема гидролиза белка-репрессора ауксинового сигнала Аух/IAА (по Berleth et al., 2004, с изменениями): Аух/IAА — белок-репрессор ауксинового сигнала; ARF — ИУК-зависимый фактор транскрипции; U — убиквитин; E1 — убиквитин-активирующий фермент; E2 — убиквитин-конъюгирующий фермент; 26S — протеасома; E3 — убиквитин-лигаза, состоящая из белков: рецептора ауксина TIR1 (transport inhibitor resistant1), куллина (CUL1), ASK1/2 –ARABIDOPSIS Skp1-like, белка RING-бокса (RBX1)

На рис. 8.7 показан протеасомный механизм расщепления белка-репрессора Aux/IAA. При низком уровне ауксина репрессор Aux/IAA формирует гетеродимер с ИУК-зависимым фактором транскрипции ARF, что блокирует экспрессию ауксин-зависимых генов. При повышении концентрации ИУК белок F-бокса TIR1 метит ауксиновый репрессор Aux/IAA для убиквитинирования и последующего протеолиза. После снятия репрессии гомодимеры или мономеры ARF обеспечивают транскрипцию ИУК-регулируемых генов.

Однако оказалось, что инактивация гена *TIR1* слабо отражалась на фенотипе соответствующих мутантов арабидопсиса, поэтому было предположено, что у арабидопсиса существует не один белок, а целое семейство белков F-бокса — рецепторов ауксина. В присутствии ауксина они вызывают избирательную деградацию Aux/IAA репрессоров и тем самым запускают процесс транскрипции генов первичного ответа на ауксин.

8.2.4. Физиологическая роль ИУК

ИУК является одним из основных гормонов высших растений и вызывает самые разнообразные физиологические эффекты. Ауксин активирует деление и растяжение клеток, необходим для формирования сосудов и боковых корней, обладает *аттрагирующим эффектом* (способностью притягивать питательные вещества). Поступление ИУК в ткани околоплодника — необходимое условие для инициации и формирования плода. Ауксин играет ключевую роль в ростовых движениях — тропизмах и настигах, а также в регуляции роста клеток листа растяжением. Полярный транспорт ИУК обуславливает явление апикального доминирования, т. е. тормозящего влияния апикальной почки на рост пазушных почек, и обеспечивает разметку и дифференцировку тканей в ходе онто- и морфогенеза.

ИУК присутствует практически во всех тканях растительного организма. В наибольших количествах этот фитогормон содержится в молодых почках и листьях, цветках, камбии, проводящей системе, семенах. Синтез ИУК наиболее активно идет в апикальных меристемах побегов, молодых листьях и развивающихся плодах. На ювенильных этапах развития основным источником ИУК (как, вероятно, и других фитогормонов) являются эндосперм и семядоли, которые обеспечивают гормонами формирующуюся корневую систему и надземную часть растений.

Известный американский физиолог растений Р. Клиланд считает, что специфические особенности ИУК, отличающие ее от других фитогормонов, можно описать пятью эффектами:

- индукция удлинения изолированных колеоптилей или отрезков стебля;
- индукция деления клеток в каллусной культуре в присутствии цитокинина;
- стимуляция образования боковых корней у стеблевых черенков;
- индукция роста партенокарпических плодов;
- индукция образования этилена.

Наиболее хорошо изученный эффект ауксина — активация роста растяжением клеток coleoptилей и побегов. Этот эффект лучше проявляется в тканях, выросших в темноте, и наблюдается при обработке ИУК в концентрации 10^{-8} — 10^{-6} моль/л. Более высокие концентрации ауксина вызывают торможение роста, которое в ряде случаев может быть связано с активацией синтеза этилена. Следует также отметить, что в тех концентрациях ауксина, при которых стимулируется рост побегов, сильно подавляется рост корней.

Еще в 1934 г. Ф. Вент установил, что обработка ауксином базальной части стеблевых черенков стимулирует корнеобразование. Этот эффект очень часто используется в современном растениеводстве и позволяет добиться укоренения таких черенков (в частности многих видов древесных растений), которые в обычных условиях не укореняются.

Обработка цветков ряда видов растений ИУК может приводить к завязыванию плодов даже без опыления. К таким видам относятся томаты, перец, табак, остролист, инжир и ежевика. Плоды, завязавшиеся у этих видов путем гормональной обработки без оплодотворения яйцеклетки, лишены семян. Таким образом, с помощью ауксина можно вызвать *партенокарпию*, или девственное плодоношение.

8.3. Гиббереллины

Растения риса часто поражаются грибом-аскомицетом, половая форма которого носит название *Gibberella fujikuroi*, а конидиальная — *Fusarium moniliforme*. Пораженные этим грибом молодые растения вытягиваются и полегают из-за недостаточной жесткости стебля. Эта болезнь в Японии получила название "бакане" ("глупые ростки" — foolish seedlings).

В 1912 г. японский ботаник К. Савада (K. Sawada) высказал предположение, что симптомы этого заболевания обусловлены действием химического соединения, выделяемого грибом. В 1926 г. его ученик Е. Куросава (E. Kurosawa) установил, что активное вытягивание стебля и полегание здоровых растений риса можно вызвать химическим веществом, содержащимся в культуральной жидкости, где выращивался гриб *Gibberella fujikuroi*. В 1938 г. японские исследователи из Токийского университета Т. Ябута (T. Yabuta) и Ю. Сумики (Y. Sumiki) выделили из культуральной жидкости два соединения, оказывавших сильное влияние на рост в длину проростков риса, которые они назвали гиббереллинами А и В.

Из-за Второй мировой войны эти работы были прерваны и долгое время оставались неизвестными для западных исследователей. Лишь в середине 1950-х, когда две группы ученых из Великобритании и США обнаружили японские статьи о гиббереллинах, эти работы были продолжены. Из фильтрата культуральной жидкости гриба *Gibberella fujikuroi* было выделено вещество, которое получило название гибберелловая кислота (ГК). Ее структурную формулу установили в 1954 г. английские биохимики Б. Кросс (B. Cross) и П. Куртис (P. Curtis). Приблизительно

в то же время сотрудники Токийского университета Н. Такахаши (N. Takahashi) и С. Тамура (S. Tamura) из комплекса гиббереллинов выделили три вида гиббереллинов — A_1 , A_2 и A_3 . Гиббереллин A_3 оказался идентичен гибберелловой кислоте, полученной английскими биохимиками Кроссом и Куртисом.

В культуральных жидкостях грибов можно найти практически весь спектр гиббереллинов, однако доминирующей почти всегда является гибберелловая кислота. Вскоре гиббереллины были обнаружены и в самих грибах, и в тканях незараженных растений. В 1956 г. М. Рэдли (M. Radley) в Англии, а также С. Вэст (C.A. West) и Б. Финни (B. Phinney) в США обнаружили вещества со свойствами гиббереллинов в семенах высших растений.

Дальнейшее развитие исследований гиббереллинов как фитогормонов определило открытие, сделанное в 1956 г. американским физиологом А. Лангом (A. Lang). Он установил, что ряд розеточных растений, которым для зацветания необходимы низкие положительные температуры и длиннодневный световой период, формируют цветонос и цветки в неиндуктивных условиях, если их обработать гиббереллином. Таким образом, А. Ланг впервые показал, что гиббереллины, как и условия среды, могут оказывать влияние на развитие растительного организма.

Открытие А. Лангом уникальных свойств гиббереллинов явилось мощным аргументом в поддержку гормональной теории цветения, выдвинутой отечественным ученым М. Х. Чайлахяном. Еще в 1937 г. М. Х. Чайлахян высказал гипотезу, согласно которой растения обладают гормональным комплексом цветения — "флоригеном", который, формируясь при наличии соответствующих внешних условий, переключает вегетативный этап развития растений на генеративный. После открытия А. Лангом гормональных свойств гиббереллинов М. Х. Чайлахян выдвинул предположение о том, что именно гиббереллины являются определяющим элементом флоригена. Концепция "флоригена" явилась очень продуктивной основой, позволившей в дальнейшем подойти к расшифровке общих принципов и конкретных механизмов формирования органов генеративного развития растений.

Первый "растительный" гиббереллин, который оказался идентичным гиббереллину GA_1 , полученному ранее из гриба *G. fujikuroi*, был выделен в 1958 г. Дж. МакМилланом (J. MacMillan) из незрелых семян фасоли *Phaseolus coccineus*. Поскольку содержание гиббереллинов в растениях невелико (от наногаммов до нескольких микрограммов в 1 г биомассы), для получения GA_1 МакМиллану с сотрудниками пришлось использовать несколько килограммов семян.

В связи с большим количеством гиббереллинов (более 100) их стали обозначать буквами ГА (в англоязычной литературе GA) или просто А с цифрой справа внизу — порядковым номером, который присваивается каждому новому соединению (рис. 8.8). Согласно этой номенклатуре, например, наиболее активные формы гиббереллинов растений обозначаются как A_1 (GA_1), A_4 (GA_4), A_3 (GA_3) и A_7 (GA_7). Гиббереллин A_3 (GA_3) называют *гибберелловой кислотой*.

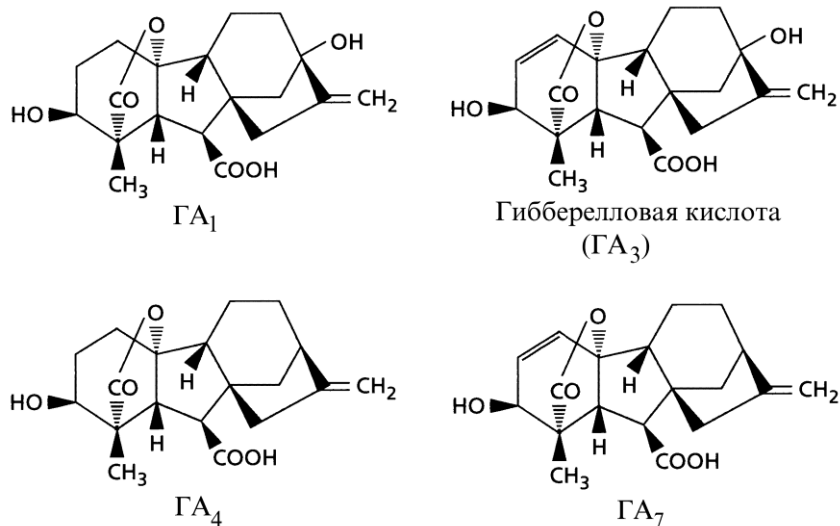


Рис. 8.8. Биологически активные гиббереллины (GA_1 , GA_3 , GA_4 и GA_7)

8.3.1. Синтез гиббереллинов

Гиббереллины синтезируются в молодых, интенсивно растущих тканях растений — молодых листьях, частях цветков, формирующихся семенах, верхушке корня. В меньших количествах гиббереллины образуются в зрелых, но еще не закончивших рост листьях. Наибольшее количество гиббереллинов содержится в незрелых семенах и плодах.

Гиббереллины синтезируются, как и все изопреновые соединения, из ацетил-СoА через мевалоновую кислоту и геранилгераниол. Непосредственным предшественником гиббереллинов является энт-каурен. Синтез гиббереллинов идет в три этапа (Kende, Zeevaart, 1997). На первом этапе за счет реакции циклизации геранилгераниолпирофосфат превращается вначале в копалилпирофосфат, а затем в энт-каурен (рис. 8.9).

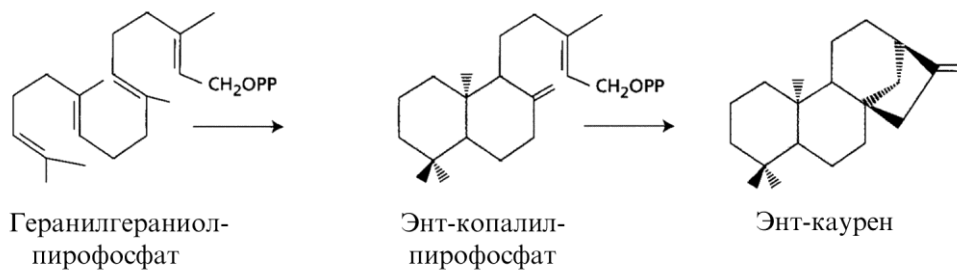


Рис. 8.9. Первый этап синтеза гиббереллинов

Два фермента — циклазы, катализирующие этот процесс, присутствуют в пропластидах меристематических тканей побегов, но их нет в хлоропластах. Поэтому в зрелых хлоропластах процессы первого этапа синтеза гиббереллинов идти не могут. Второй этап связан с последовательным окислением энт-каурена до ГА₁₂-альдегида с участием монооксигеназ, которые используют цитохром P₄₅₀ в своих реакциях (рис. 8.10). Ферменты эти локализованы в эндоплазматическом ретикулуме.

На третьем этапе ГА₁₂-альдегид окисляется с образованием первого гиббереллина — ГА₁₂, а затем и других гиббереллинов (в том числе и физиологически активного ГА₁) (рис. 8.11). Большинство реакций завершающего этапа происходит в цитоплазме и связано с процессами гидроксирования, катализируемого различными растворимыми диоксигеназами. Передвижение гиббереллинов по растению осуществляется пассивно по сосудам флоэмы.

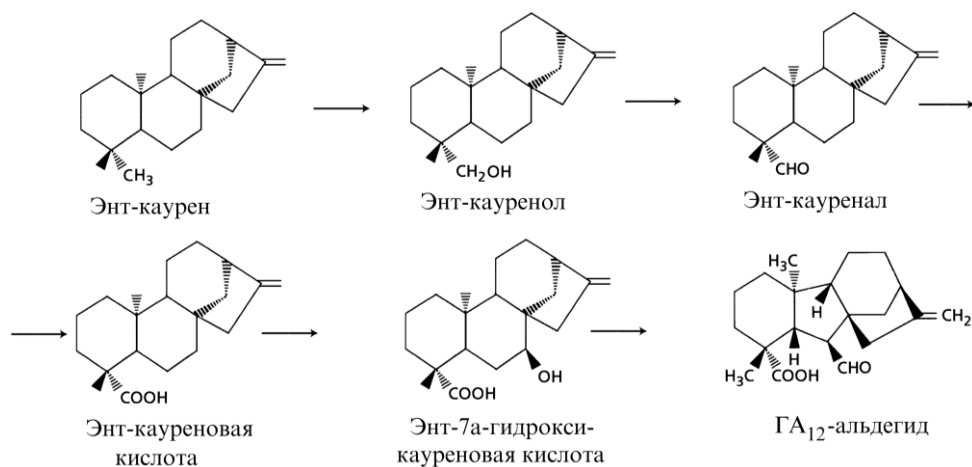


Рис. 8.10. Окисление энт-каурена до ГА₁₂-альдегида

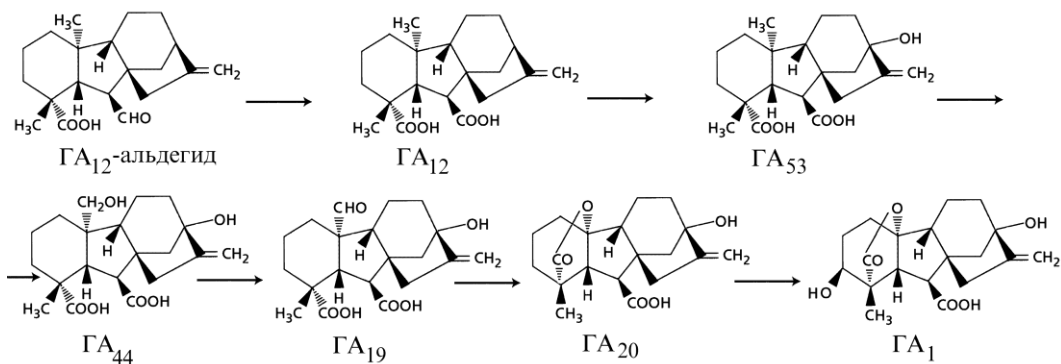


Рис. 8.11. Синтез гиббереллинов из ГА₁₂-альдегида у растений

Существуют свободные и связанные формы гиббереллинов. Большинство связанных форм образуется за счет ковалентных связей гиббереллинов с моносахаридами. Особенно их много в семенах. Связанные гиббереллины часто служат запасной и транспортной формами гормона.

8.3.2. Механизм проведения гиббереллинового сигнала

Для анализа механизма передачи гиббереллинового сигнала обычно применяют следующие методические подходы:

- использование клеток алейронового слоя зерновок злаков;
- использование мутантов с измененными ответными реакциями на гиббереллины;
- получение и использование трансгенных растений, в которых происходит или сверхэкспрессия гиббереллин-зависимых генов-мишеней, или их замолкание.

Действие гиббереллинов на алейроновый слой эндосперма злаков. Основным объектом в физиологических и молекулярно-генетических исследованиях механизма действия гиббереллинов служит изолированный алейроновый слой клеток эндосперма злаков. Главной моделью, которую используют для выяснения молекулярного механизма действия гиббереллинов, является процесс синтеза и секреции алейроновым слоем α -амилазы — фермента, расщепляющего крахмал.

Алейроновый слой составляют клетки, окружающие крахмалистый эндосперм и содержащие алейроновые зерна с белками (рис. 8.12). В ходе прорастания зерновки и на ранних этапах развития проростка под действием гиббереллинов происходит активация ферментов, которые гидролизуют крахмал и запасные белки эндосперма. В результате образуется много растворимых сахаров и аминокислот, перемещающихся к зародышу.

Следует особо отметить, что ГК стимулирует синтез и секрецию только α -амилазы. Другие гидролазы (например, рибонуклеаза, β -1,3-глюканаза) синтезируются в алейроновом слое независимо от гиббереллина. Гиббереллины контролируют только процесс их секреции клетками алейронового слоя в эндосперм.

Гидролиз крахмала осуществляется α - и β -амилазами. Продуктом гидролиза α -амилазы являются олигосахариды, состоящие из остатков глюкозы; β -амилаза расщепляет эти олигосахариды до дисахарида мальтозы, которая под действием мальтазы превращается в глюкозу. Фермент α -амилаза секретируется в крахмалистый эндосперм как алейроновым слоем клеток, так и щитком (семядолей зародыша злаков, которая граничит с эндоспермом зерновки). На рис. 8.12 приведена вероятная последовательность процессов, регулируемых гиббереллином в ходе прорастания зерновки ячменя.

Получены убедительные доказательства того, что именно ГК обеспечивает регуляцию экспрессии гена α -амилазы. В промоторной зоне гена α -амилазы ряда злаков выделена консервативная последовательность из 200—300 пар нуклеотидов, которая обеспечивает специфичность к ГК и необходима для регуляции гиббереллином экспрессии гена α -амилазы (рис. 8.13). Этот участок называют *гиббереллинрегу-*

лируемым комплексом — GARC (gibberellic acid response complex). В него входят три специфические нуклеотидные последовательности (боксы), необходимые для гиббереллинового ответа — пиримидиновый бокс, ТААСААА- и ТАТССАС-последовательности.

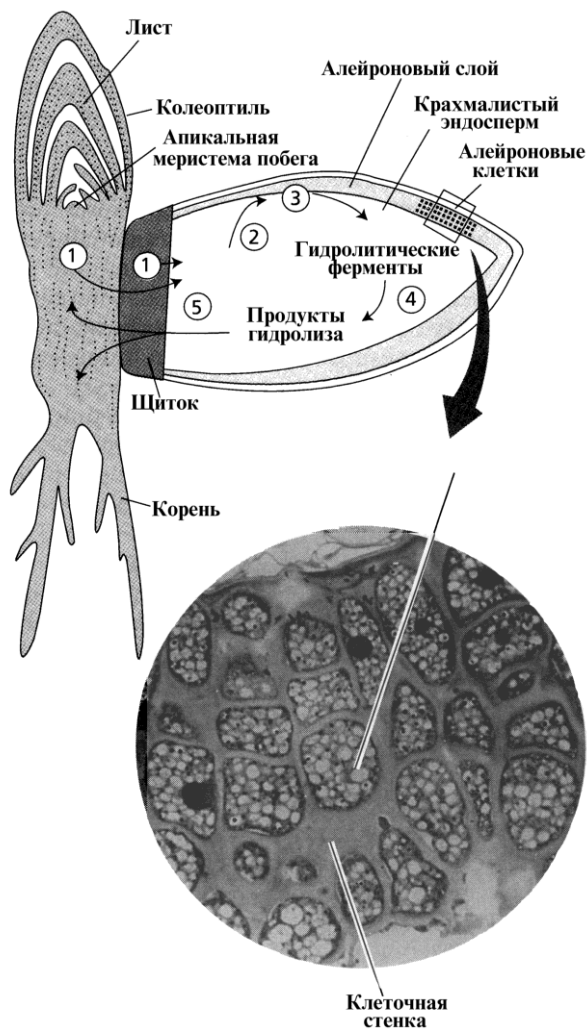


Рис. 8.12. Последовательность процессов, регулируемых гиббереллином в ходе прорастания зерновки ячменя (по Jones, MacMillan, 1984). Гиббереллины, синтезируемые в колеоптиле и щитке зародыша, транспортируются в крахмалистый эндосперм (1) и далее в алейроновый слой зерновки (2). В клетках алейронового слоя под влиянием гиббереллина индуцируется синтез α -амилазы и других гидролаз, секретирующихся в крахмалистый эндосперм (3). Крахмал и другие макромолекулы расщепляются до растворимых олигомеров (4), которые поглощаются щитком (5) и поступают в зародыш. На фотографии показаны клетки алейронового слоя, содержащие белковые тела и окруженные толстой клеточной стенкой



Рис. 8.13. Строение промоторной зоны гена α-амилазы (Jacobsen et al., 1995)

За чувствительность гена α-амилазы к ГК отвечает ТААСААА-бокс, который получил название *гиббереллин-отвечающего элемента* — GARE (gibberellic acid response element). GARE самостоятельно может обеспечивать чувствительность гена α-амилазы к ГК. Два других бокса — пиримидиновый и ТАТССАС — также необходимы для полноценного ответа на гиббереллин. Эти три бокса, объединенные в GARC, и являются мишенью соответствующих факторов транскрипции, образующихся в ответ на гиббереллин. Необходимо отметить, что процессы экспрессии генов, везикулярной секреции и отмирания клеток в алейроновом слое зерновок злаков контролируются парой фитогормонов — гиббереллином и абсцизовой кислотой.

Мутанты с повреждением ответных реакций на гиббереллин. Как уже упоминалось ранее, весьма эффективным способом выявления возможных рецепторов ГК и механизма передачи гиббереллинового сигнала является изучение мутантов, у которых повреждена система ответных реакций на обработку этим гормоном. В процессе скрининга были выделены два основных типа таких мутантов: нечувствительные к ГК карлики и растения с сильно удлинненными и утонченными побегами из-за так называемой *slender*-мутации. К ним относятся мутанты арабидопсиса *spy* (*spindly*), *pk1* (*pickle*), *gai* (*GA-insensitive*) *rga* (*repressor of GA1-3*), *rgl* (*RGA-like*) и их ортологи у кукурузы *d8* (*dwarf8*), риса *slr1* (*slender rice1*) и ячменя *sln1* (*slender barley1*) и ряд других.

При клонировании гена *GAI* оказалось, что его продуктом является фактор транскрипции, который в отсутствие гормона функционирует как репрессор на пути трансдукции гиббереллинового сигнала. Гиббереллин снимает эту репрессию, однако при повреждении гена *GAI* могут появляться не только ГК-нечувствительные карлики, но и ГК-нечувствительные великаны.

У ГК-нечувствительного карлика мутация *gai* затрагивает только ту часть, которая отвечает за взаимодействие с гиббереллином. Из-за повреждения участка связывания с гормоном белок *GAI* продолжает работать, как репрессор даже в присутствии ГК — растение превращается в ГК-нечувствительного карлика. Если же повреждения затрагивают участки, отвечающие за саму репрессию, то белок *GAI* перестает

функционировать как репрессор и теряет способность подавлять транскрипцию; растение при этом превращается в ГК-нечувствительного великана.

Из числа *slender*-мутантов особого внимания заслуживает *spy* (*spindly*) мутант арабидопсиса. Продукт гена *SPY* также является белком-репрессором, который в отсутствие гормона подавляет процессы, запускаемые ГК. Предполагается, что белок, кодируемый геном *SPY*, представляет собой особую N-ацетилглюкозаминтрансферазу — фермент, катализирующий реакцию гликозилирования белков. Эта реакция может приводить к потере активности белков или блокировать их фосфорилирование. Влияние ГК заключается в снятии репрессирующего эффекта *SPY*-белка. Таким образом, *GAI*- и *SPY*-белки функционируют как репрессоры гиббереллинового ответа. Присутствие гиббереллина снимает эту репрессию. Известны и другие ГК-регулируемые гены, кодирующие и репрессоры (объединяющиеся под названием *DELLA*-белки), и активаторы гиббереллинового сигнала.

DELLA-белки — репрессоры гиббереллинового сигнала. У арабидопсиса найдено 5 генов, которые кодируют *DELLA*-белки — *GAI*, *RGA*, *RCL1*, *RCL2* и *RCL3*. У риса их ортологом является белок *SLR1*, у ячменя — *SLN1*, у кукурузы — *D8*. *DELLA*-белки были также найдены у винограда и пшеницы. Эти белки получили свое название по консервативной аминокислотной последовательности (*DELLA*: D — асп, E — глут, L — лей, A — ала) вблизи N-конца белковой молекулы. *DELLA*-белки представляют собой отдельную группу, входящую в семейство так называемых *GRAS*-белков, являющихся транскрипционными регуляторами.

Ядерные белки *DELLA* являются консервативными репрессорами процесса трансдукции гиббереллинового сигнала. Обработка гиббереллином индуцирует снятие этой репрессии за счет фосфорилирования и последующего протеолиза *DELLA*-белков в *SCFSLY1/GID2* убиквитин-лигазном комплексе.

Рецепция и трансдукция гиббереллинового сигнала. Рецептор гиббереллина впервые был обнаружен М. Уегучи-Танака с коллегами (M. Ueguchi-Tanaka et al., 2005) у растений риса. Им удалось выделить и охарактеризовать новый ГК-нечувствительный карликовый мутант риса *gid1*. Оказалось, что ген *GID1* кодирует белок, схожий с гормон-чувствительными липазами (см. приложение 2. Рецептор гиббереллина *GID1*). Рекомбинантный белок глутатион-S-трансфераза (*GST*)-*GID1* имел высокое сродство только к активным гиббереллинам и связывал меченый $^3\text{H-}\Gamma\text{A}_4$, в то время как мутация по локусу *GST-GID1*, соответствующая трем аллелям *gid1*, приводила к потере способности высокоаффинного связывания гиббереллина. Константа диссоциации для ΓA_4 составила около 10^{-7} моль/л. Сверхэкспрессия *GID1* у растений риса вызывала повышенную чувствительность к ГК.

Вскоре аналогичный рецептор гиббереллинов был выявлен М. Накайямой с коллегами (M. Nakajima et al., 2006) у арабидопсиса. Были клонированы три гена, кодирующих рецепторы гиббереллинов (*AtGID1a*, *AtGID1b* и *AtGID1c*), каждый из которых являлся ортологом гена *OsGID1*. Белки, кодируемые этими генами, связывали различные гиббереллины, но наибольшее сродство имели к ΓA_4 .

Схема, иллюстрирующая рецепцию и трансдукцию гиббереллинового сигнала с участием белков-рецепторов (GID1) и белков-репрессоров (DELLA), приведена на рис. 8.14. Внутриклеточными рецепторами гиббереллина в растениях риса и арабидопсиса являются белки OsGID1, AtGID1a, AtGID1b и AtGID1c, которые входят в состав F-бокса протеасомного комплекса. В присутствии гиббереллина эти белки-рецепторы способны узнавать, связывать и вызывать избирательную деградацию (в SCF-протеасомном пути) репрессоров гиббереллинового сигнала — DELLA-белков, что, в конечном итоге, приводит к запуску процесса транскрипции генов первичного ответа на гиббереллин.

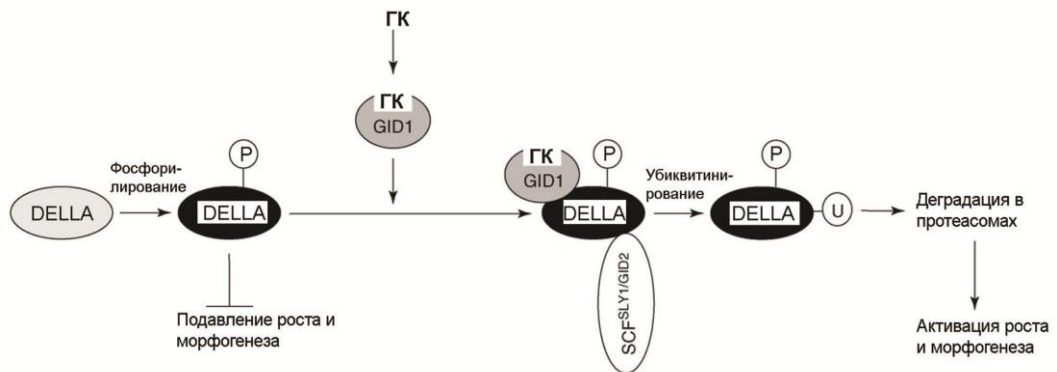


Рис. 8.14. Рецепция и трансдукция гиббереллинового сигнала в растениях риса с участием белка-рецептора GID1 и белка-репрессора DELLA (по Jiang, Fu, 2007, с изменениями)

Хотелось бы обратить особое внимание на то обстоятельство, что механизмы трансдукции ауксинового и гиббереллинового сигналов однотипны. На первом этапе передачи и ауксинового, и гиббереллинового сигналов происходит связывание гормона белками-рецепторами — TIR1 или GID1 соответственно. Связывание гормона с рецептором вызывает его конформационные изменения. Белки-рецепторы ауксина и гиббереллина (и TIR1, и GID1) входят в F-бокс, который является частью E3 убиквитин-лигазного SCF комплекса. Центральным событием в обоих сигнальных каскадах (ауксиновом и гиббереллиновом) является прямое лиганд-зависимое взаимодействие гормональных рецепторов (TIR1 или GID1) и репрессоров (Aux/IAA или DELLA). Изменение конформационных свойств рецептора (под действием гормонов) позволяют рецептору или прямо взаимодействовать с белками-репрессорами гормонального сигнала, или сформировать тройной комплекс: ИУК-TIR1-Aux/IAA или ГК-GID1-DELLA. И в первом, и во втором случае происходит убиквитинирование репрессоров (Aux/IAA и DELLA), их последующий протеолиз в SCF-протеасомном пути, снятие репрессии и запуск транскрипции генов первичного ответа на фитогормоны (см. рис. 8.4 и 8.14). Следует отметить, что такой тип трансдукции сигналов не встречается в клетках животных.

8.3.3. Физиологическая активность гиббереллинов

Влияние на рост растений. Наиболее характерным эффектом, который гиббереллины вызывают в растениях, является удлинение стебля. Цитологическая основа этого явления — активация деления клеток, усиление их растяжения или оба эти процесса вместе. С другой стороны, гиббереллины оказывают слабое влияние на рост клеток в корневой системе.

Усиление роста стебля под влиянием гиббереллинов делает растения гигантами. Например, конопля и табак, обработанные гиббереллином, выросли в длину до 5—6 метров (!). Длина клеток междоузлий овса и гипокотилей салата после обработки гиббереллинами возрастает в 3—5 раз. Вызываемая гиббереллинами активация роста проявляется не только в вытягивании междоузлий. Возрастает также количество междоузлий, усиливаются образование и рост боковых побегов, увеличиваются длина и число цветоносов. Ауксины, в отличие от гиббереллинов, практически не влияют на рост интактных растений.

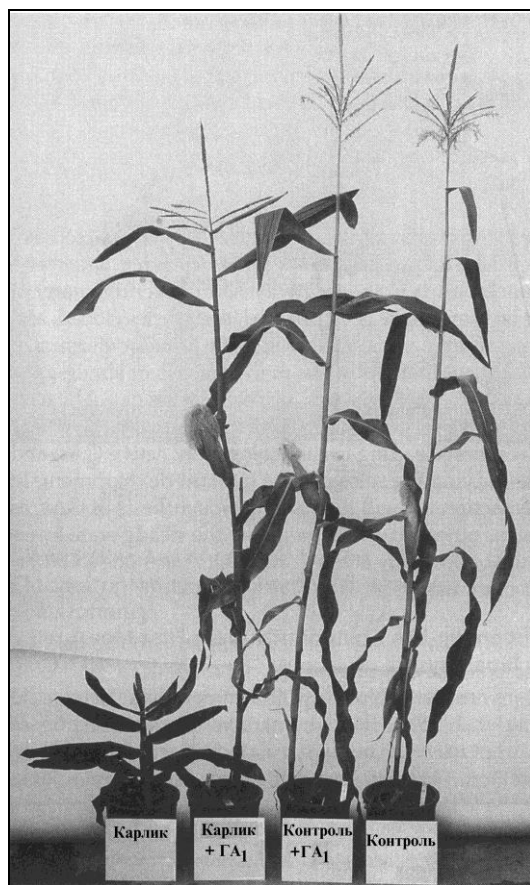


Рис. 8.15. Действие гиббереллина GA_1 на рост нормальных (контроль) и мутантных растений (карлик) кукурузы (Phinney, 1985)

Особенно эффектные ответные реакции получены при изучении роста мутантов-карликов и розеточных форм растений, обрабатываемых гиббереллином. На рис. 8.15 приведены данные Б. Финни (B. Phinney, 1985), который изучал действие гиббереллина GA_1 на рост карликовых мутантов кукурузы. Обработка GA_1 не влияла на рост нормальных растений, но резко стимулировала удлинение стебля карлика, у которого был нарушен гиббереллиновый обмен.

Еще более впечатляющий эффект наблюдается при обработке гиббереллином длиннодневных растений капусты, которые в условиях короткого дня находятся в розеточной форме. Гиббереллин индуцирует образование гигантского цветущего побега (рис. 8.16).



Рис. 8.16. Влияние гиббереллина (справа) на рост розеточных растений капусты (Wittner, Bukovac, 1957)

Гиббереллины и цветение растений. В отличие от других фитогормонов гиббереллины могут функционировать как индукторы цветения у многих видов растений. Обработка экзогенными гиббереллинами не только значительно ускоряет цветение двулетников и древесных растений, но также вызывает переход от вегетативного этапа развития к генеративному при неблагоприятных для цветения фотопериоде и температурных условиях.

В процессе долгих поисков соединений, способных вызвать в растениях эффект обработки низкими положительными температурами, оказалось, что только гиббереллины могут заменить потребность ряда растений в яровизации. Впервые этот эффект гиббереллина был обнаружен А. Лангом (1956) в условиях длинного дня у неярковизированного двулетника белены черной *Nyoscyamus niger*. В дальнейшем формирование цветков в первый год вегетации под влиянием гиббереллина было показано А. Лангом (1965) и М. Х. Чайлахяном (1969; 1970) для других двулетников — моркови, петрушки, репы, капусты и др. При этом оказалось, что гиббереллин был эффективен только в условиях длинного дня; на коротком дне этот гормон индуцировал только формирование побегов.

У растений, развитие которых контролируется как фотопериодом, так и определенной температурой, гиббереллин может вызывать эффекты, индуцируемые или длиннодневным фотопериодом, или воздействием низкими положительными температурами. Однако обработка гиббереллином не способна заменить одновременно эти два фактора.

Детерминация пола. М. Х. Чайлахян и В. Н. Хрянин (1982) показали, что гиббереллины оказывают влияние на выраженность пола некоторых видов растений. У однодомных сортов конопли ГК подавляет образование женских цветков и усиливает образование мужских. У растений семейства Cucurbitaceae количество мужских цветков тем больше, чем выше уровень эндогенных гиббереллинов. Обработка таких растений веществами, подавляющими синтез гиббереллинов, например хлорхолинхлоридом, снижает количество мужских цветков на растении. Однако известны примеры, когда гиббереллины вызывали противоположный эффект. Так, обработка ГК растений кукурузы *Zea mays*, клещевины *Ricinus communis*, хмеля *Humulus lupulus* и перца *Capsicum annuum* снижала число мужских цветков и повышала количество женских.

Регуляция развития семян и плодов. Еще одним специфичным эффектом, который вызывает экзогенная обработка гиббереллинами, является угнетение развития семян в плодах, формирующихся после оплодотворения. При этом происходит уменьшение и массы, и количества семян, но активируются процессы завязывания и развития плодов. Причем у винограда гиббереллин подавляет развитие семян не только у семенных, но и у малосемянных сортов, которые имеют недоразвитые семена с мягкой оболочкой. Этот эффект проявляется особенно четко, если обработка растений произведена во время цветения.

Образование партенокарпических (бессемянных) ягод под влиянием гиббереллина особенно легко происходит у сортов винограда с функционально женским типом

цветка, имеющих стерильную пыльцу и нуждающихся в перекрестном опылении. При изолировании соцветий (и невозможности опыления) ягоды у таких сортов не завязываются. Обработка соцветий гиббереллином индуцирует *партенокарпию*. Этот эффект часто применяют на практике: при затрудненном перекрестном опылении у таких сортов винограда именно обработка гиббереллином позволяет значительно повысить урожайность благодаря образованию партенокарпических ягод. Наиболее распространенной является обработка гиббереллином соцветий киш-мишных сортов винограда в период его массового цветения.

Формирование партенокарпических плодов при обработке гиббереллином выявлено и у других растений: томатов, семечковых и косточковых, цитрусовых, перца, манго и др. Для образования и последующего роста таких плодов достаточно однократного воздействия гиббереллином.

Регуляция покоя растений. Семена многих растений после созревания находятся в состоянии покоя и не прорастают даже при помещении их в благоприятные условия. Это состояние характерно также для почек большинства деревьев и кустарников, клубней и луковиц.

Состояние покоя многих семян может быть преодолено обработкой гибберелловой кислотой. Однако следует отметить, что экзогенный гиббереллин стимулирует прорастание только тех семян, которые характеризуются неглубоким покоем и приобретают способность к прорастанию под влиянием освещения или непродолжительной стратификации. Гиббереллин не действует на семена, находящиеся в состоянии глубокого покоя, который может быть преодолен длительной стратификацией.

Обработка гиббереллином покоящихся почек, клубней и луковиц нередко способствует их пробуждению и может заменить низкие положительные температуры или длиннодневный фотопериод, необходимые для выхода из покоя.

8.4. Цитокинины

Начиная с 1940 г., более 10 лет в лаборатории Ф. Скуга (F. Skoog) Висконсинского университета США велись интенсивные поиски соединений, способных инициировать и поддерживать пролиферацию клеток изолированной сердцевинной ткани стебля табака. И только в 1955 г. его сотрудникам К. О. Миллеру (C. O. Miller), М. Залтце (M. Saltza) и Ф. М. Стронгу (F.M. Strong) из автоклавированных препаратов ДНК молока сельди удалось выделить в чистом виде фактор клеточного деления. Это вещество было идентифицировано как *6-фурфуриламинопурин*. Благодаря способности индуцировать митозы и деление клеток оно получило название *кинетин*. Стимулирующий эффект кинетина на деление клеток табака наблюдался только в присутствии ауксина.

Цитокинины получили свое название из-за способности стимулировать цитокинез (клеточное деление). Факторы, индуцирующие деление клеток, были найдены в кокосовом молоке, экстрактах дрожжей, солоде. Первый природный цитоки-

нин — *зеатин* был выделен в 1963 г. новозеландцем Д. С. Летамом (D. S. Letham) и его сотрудниками из незрелых зерновок кукурузы. Для того чтобы выделить 1 мг зеатина и установить его структуру, было переработано 70 кг (!) семян кукурузы на стадии молочной спелости, когда семена содержат наибольшее количество цитокининов. Вскоре было установлено, что цитокинины синтезируются и выполняют гормональные функции у всех высших растений, папоротников и мхов.

Цитокинины обнаружены также у морских и пресноводных водорослей, некоторых бактерий и грибов, в опухолевой ткани корончатых галлов, возникающих, например, при поражении растительных тканей бактерией *Agrobacterium tumefaciens*. Цитокинины (зеатин и изопентениладенин) обнаружены также в культуральных жидкостях клубеньковых бактерий *Rhizobium japonicum* и *Rhizobium leguminosarum*. Продуцирование цитокининов ризобиями, вероятно, играет важную роль в индукции делений клеток коры корня в процессе формирования клубеньков.

К специфическим эффектам, которые вызывают только цитокинины, относятся индукция деления клеток каллуса в присутствии ауксина, стимулирование образования побегов в каллусной культуре на фоне низкой концентрации ИУК, задержка старения листьев.

8.4.1. Метаболизм цитокининов в растениях

Молекулы зеатина и кинетина имеют сходное строение. Обе молекулы являются производными аденина, или аминопурина. Зеатин может существовать в *цис*- или *транс*-конфигурации. В растениях преобладает и более активна *транс*-форма. Зеатин является преобладающей формой цитокининов в растительных тканях. Высокой цитокининовой активностью также обладают N_6 -(Δ_2 -изопентенил)аденин и дигидрозеатин (рис. 8.17). У некоторых растений, например у тополей, обнаружен *б-бензиламинопурин* (БАП), который до недавнего времени рассматривался как синтетический цитокинин. В следовых количествах в тканях присутствует кинетин. Нуклеотиды, обладающие цитокининовой активностью, обнаружены в составе некоторых тРНК.

Содержание риботидов и рибозидов изопентениладенина, зеатина и дигидрозеатина обычно превышает содержание соответствующих азотистых оснований. Хотя риботиды и рибозиды проявляют такую же активность в биотестах, как азотистые основания, однако с цитокининовым рецептором они не взаимодействуют.

Первым (и уникальным) ферментом в синтезе цитокининов является цитокининсинтаза (*аденилат-изопентенилтрансфераза*), катализирующая перенос изопентенильной группы от изопентенилпирофосфата на аденозинмонофосфат (рис. 8.18). Образующийся продукт — изопентениладенинриботид — далее может легко превращаться в *транс*-зеатинриботид и дигидрозеатинриботид, из которых уже образуются свободные формы цитокининов — изопентениладенин, *транс*-зеатин и дигидрозеатин.

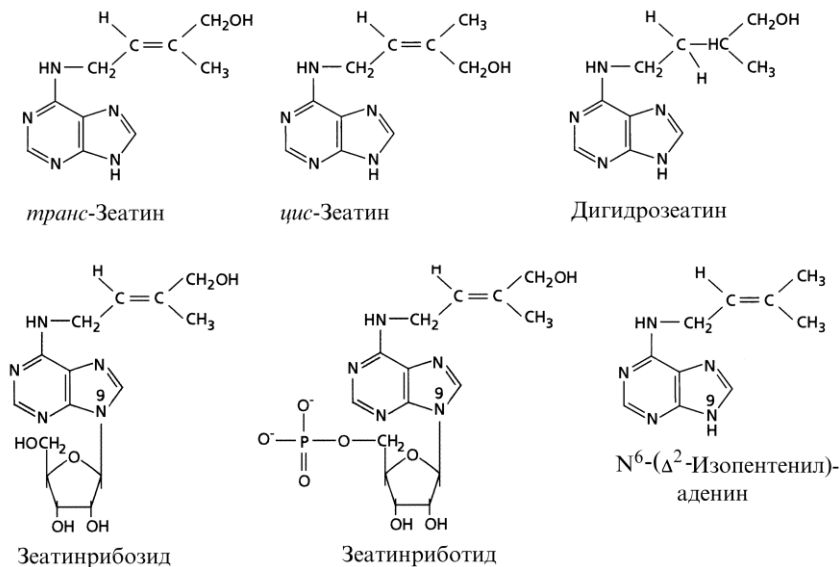


Рис. 8.17. Природные цитокинины

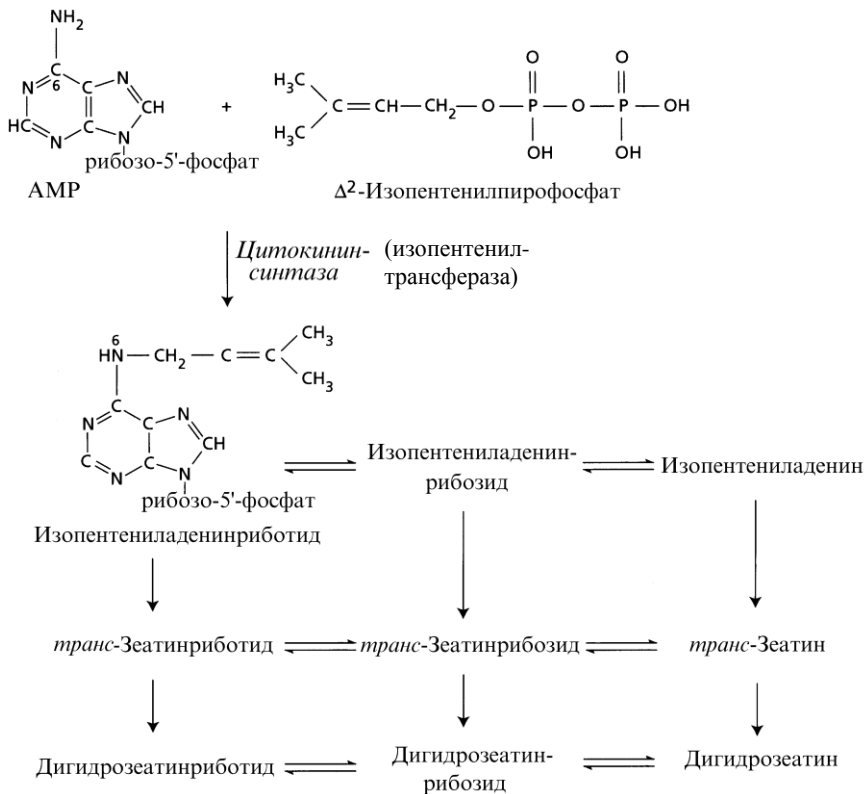


Рис. 8.18. Схема биосинтеза цитокининов (Gan, Amasino, 1996)

Главный этап окислительного распада цитокининов состоит в отщеплении боковой цепи у N^6 -аденина под действием цитокининдегидрогеназы. Активность цитокининдегидрогеназ наибольшая в тех тканях, которые богаты цитокининами: в меристемах корней, камбии, развивающихся зародышах, молодых листьях. Корни в целом содержат значительно больше этого фермента, чем побеги. Посредством конститутивной экспрессии гена цитокининдегидрогеназы у арабидопсиса можно снизить содержание цитокининов и наблюдать сокращение размера апикальной меристемы побега, сокращение числа и размеров листьев, значительное уменьшение количества клеток в листьях, укорочение междоузлий, увеличение размера корневой меристемы, степени ветвления корней и их массы.

Наиболее богаты цитокининами делящиеся клетки растений. Особенно много цитокининов в меристемах боковых корней, в камбии, в зародышах на ранних стадиях их развития. В молодых листьях с делящимися клетками концентрация цитокининов в десятки раз выше, чем в листьях, достигших окончательного размера. Синтезируются цитокинины, главным образом, в корнях и пассивно транспортируются по ксилеме в надземные органы. Самым важным фактором, регулирующим биосинтез цитокининов в корнях, является уровень азотного питания. Так, при выращивании кукурузы на богатых нитратами растворах в корнях происходит накопление изопентениладенинмонофосфата, в ксилемном соке увеличивается концентрация зеатинрибозида, а в листьях — зеатина. Имеется немало сведений о том, что ауксин подавляет биосинтез цитокининов, особенно в надземной части растения.

Некоторые бактерии и грибы, ассоциированные с растениями, способны синтезировать большие количества фитогормонов, в том числе и цитокининов. При заражении растений этими микроорганизмами индуцируются процессы дедифференцировки и деления клеток. Например, инфицирование стеблей бактерией *Agrobacterium tumefaciens* вызывает опухолевый рост клеток и образование корончатых галлов. Вирулентные штаммы этой бактерии содержат большую плазмиду, известную как T1-плазида, которая несет ряд генов, повышающих способность бактерии выживать в определенных условиях. Часть T1-плазмиды, известная как T-ДНК, включается в геном клетки хозяина. Эта T-ДНК содержит ген *IPT* (*isopentenyltransferase*), необходимый для синтеза цитокининов.

Трансгенные растения, содержащие ген *IPT* *A. tumefaciens* и характеризующиеся очень высоким уровнем цитокининов, часто используют как модель для выявления процессов, регулируемых этим гормоном в растительных организмах. У таких растений — сверхпродуцентов цитокининов наблюдается низкорослость, подавлен эффект апикального доминирования (т. е. формируется много боковых побегов), подавлено корнеобразование, задерживаются процессы старения, образуется больше листьев, которые из-за активации синтеза хлорофилла имеют более зеленую окраску. При этом также активизируется формирование хлоропластов, их рост и деление.

8.4.2. Механизм действия цитокининов

Хорошим инструментом для анализа молекулярных процессов, контролируемых фитогормонами, являются мутации в генах, продукты которых необходимы для синтеза, метаболизма или механизма действия фитогормонов. Описано более 40 генов, экспрессия которых контролируется цитокининами. Часть из них относится к генам первичного ответа, другие экспрессируются позже.

Рецепторы цитокининов. В 2001 г. Т. Иноуи (Т. Inoue) с коллегами был получен мутант арабидопсиса *cre1* (*cytokinin response 1*), который не реагировал на цитокинины. Оказалось, что расположенный во второй хромосоме ген *CRE1* кодирует рецептор цитокининов, гомологичный двухкомпонентным гистидинкиназам гибридного типа.

Идентификацию других рецепторов и последующих элементов передачи цитокининового сигнала (фосфотрансмиттеров и регуляторов ответа) ускорило полное секвенирование генома арабидопсиса. Вскоре были выявлены еще два гена: *АНК2* и *АНК3* (*arabidopsis histidine kinase*), которые (как и ген *CRE1*) кодируют гистидинкиназы, являющиеся рецепторами цитокининов. Таким образом, у арабидопсиса функции рецепторов цитокининов выполняют как минимум три белка, обладающие гистидинкиназной активностью — *CRE1*(АНК4), *АНК2* и *АНК3*.

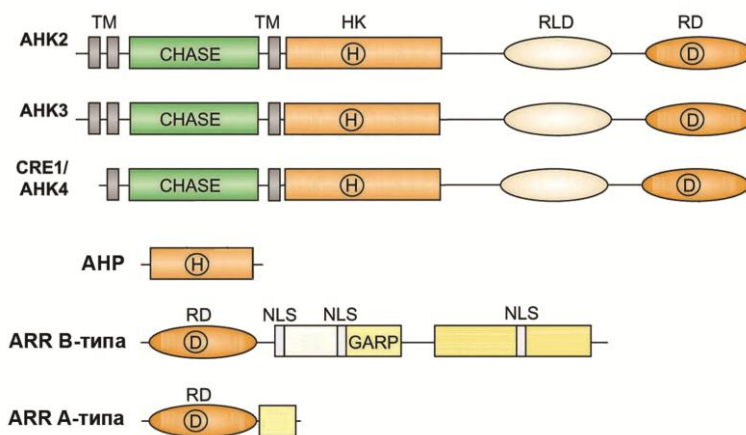


Рис. 8.19. Строение рецепторов (АНК2, АНК3, CRE/АНК4) и других белков, участвующих в передаче цитокининового сигнала (по Heyl, Schmölling, 2003): АНК (*arabidopsis histidine kinase*) — двухкомпонентные гистидинкиназы — интегральные белки плазматической мембраны, рецепторы цитокининов; АНП (*arabidopsis histidine phosphotransmitter protein*) — переносчик остатка фосфорной кислоты, фосфотрансмиттер; ARR (*arabidopsis response regulator*) — белки, участвующие в передаче цитокининового сигнала; CHASE — домен распознавания и связывания цитокининов; GARP — ДНК-связывающий домен; HK — гистидин-киназный домен; NLS (*nuclear localisation signal*) — домен, отвечающий за локализацию белка в ядре; RD (*receiver domain*) — принимающий домен; RLD (*receiver-like domain*) — принимающий домен; TM — трансмембранный домен; Н и D — остатки гистина и аспарагиновой кислоты

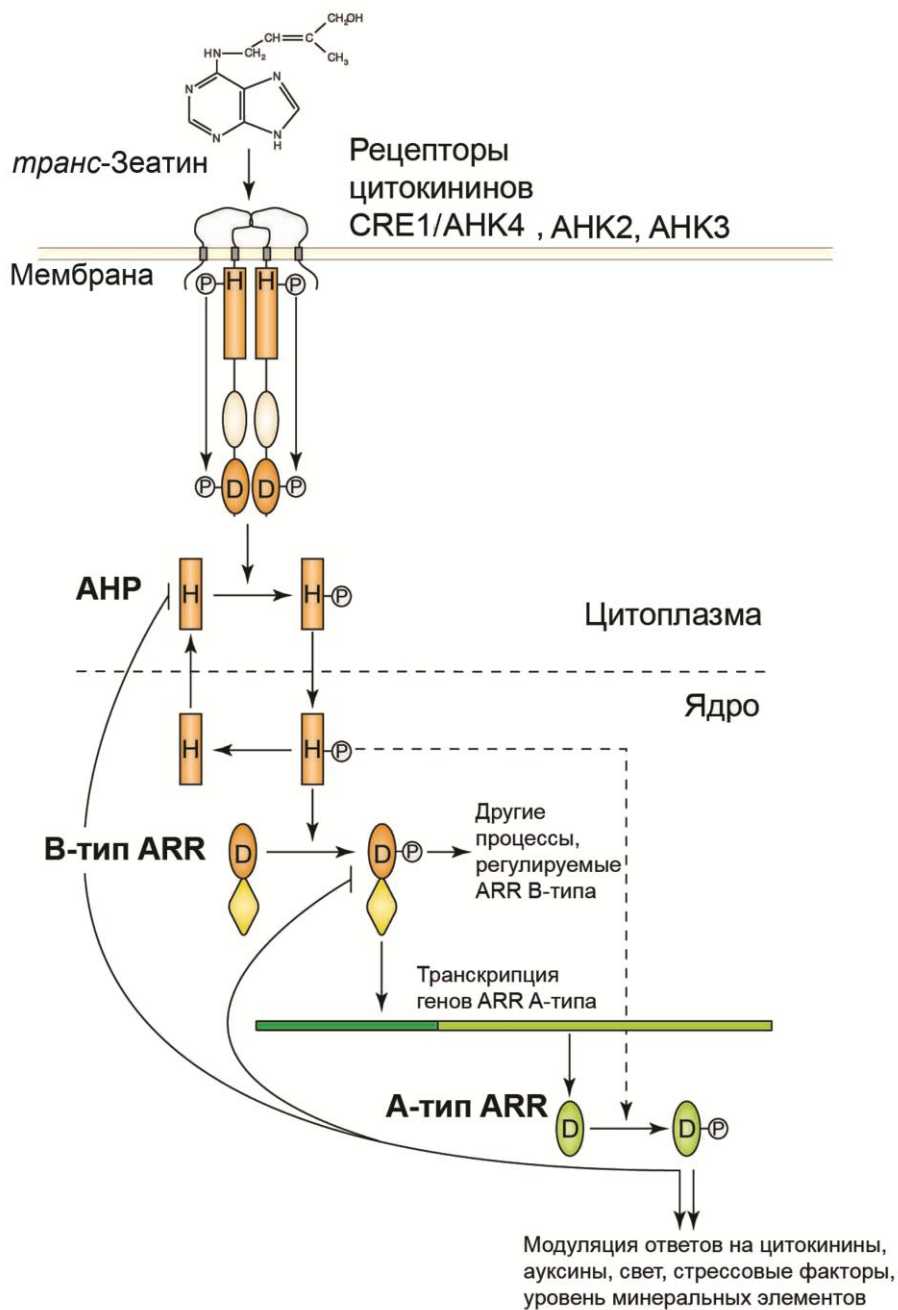


Рис. 8.20. Передача цитокининового сигнала путем последовательного фосфорилирования остатков гистидина и аспартата (по Heyl, Schmülling, 2003): ARR — arabidopsis response regulator; ANP — (arabidopsis histidine phosphotransmitter), гистидинсодержащий белок — переносчик остатка фосфорной кислоты; Н и D — остатки гистидина и аспарагиновой кислоты

Выявленные к настоящему времени рецепторы цитокининов имеют сходную первичную структуру: так называемый CHASE-домен, два или три трансмембранных домена на N-конце белковой молекулы, гистидин-киназный домен и два принимающих домена (см. рис. 8.19). Связывание цитокининов с рецепторами происходит именно в CHASE-домене (см. приложение 2. *Рецептор цитокининов АНК4*).

Белки, участвующие в передаче цитокининового сигнала. Помимо трех рецепторов (АНК4, АНК2 и АНК3) в сигнальный каскад, осуществляющий передачу цитокининового сигнала, входят еще два типа белков: белки-переносчики фосфата, фосфотрансмиттеры (*arabidopsis histidine phosphotransmitter protein*, АНП) и регуляторы ответа типа В (*arabidopsis B-type response regulator*, ARR B-type) (см. рис. 8.19). Белки ARR B-типа представляют собой связывающиеся с ДНК и локализованные в ядре факторы транскрипции, которые под действием цитокининов фосфорилируются и активируют (или блокируют) транскрипцию ряда генов первичного ответа.

На втором этапе ответных реакций на цитокинины (через 10 мин и более) функционируют регуляторы ответа типа А (*arabidopsis A-type response regulator*, ARR A-type). Белки ARR A-типа не имеют ДНК-связывающего домена и, будучи фосфорилированными, могут также подавлять первичный цитокининовый сигнал (по принципу отрицательной обратной связи), влияя на активность фосфотрансмиттеров или на регуляторы ответа типа В.

Рецепция и трансдукция цитокининового сигнала. При связывании цитокинина с рецептором происходит формирование димера и автофосфорилирование рецепторной гистидин-киназы по остатку гистидина (рис. 8.20). После этого происходит внутримолекулярная "переброска" фосфата на остаток аспартата белка-рецептора. Далее этот "активный" фосфат передается на остаток гистидина фосфотрансмиттеров, которые транспортируют фосфат от рецепторов в ядро на регуляторы ответа типа В, фосфорилируют их и таким образом модулируют транскрипционную активность белков ARR B-типа.

8.4.3. Физиологическое действие цитокининов

Несмотря на то, что цитокинины могут влиять на многие процессы в растении, наиболее существенным для роста и развития является их способность вместе с ауксинами контролировать процессы деления клеток. Установлено, что цитокинины стимулируют репликацию ДНК и активируют деление клеток, регулируя переходы из фазы G_1 в S и из G_2 в фазу митоза.

Одним из главных факторов, определяющих форму растительного организма, является *апикальное доминирование* верхушечной почки, которая подавляет развитие боковых почек и формирование побегов. Доминирующий эффект апикальной почки связан с повышенным уровнем ауксина в ней и аттрагирующим эффектом этого гормона. Многочисленные опыты с ^{32}P -фосфатом и ^{14}C -сахарозой показали, что питательные вещества передвигаются и накапливаются в зонах с повышенным уровнем ауксина, в том числе и в апикальных почках побегов. Важную роль в явлении апикального доминирования играют также цитокинины. У многих растений обработка цитокининами (или их сверхпродукция у трансгенных растений) устраняет

эффект апикального доминирования и активирует рост боковых почек, поэтому подавление роста боковых почек можно объяснить недостатком в них цитокининов.

Участие цитокининов в регуляции роста плодов подтверждается опытами, в которых показано присутствие этих фитогормонов в молодых плодах яблони, банана и томатов на стадии активного клеточного деления. Цитокинины участвуют в формировании и развитии клубней и регулируют выход семян и клубней некоторых растений из состояния физиологического покоя и их прорастание. С помощью цитокининов удается прервать покой спящих почек древесных растений.

Важным свойством цитокининов и ауксинов является способность регулировать процессы морфогенеза у недифференцированных тканей. Сразу же после открытия кинетина было обнаружено, что каллусная культура табака формирует корни или побеги в зависимости от соотношения ауксинов и цитокининов в среде. Результаты этого классического опыта, поставленного Ф. Скугом (F. Skoog) и К. Миллером (C. Miller), приведены на рис. 8.21.

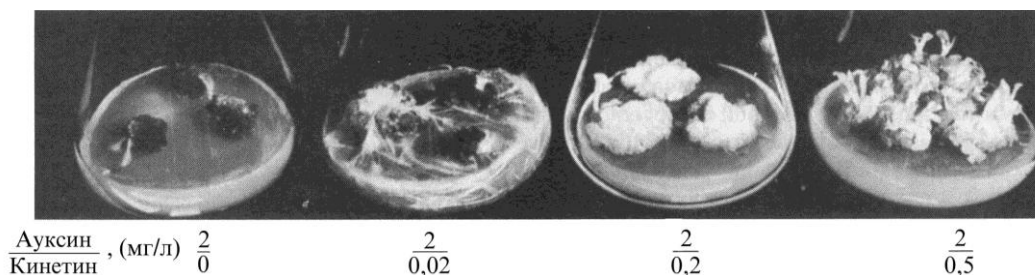


Рис. 8.21. Регуляция роста и органогенеза ауксином и цитокинином в каллусной культуре табака (Skoog, Miller, 1957)

Для образования корней из каллуса табака необходимо 2 мг/л ИУК и 0,02 мг/л кинетина. При возрастании концентрации кинетина до 0,2 мг/л наблюдается интенсивное развитие только каллусной ткани (без дифференцировки). Дальнейшее повышение содержания цитокининов в инкубационной среде до 0,5—1,0 мг/л индуцирует побегообразование. У протонемы мха цитокинины при повышенных концентрациях способствуют развитию гаметофора.

При помещении срезанных листьев в воду они быстро желтеют и стареют из-за разрушения хлорофилла и белков. Обработка изолированных листьев *цитокининами задерживает процессы старения* и распад хлорофилла. Цитокинины активируют также синтез и других пигментов, например бетацианинов у растений рода *Amaranthus*. Стимулирующий эффект цитокининов на синтез одного из бетацианинов — амарантина настолько специфичен, что его очень часто применяют в качестве биотеста для определения уровня цитокининов в тканях растений. Хорошим примером, иллюстрирующим задержку старения листьев цитокининами, служат "зеленые островки", появляющиеся осенью на желтеющих листьях некоторых древесных растений (в частности у клена и березы). Замедление распада хлорофилла в этих зеленых участках листа связано с повышенным содержанием цитокининов,

которые выделяют насекомые-фитофаги и патогенные грибы. Цитокинины обнаружены в слюнных железах личинок насекомых рода *Stigmella*, а также в выделениях патогенных грибов рода *Uromyces*.

К. Мотес с коллегами (K. Mothes et al.) установили, что обработка цитокининами предотвращает распад хлорофилла, разрушение органелл и старение изолированных листьев. Эти исследования также показали, что цитокинины повышают аттрагирующую способность клеток. *Аттрагирующий эффект* цитокининов выражается в том, что при нанесении гормона на участок листа усиливается передвижение органических и неорганических веществ к обработанному участку. Именно высокое содержание и аттрагирующие свойства цитокининов обеспечивают паразитическим растениям, например *Cuscuta reflexa*, постоянный приток питательных веществ из тканей растения-хозяина.

В регуляции процессов роста и развития растений необходимо участие и взаимодействие нескольких фитогормонов. Определяющее значение при этом имеет тандем ауксины—цитокинины. Именно эта пара гормонов действует синергично, стимулируя пролиферацию клеток, но антагонистично при регуляции роста боковых почек побега и боковых корней. Цитокинины (в отличие от ауксинов) подавляют формирование боковых корней, нарушают их нормальную организацию, рост и развитие корневого зачатка. Установлено, что этот угнетающий эффект связан со способностью цитокининов подавлять экспрессию и изменять паттерн PIN-белков, отвечающих за полярность транспорта ИУК. Таким образом, процесс образования боковых корней в растениях арабидопсиса определяется взаимодействием в системе ауксины—цитокинины.

8.5. Абсцизовая кислота

Наблюдения за процессами развития растений привели исследователей (К. Т. Сухоруков, 1938; Т. Немберг, 1949; F. Steward, S. Caplin, 1952) к выводу, что помимо гормонов-активаторов (ауксины, гиббереллины и цитокинины), в растительном организме должны существовать вещества, ответственные за торможение ростовых процессов. В 1949 г. Т. Хемберг (T. Hemberg) из покоящихся почек ясеня *Fraxinus excelsior* получил эфирный экстракт, который вызывал торможение роста колеоптилей овса *Avena sativa*. В 1953 г. Т. Беннет-Кларку (T. Bennet-Clark) и Н. Кеффорду (N. Kefford) удалось выделить это вещество хроматографически.

В 1961 г. Б. Луи (B. Lui) и Х. Карнс (H. Carns) из кожуры зрелых коробочек хлопчатника *Gossypium hirsutum* получили в кристаллическом виде вещество, ускоряющее опадение листьев, которое они назвали *абсцизином* (от англ. *abscission* — отнятие, ампутация). Аналогичная работа вскоре была проделана группой Ф. Эддикотта (Okhuma, Lyon, Addicott, Smith, 1963), им же удалось установить эмпирическую формулу абсцизина — $C_{15}H_{20}O_4$ и ряд его химических и физиологических характеристик. В это же время Ф. Уорингу (P. Wareing) с коллегами из листьев березы *Betula pubescens* и явора (клен белый) *Acer pseudoplatanus* выделили ингибитор, который вызывал покой почек. Полученное вещество ими было названо *дормином*

(от англ. *dormancy* — покой). Позже выяснилось, что дормин по физико-химическим характеристикам идентичен абсцизину.

Молекулярная структура абсцизина (дормина) была предложена в 1965 г. К. Окума (К. Okhuma) и др., а несколькими месяцами позже Дж. Корнфорт (J. Cornforth) с коллегами подтвердил ее с помощью химического синтеза. Во избежание возможных недопониманий с названием открытого вещества группы Эддикотта, Уоринга и Дж. Корнфорта в 1967 г. встретились и дали ему название — *абсцизовая кислота* (АБК).

АБК имеется у всех покрытосеменных и голосеменных растений, а также у папоротников, хвощей и мхов. Абсцизовую кислоту синтезируют цианобактерии, а также многие фитопатогенные, микоризообразующие и сапрофитные грибы. Особенно много АБК содержится в старых листьях, зрелых плодах, покоящихся почках и семенах. Большинство растительных тканей содержит АБК от 20 до 100 нг/г сырой массы. Особенно богаты этим фитогормоном созревающие семена и плоды, покоящиеся почки, старые листья. В условиях засухи и засоления концентрация АБК в тканях растений возрастает в десятки раз.

К наиболее важным процессам, которые контролирует в растениях АБК, относятся: регуляция покоя семян и почек, ранние этапы онтогенеза (развитие семян и проростков), закрывание устьиц, ответные реакции растений на такие стрессовые воздействия как засуха и засоление.

8.5.1. Химическая структура и синтез абсцизовой кислоты

Абсцизовая кислота является сесквитерпеном (C_{15}) и синтезируется из каротиноидов. Пространственная ориентация карбоксильной группы относительно 2-го углеродного атома определяет *цис*- или *транс*-изомеры АБК (рис. 8.22).

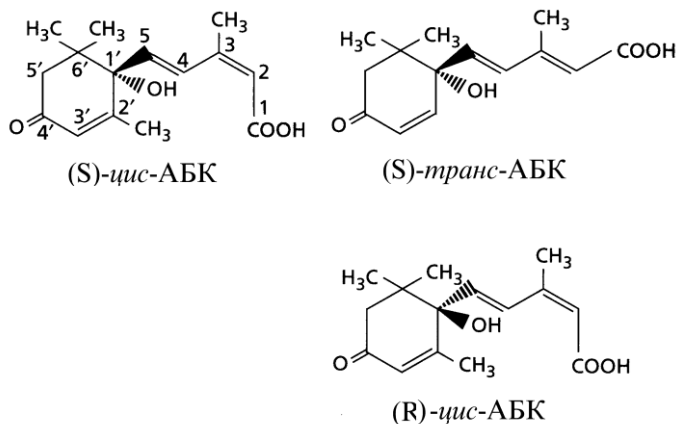


Рис. 8.22. Стереизомеры абсцизовой кислоты

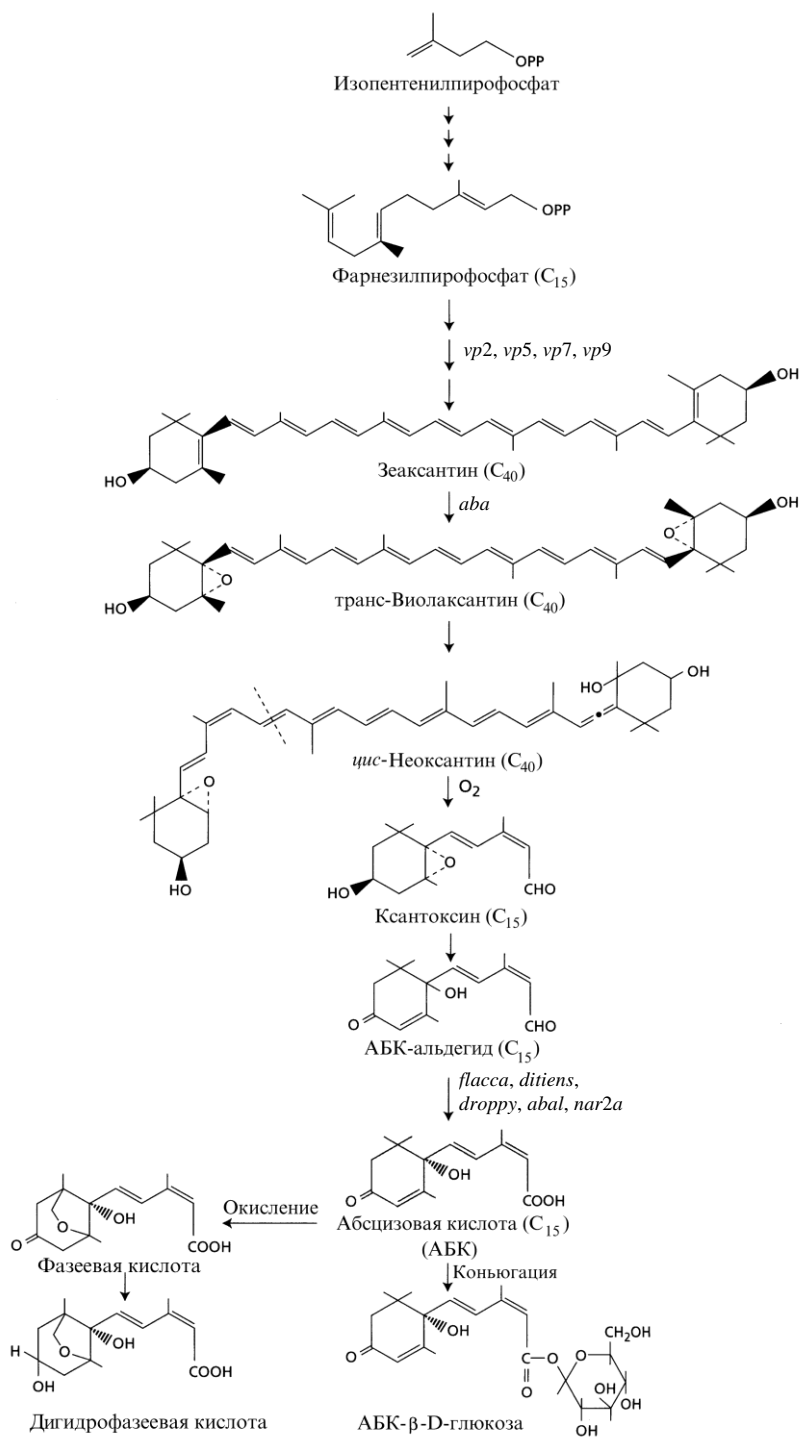


Рис. 8.23. Метаболизм АБК в растениях (по Taiz, Zeiger, 1998)

Почти вся АБК, содержащаяся в растительных тканях, находится в *цис*-форме. Помимо этого, поскольку в молекуле также имеется асимметричный атом углерода в положении 1' кольца, различают S- и R- (или соответственно + и –) энантиомеры АБК. В растениях АБК обычно находится в форме S-энантиомера. Поэтому, когда говорят об абсцизовой кислоте, чаще всего имеют в виду (S)-*цис*-АБК. Активность стереоизомеров (R)-АБК и *транс*-АБК на два-три порядка ниже. Концентрация активной формы АБК так же, как и других гормонов, определяется процессами ее синтеза, катаболизма, компарментализации и транспорта. На рис. 8.23 представлены пути биосинтеза, распада и связывания АБК, выявленные с помощью мутантов, у которых нарушены определенные этапы биосинтеза этого гормона.

Начальные этапы биосинтеза АБК идут в пластидах. Производное изопрена — изопентенилпирофосфат — служит предшественником для последовательного синтеза ксантофиллов — зеаксантина, виолаксантина и неоксантина. На завершающем этапе происходит окислительное расщепление 9'-*цис*-неоксантина с образованием ксантоксина, который (уже в цитоплазме) вначале преобразуется в АБК-альдегид, а затем в АБК.

Абсцизовая кислота образуется во всех органах растений, но преимущественным местом ее синтеза являются листья и кончики корней, откуда она по сосудистым пучкам транспортируется акро- и базипетально. Много АБК синтезируют созревающие семена на стадии обезвоживания и перехода в состояние покоя.

Основные метаболические превращения, которые претерпевает в высшем растении АБК, заключаются в образовании ее конъюгата с глюкозой или окислении АБК до фазеевой кислоты, которая далее превращается в дигидрофазеевую кислоту.

8.5.2. Механизм действия АБК

АБК-регулируемые гены. АБК регулирует экспрессию многих генов в ходе созревания семян, а также в стрессовых условиях (засуха, перегрев, низкие температуры, засоление). В геноме арабидопсиса выявлено более 800 генов, экспрессия которых повышается под действием АБК более чем в три раза. Из них около 100 генов кодируют транскрипционные факторы и 60 генов кодируют киназы, принимающие участие в трансдукции АБК-сигнала.

Характерной чертой генов, регулируемых АБК, является наличие в промоторной области нуклеотидной последовательности, называемой АВРС (ABA response complex). Это АБК-регулируемый комплекс, который является мишенью соответствующих факторов транскрипции, образующихся в ответ на АБК. Чувствительность этого комплекса к АБК определяется АВРЕ (ABA-response element) — АБК-отвечающим элементом (рис. 8.24). Наиболее хорошо изученным АБК-регулируемым комплексом является GARC гена α -амилазы ячменя, который активируется гиббереллинами, но репрессируется в ответ на АБК (см. разд. 8.3.2).

Транскрипционные факторы, которые специфически связываются с ABRE, называют ABF (ABRE binding factors). Фактор транскрипции ABF1 специфически индуцируется АБК и холодом, ABF2 и ABF3 синтезируются в ответ на АБК и засоление, а появление ABF4 стимулируется в ответ на АБК, засоление, холод и засуху.

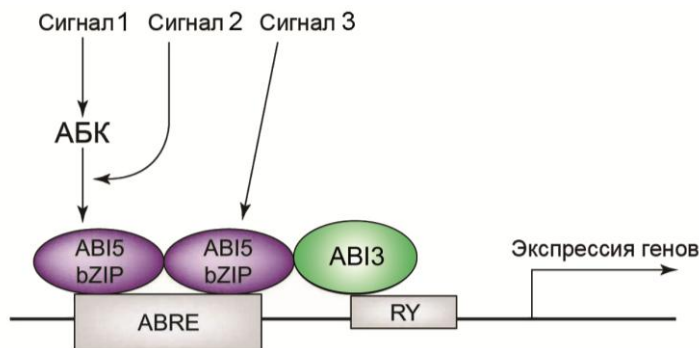


Рис. 8.24. Передача сигналов с участием АБК-регулируемых факторов транскрипции (ABI5, ABI3) и АБК-зависимого цис-регуляторного элемента (ABRE) (по Nambara, Marion-Poll, 2003, с изменениями): ABRE — цис-элемент АБК-зависимых генов; RY — энхансер; ABI3 и ABI5 — факторы транскрипции; bZIP — ДНК-связывающий домен ABI5

Основным элементом ABRE, с которым взаимодействуют АБК-регулируемые факторы транскрипции, является последовательность нуклеотидов PuACGTGGC, называемая G-боксом или G-ABRE. Впервые G-ABRE был выявлен в промоторах гена *EM* (*EMBRYO MATURATION*) пшеницы и гена *RAB16A* (*RESPONSIVE TO ABA*) риса. Именно с G-боксом могут специфично связываться факторы транскрипции, например bZIP-типа. Однако встречаются промоторы, которые имеют в своем составе G-боксы, но не реагируют на АБК. Известны также АБК-регулируемые гены, в составе промоторов которых нет G-ABRE.

Рецепция АБК-сигнала. Поиски рецептора АБК длились более 20 лет. Было выявлено несколько вероятных рецепторов — белков, связывающих АБК:

- FCA (flowering time control protein A) — ядерный РНК-связывающий белок;
- ABAR/CHLH (abscisic acid receptor/Н-субъединица Mg-хелатазы) — АБК-связывающий белок, локализованный в пластидах;
- GCR2 (G-protein-coupled receptor 2) — белок, локализованный в плазматической мембране.

Однако до сих пор так и не удалось выяснить, как эти белки участвуют в регуляции АБК-зависимых процессов.

В 2009 г. сразу две научные группы в одном и том же номере журнала "Science" сообщили об идентификации внутриклеточных рецепторов АБК — RCAR/PYR1/PYL, которые относятся к START-семейству белков.

Группой Ш. Катлера (S. Cutler) был найден специфический агонист АБК — *пурабактин* (pyrabactin) и получен нечувствительный к нему мутант *pur1* (Park et al., 2009). После этого ген *PYR1* (*Pyr-abactin resistance 1*) и несколько его гомологов *PYL* (*PYR1-related homologues of Arabidopsis*) были клонированы и охарактеризованы. Оказалось, что белки *PYR1/PYL* (см. приложение 2. *Рецептор АБК — PYR1*) способны связываться с АБК и подавлять активность серин/треониновых фосфатаз *PP2C* (protein phosphatase). Прототипами этих фосфатаз являются ингибиторы АБК-зависимых процессов — белок *ABI1* (abscisic acid insensitive 1) и его близкий гомолог *ABI2*.

Второй группе исследователей (Ma Y. et al., 2009) в процессе поиска регуляторов активности *ABI1* и *ABI2* удалось выявить рецептор АБК — *RCAR1* (regulatory component of ABA receptor 1). Этими исследователями было установлено, что экспрессия *RCAR1* (так же, как и *PYR1*) подавляла активность *ABI1* и *ABI2* и в несколько раз повышала экспрессию АБК-зависимых генов.

В дальнейшем было показано, что в процессе передачи АБК-сигнала происходит формирование рецепторного комплекса, состоящего из АБК-связывающего белка *RCAR1/PYR1/PYL* и протеинфосфатазы *PP2C* (*ABI1*). Именно этот рецепторный комплекс контролирует передачу АБК-сигнала и функционирует в цитоплазме и ядре. При связывании АБК с этими белками происходит формирование тримерного комплекса *RCAR (PYR1/PYL)–АБК–PP2C* (рис. 8.25) и снятие ингибирующего эффекта, оказываемого протеинфосфатазой *PP2C* на проведение АБК-сигнала.

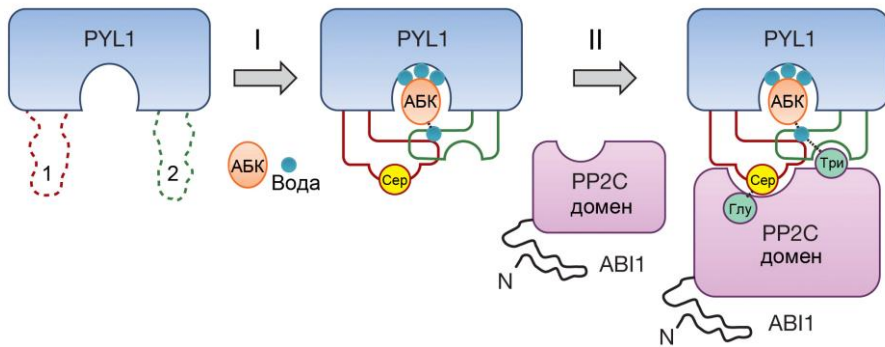


Рис. 8.25. Взаимодействие АБК с рецептором (*PYL1*) и ингибитором АБК-сигнала (*ABI1*) (по Miyazono et al., 2009, с изменениями). На первом этапе (I) происходит связывание АБК с *PYL1* с помощью и двух "подвижных" петель рецептора (1 и 2), и молекул воды.

На втором этапе (II) *PYL1*, работая как скаффолд, связывает протеинфосфатазный домен *ABI1* и блокирует таким образом его работу

Механизм передачи АБК-сигнала показан на рис. 8.26.

В отсутствие АБК протеинфосфатаза *PP2C* блокирует передачу АБК-сигнала путем подавления работы протеинкиназ *SnRK* (sucrose-nonfermenting related kinase), их гомолога *OST1* (open stomata1), а также, возможно, Ca^{2+} -зависимых протеинкиназ *СРК* (calcium-dependent protein kinases).

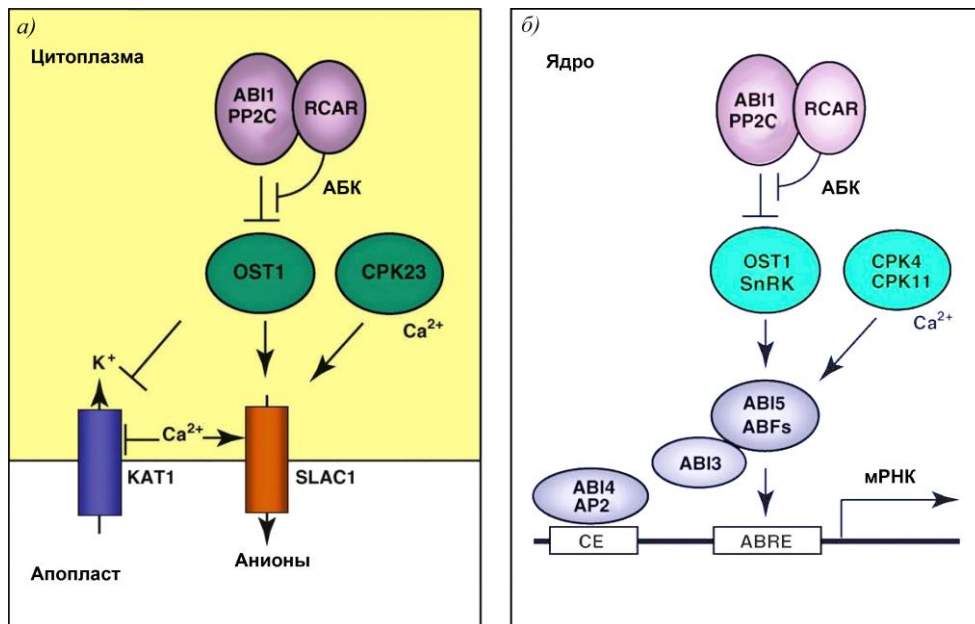


Рис. 8.26. Передача АБК-сигнала (по Raghavendra et al., 2010, с изменениями):
а — в цитоплазме; *б* — в ядре. RCAR — рецептор АБК; ABI1 — ингибитор АБК-сигнала; PP2C — протеинфосфатаза; SnRK, OST1 и СРК — протеинкиназы; ABI3, ABI4, ABI5, AP2 и ABF — транскрипционные факторы АБК-зависимых генов; КАТ — калиевый канал; SLAC1 — анионный канал; ABRE — цис-элемент АБК-зависимых генов; СЕ — фактор сопряжения (coupling element), необходимый для индукции АБК-зависимых генов

В присутствии АБК происходит блокирование фосфатазной активности. Протеинкиназы (OST1, SnRK) высвобождаются от ингибирования и путем фосфорилирования запускают проведение АБК-сигнала. В замыкающих клетках устьиц их мишенями являются ионные каналы, а в ядре — соответствующие факторы транскрипции.

Трансдукция АБК-сигнала. При расшифровке механизма трансдукции АБК-сигнала часто возникают большие затруднения, поскольку его передача происходит не линейным путем, а осуществляется через очень сложную сигнальную сеть. Взаимосвязи между различными сигнальными путями могут осуществляться как минимум двумя путями:

- или один сигнальный путь влияет на уровень сигнального элемента в другом сигнальном пути;
- или различные сигнальные пути сходятся в каком-то общем, узловом сигнальном компоненте, являющемся связующим звеном нескольких сигнальных путей.

Если процесс передачи АБК-сигнала осуществляется вторым способом, то возникают большие трудности с расшифровкой процессов, контролируемых именно АБК, которые начинаются после узлового сигнального компонента.

Одними из таких узловых компонентов, на которых сходятся различные сигнальные пути, могут быть промоторы АБК-регулируемых генов — их *цис*-регуляторные элементы АВРЕ. Отличительной особенностью генов, в состав которых входят АВРЕ, является то, что они реагируют не только на АБК, но и другие сигналы (см. рис. 8.24).

Механизм закрывания устьиц под действием АБК. Одной из самых ранних реакций при водном стрессе является резкое повышение уровня АБК, индуцирующее закрывание устьиц, что снижает потери воды за счет транспирации и защищает растение от засухи.

Закрывание устьиц под действием АБК происходит в результате падения тургора в замыкающих клетках за счет выхода ионов K^+ , сахарозы, анионов, а также превращения яблочной кислоты в осмотически неактивный крахмал.

Многими исследователями в экспериментах, выполненных на *протопластах*, выделенных из замыкающих клеток устьиц, было показано, что активации анионных каналов под действием АБК предшествует повышение концентрации цитоплазматического кальция $[Ca^{2+}]_{цит}$ (Schroeder, 2001; Kwak et al., 2008; Kim et al., 2010). С использованием Ca^{2+} -чувствительных флуоресцентных зондов было зарегистрировано возрастание уровня $[Ca^{2+}]_{цит}$ в замыкающих клетках под действием АБК. Эти исследования привели к предположению (которое вошло во все учебники) о том, что цитоплазматический Ca^{2+} непосредственно участвует в передаче сигнала при действии на замыкающие клетки АБК.

Однако в работах В. Левченко с коллегами (Levchenko et al., 2005; 2008) установлено, что при передаче сигнала, инициируемого АБК в замыкающих клетках и ведущего к активации анионных каналов плазматической мембраны, повышение уровня $[Ca^{2+}]_{цит}$ не является необходимым событием. В этих исследованиях, выполненных на *интактных растениях* садовых бобов *Vicia faba*, коммелины обыкновенной *Commelina communis* и табака *Nicotiana glauca*, было показано, что замыкающие клетки устьиц реагируют на АБК кратковременной активацией анионных каналов плазматической мембраны. Однако, несмотря на активацию анионных каналов плазматической мембраны, никаких изменений уровня $[Ca^{2+}]_{цит}$ зарегистрировано не было.

Различную реакцию на АБК интактных клеток и полученных из них протопластов В. Левченко (2009) объясняет тем, что "существуют принципиальные качественные различия в протекании некоторых физиологических и регуляторных реакций в замыкающих клетках *in situ* и при регистрации их в изолированных тканях". Эти различия касаются, в частности, кальциевого гомеостаза клеток и регуляции работы анионных каналов плазмалеммы.

В плазмалемме замыкающих клеток устьиц функционируют два типа анионных каналов: медленные S-типа (slow) и быстрые R-типа (rapid). Оба типа каналов активируются при деполяризации мембранного потенциала. При активации анион-

ных каналов S-типа наблюдается долговременное (в течение нескольких минут) падение мембранного потенциала. Активация анионных каналов R-типа приводит к кратковременной деполяризации плазмалеммы.

А. Грабов с коллегами (1997) установили, что обработка АБК активирует именно медленные каналы S-типа. Поэтому центральным звеном механизма регуляции закрывания устьиц, вероятно, следует считать активацию АБК анионных каналов, поскольку только они способны обеспечивать длительную и устойчивую деполяризацию мембраны, необходимую для включения K_{out}^+ -каналов и выхода ионов K^+ из замыкающих клеток. Это подтверждается тем, что угнетающий эффект блокаторов анионных каналов S-типа на АБК-индуцируемое закрывание устьиц выражен в гораздо большей степени, чем блокирование работы Ca^{2+} -каналов.

Позже в работе Рольфсема с коллегами (Roelfsema et. al., 2004) было показано, что деполяризация мембраны, индуцированная АБК в замыкающих клетках устьиц *Vicia faba*, коррелировала с активацией анионных каналов и S-, и R-типа. Авторы считают, что основой деполяризации плазмалеммы клеток устьиц является активация под действием АБК обоих типов анионных каналов.

8.5.3. Физиологическая роль АБК в растении

АБК играет ведущую роль в регулировании покоя, поскольку является ингибитором прорастания семян и роста почек. Абсцизовая кислота накапливается при водном дефиците, вызывая закрывание устьиц. Растущие ткани или органы растения обычно отвечают на обработку АБК обратимым торможением роста, которое может частично сниматься другими гормонами. При этом АБК выступает как антагонист ИУК, цитокининов и гиббереллинов. Торможение роста, вызываемое АБК, сопровождается подавлением синтетических процессов и ускорением старения тканей.

Переход растений от состояния активного роста к физиологическому покою и наоборот определяется балансом фитогормонов (*подробнее см. разд. 9.4.5*). Переход в состояние покоя клубней, почек или семян сопровождается значительным увеличением содержания АБК, а выход из покоя связан со снижением содержания АБК и с повышением уровня гиббереллинов и (или) цитокининов.

Выделен ряд мутантов с нарушением покоя семян, которые прорастают прямо на материнском растении. К таким мутантам, называемым живородящими, относят *vp2—vp9* (*viviparous*) у кукурузы и *aba* (*abscisic acid*) у арабидопсиса. Их характерной особенностью является низкое содержание АБК в тканях.

Помимо семян, АБК принимает участие также в регуляции покоя почек. Накопление АБК, особенно у древесных растений, является необходимым фактором для переживания холода в зимний период. Это достигается за счет торможения ростовых процессов и образования чешуек, которые закрывают меристематические ткани. Процесс перехода почек к состоянию покоя или роста также регулируется соотношением в тканях концентрации АБК и гиббереллинов.

АБК нередко называют *стрессовым гормоном*, поскольку ее концентрация сильно изменяется при резких колебаниях температуры, засолении и водном дефиците. На рис. 8.27 приведена динамика изменения водного потенциала, устьичного сопротивления и содержания АБК в листьях кукурузы при водном стрессе. Хорошо видно, что падение водного потенциала листа сопровождается увеличением концентрации АБК и устьичного сопротивления. Ю. Шур с коллегами (U. Schurr et al., 1992) изучали влияние водного стресса на содержание АБК в сосудах ксилемы. Они установили, что если растения подсолнечника хорошо обеспечены водой, то концентрация АБК в ксилемном соке колеблется от 1 до 15 нмоль/л; при водном дефиците она становится больше 3 мкмоль/л. Таким образом, при возникновении водного дефицита активируется синтез АБК в корнях и повышается ее содержание в ксилеме. Это служит растению сигналом, который приводит к закрыванию устьиц и снижению транспирации. Одновременно наблюдается ускорение развития корневой системы и замедление ростовых процессов в надземной части растений.

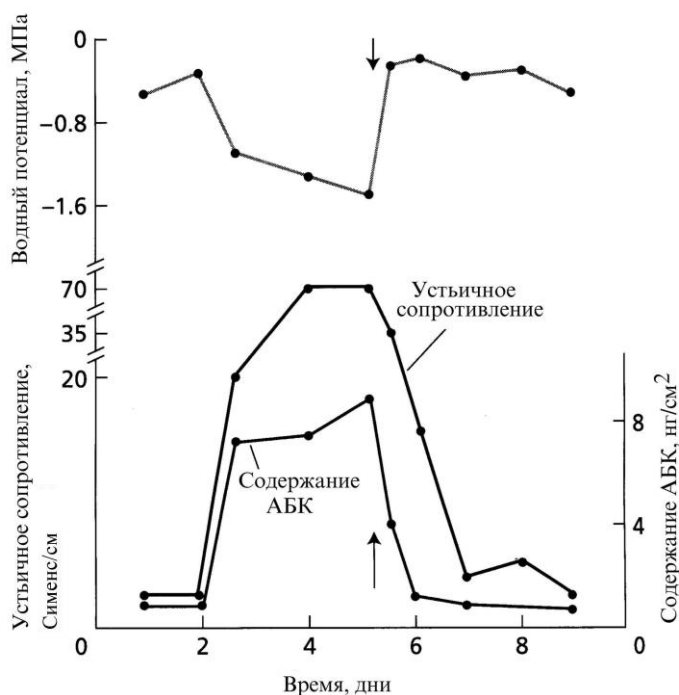


Рис. 8.27. Динамика водного потенциала, устьичного сопротивления и содержания АБК в листьях кукурузы в ответ на водный стресс (по Beardsell, Cohen, 1975). Стрелками показан момент полива растений

Очень важной функцией АБК является активация синтеза специальных белков, которые способствуют повышению устойчивости зародыша к высыханию. Выявлено, что на последних этапах развития семян с участием АБК активируется экспрессия гена *EM* (*embryo maturation*), относящегося к семейству *LEA*-генов, которые коди-

руют так называемые Леа-белки, накапливающиеся при высыхании семян, а в вегетативных тканях — при таких стрессовых воздействиях, как засуха и заморозки. Предполагается, что Леа-белки обеспечивают защиту клетки от потери воды, а также поддерживают структуру белков и мембран за счет того, что они способны прочно связывать воду и предотвращать образование кристаллов льда.

8.6. Этилен

Впервые участие этилена в регуляции роста растений установил сотрудник кафедры физиологии растений Санкт-Петербургского университета Д. Н. Нелюбов в 1901 г. Исходной точкой исследований Д. Н. Нелюбова послужили хорошо известные и уже описанные в литературе явления: в лабораторных условиях в условиях темноты многие растения (проростки гороха, вики, чечевицы и ряд других) приобретали ненормальный вид — рост стеблей в длину сильно замедлялся, они утолщались и начинали расти горизонтально.

Основная цель исследований Д. Н. Нелюбова, которая была поставлена его учителем академиком А. С. Фаминциным, заключалась в изучении влияния условий внешней среды на ростовые движения проростков. Д. Н. Нелюбову необходимо было выявить причины, из-за которых растения не могли нормально расти и развиваться в лабораторных условиях.

Д. Н. Нелюбов обстоятельно исследовал зависимость направления роста стеблей от температуры, света, влажности, газового состава и пришел к выводу, что стебли начинают переходить к горизонтальному росту только в том случае, когда к чистому воздуху добавляется светильный газ. Следует отметить, что в те годы в лабораторном воздухе всегда имелось небольшое количество светильного газа. После этого он стал изучать воздействие на растения составных частей светильного газа — сероводорода, ацетилена, бензола, ксилола, нафталина и этилена.

Было проведено огромное число опытов, из которых стало ясно, что только этилен и ацетилен обладают способностью в очень низких концентрациях вызывать "тройной эффект" — горизонтальный рост (*диагравитропизм*), замедление роста в длину и утолщение стебля (рис. 8.28). Помимо гороха этот эффект наблюдался

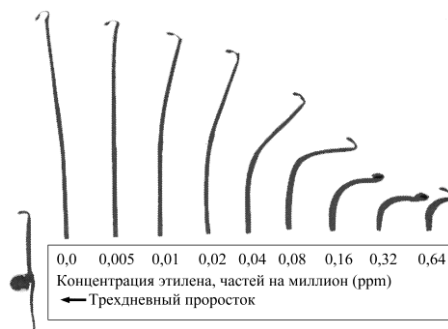


Рис. 8.28. Действие этилена на рост проростков гороха (Нелюбов, 1914)

на других видах растений — вике, бобах, душистом горошке, настурции, куколе, картофеле. Таким образом, Д. Н. Нелюбову впервые удалось установить, что причина нарушений роста растений в лабораторных условиях связана с наличием этилена в составе светильного газа.

Исследования Д. Н. Нелюбова послужили мощным толчком к открытию других фитогормонов и практическому использованию регуляторов роста и развития растений. Обработка этиленом стала применяться для ускорения созревания плодов, а ингибиторами его синтеза — для задержки старения цветов.

Первое упоминание о том, что этилен является естественным продуктом растительных тканей, было сделано в 1910 г. Х. Касинсом (H. Cousins). Он писал, что летучие выделения спелых апельсинов способны индуцировать преждевременное созревание бананов, которые хранятся вместе с ними.

В 1924 г. Ф. Денни (F. Denny) показал, что преждевременного созревания апельсинов, бананов и других плодов можно добиться обработкой этиленом. В 1934 г. Р. Гэйн (R. Gane) с коллегами идентифицировали этилен химически как нормальный продукт метаболизма растений (он содержался в газообразных продуктах метаболизма яблок) и, исходя из его физиологических эффектов, впервые назвали его гормоном. В дальнейшем выяснилось, что этилен способны синтезировать не только плоды, но также листья, цветки, облиственные стебли, корни и семена. Тем не менее долгое время этилен не относили к гормонам, считая, что вызываемые этиленом эффекты опосредованы ауксином.

Этилен синтезируют все растения, за исключением водорослей, а также грибы и некоторые бактерии. Скорость образования этилена в тканях растений в среднем составляет 5—50 нл/ч (г сырой массы), а содержание — 0,1—2,0 нл/г сырой массы. Много этилена накапливается в опадающих листьях и цветках, в узлах побегов. Очень высоким содержанием этилена отличаются созревающие плоды. Например, в яблоках его концентрация достигает 2500 нл/г сырой массы. В местах механических повреждений растения синтезируют "раневой этилен".

8.6.1. Синтез этилена и цикл Янга

Этилен ($\text{CH}_2 = \text{CH}_2$) может синтезироваться практически во всех частях растительного организма, однако более активно он образуется в меристематических тканях и в зоне узлов. Поскольку синтез этилена индуцируется при стрессовых воздействиях (затопление, охлаждение или высокие температуры, патогены, засуха), его иногда называют *стрессовым гормоном*.

В 1964 г. М. Либерман (M. Lieberman) и Л. Мэпсон (L. Mapson) показали, что различные ткани растений способны превращать ^{14}C -метионин в ^{14}C -этилен. Однако окончательно механизм синтеза этилена удалось установить только через 15 лет, когда был выявлен его непосредственный предшественник. Очень важным этапом

в расшифровке пути синтеза этилена в растительных тканях стала работа Д. О. Адамса и С. Ф. Янга (D. O. Adams, S. F. Yang, 1979), в которой они показали, что превращение метионина в этилен осуществляется через синтез 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (АЦК), которая является непосредственным предшественником этилена и образуется из S-аденозилметионина. На рис. 8.29 дана вся последовательность реакций, приводящая к образованию этилена в растениях.

Превращение S-аденозилметионина в АЦК осуществляет локализованный в цитоплазме фермент — АЦК-синтаза. Гены, контролирующие синтез АЦК-синтазы, активируются при различных стрессовых воздействиях (механические повреждения, резкие колебания температуры, засуха, анаэробизм), а также гормональными сигналами (ауксин и сам этилен). Последний этап синтеза этилена требует наличия кислорода и катализируется ферментом АЦК-оксидазой, которая преобразует АЦК в этилен. Однако в этилен превращается не вся АЦК, часть ее может образовывать очень устойчивую конъюгированную форму — N-малонил-АЦК. Любопытно, что папоротники, хвощи и мхи, имея достаточное количество АЦК, не могут превращать ее в этилен и используют для синтеза этилена какой-то другой, пока неизвестный путь.

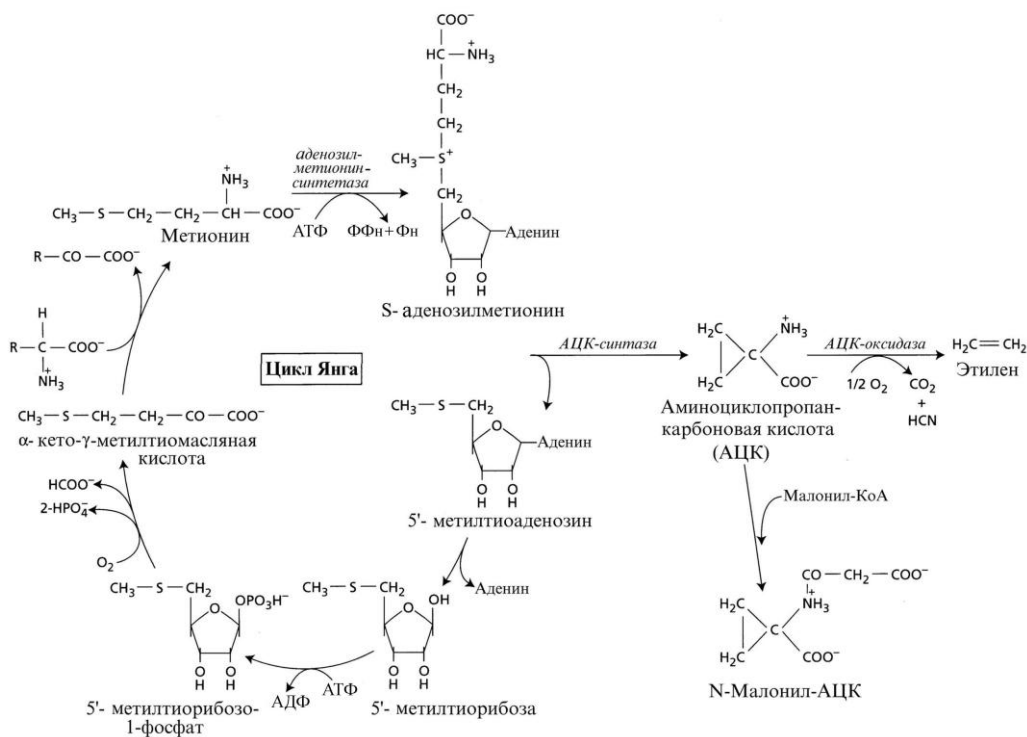


Рис. 8.29. Синтез этилена в растениях и метиониновый цикл (McKeon et al., 1995)

Поскольку метионин является единственным источником для синтеза этилена у покрытосеменных и голосеменных растений, должен существовать механизм постоянного пополнения запасов этой серосодержащей аминокислоты. Таким источником в клетках растений служит цикл Янга, в ходе которого $\text{CH}_3\text{-S}$ -группа, остающаяся от метионина после синтеза АЦК, вновь используется для его образования (см. рис. 8.29). Процесс синтеза этилена резко ускоряется в собранных плодах, при таких повреждающих воздействиях, как засуха, затопление, охлаждение и механическое повреждение, а также под воздействием ауксина. Поэтому необходимо иметь в виду, что некоторые ауксиновые эффекты могут быть опосредованы изменением содержания этилена.

С другой стороны, известно, что этилен способен угнетать процесс полярного транспорта ауксина и таким образом влиять на распределение ауксина в растениях. С угнетением полярного транспорта ИУК связаны такие эффекты этилена, как старение органов, опадение листьев, цветков и плодов.

8.6.2. Молекулярный механизм действия этилена

В настоящее время удалось расшифровать почти всю цепочку проведения этиленового сигнала в растительной клетке, а этиленовый рецептор является наиболее хорошо изученным рецептором в растениях. Несмотря на множественность эффектов, вызываемых в растениях этиленом, воздействие этого гормона на клетку осуществляется по одной схеме: связывание с рецептором, передача сигнала одним или несколькими сигнальными путями, ответная реакция.

Этилен-регулируемые гены. Одним из наиболее ранних эффектов этилена является активация экспрессии различных генов. В первую очередь начинают экспрессироваться гены, участвующие в биосинтезе этилена и регулирующие созревание плодов, повышается количество транскриптов генов, кодирующих такие ферменты как целлюлаза, хитиназа, β -1,3-глюканаза и пероксидаза, а также белки, участвующие в патогенезе при формировании реакции сверхчувствительности.

У многих генов, экспрессия которых активируется этиленом, в промоторной зоне выявлена консервативная нуклеотидная последовательность, содержащая два GCC-боксы, которую называют этилен-чувствительным элементом ERE (ethylene response element). Наличие ERE является необходимым и достаточным условием для транскрипционного контроля гена этиленом. У табака, например, обнаружено 4 белка, которые связываются с ERE. Эти белки называют ERF (ethylene response factor) или EREBPs (ethylene response elements binding proteins). Гены, кодирующие ERF, являются генами первичного ответа на этилен. Они кодируют транскрипционные факторы, регулирующие активность генов вторичного ответа, которые контролируют формирование физиологических реакций на этот гормон.

Рецепторы этилена. У арабидопсиса имеется пять рецепторов этилена, которые делят на два подсемейства. Подсемейство I обладает гистидинкиназной активностью, а подсемейство II — серин/треонинкиназной. Рецепторы ETR1 и ERS1

(ethylene receptor 1 и ethylene response sensor 1) относят к подсемейству I, а ETR2, ERS2 и EIN4 (ethylene-insensitive 4) — к подсемейству II (рис. 8.30). Семейство этиленовых рецепторов имеет перекрывающиеся функции. Повреждение одного или двух генов, кодирующих синтез рецепторов, вызывает незначительный эффект. Если же инактивируются три или четыре рецептора, дефекты в способности клеток отвечать на этилен становятся весьма заметными. Относительно большое число этиленовых рецепторов позволяет расширить диапазон эффективных концентраций этилена и поддерживать сигнал более длительное время, тем более что паттерн экспрессии генов, кодирующих различные рецепторы, на разных этапах онтогенеза растения различен. В отсутствие этилена его рецепторы подавляют процессы, контролируемые этим гормоном.

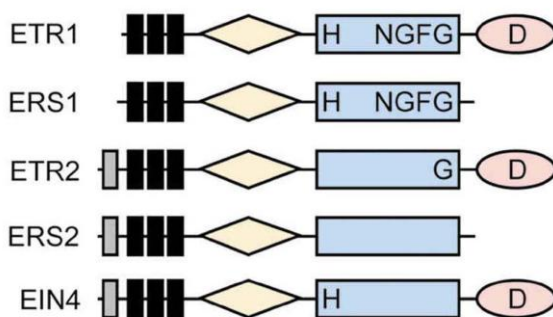


Рис. 8.30. Мембранные белки-рецепторы этилена (Schaller, Kieber, 2002).

Темные прямоугольники — трансмембранные домены; малые серые прямоугольники — сигнальные последовательности; ромбами показаны GAF-домены (cGMP-specific phosphodiesterases, adenylyl cyclases, FhlA); места фосфорилирования показаны, как H (остаток гистидина) и D (остаток аспарагиновой кислоты); NGFG — консервативная последовательность гистидинкиназы

Трансдукция этиленового сигнала. Непосредственное участие в ингибировании этилен-стимулируемых реакций принимает белок CTR1, являющийся одним из ключевых сигнальных элементов MAP-киназного модуля, который следует сразу после рецептора и выполняет функции MAPKKK. CTR1 представляет собой серин/треониновую протеинкиназу — фермент, относящийся к семейству Raf-киназ, участвующих в передаче гормональных сигналов у животных организмов. Субстратом фосфорилирования для CTR1-киназы является киназа MAP-киназы (MAPKK), которая в свою очередь фосфорилирует MAP-киназу (MAPK).

Возможный механизм функционирования MAP-киназного модуля в процессе передачи этиленового сигнала у растений *Medicago* и *Arabidopsis* показан на рис. 8.31. В отсутствие этилена его рецепторы проявляют функции гистидинкиназ и фосфорилируют белок CTR1-киназу. Фосфорилированная CTR1-киназа является репрессором MAPKK, что приводит к блокированию этиленового сигнала. В качестве примера на рис. 8.31 показана киназа из *Medicago* (SIMKK).

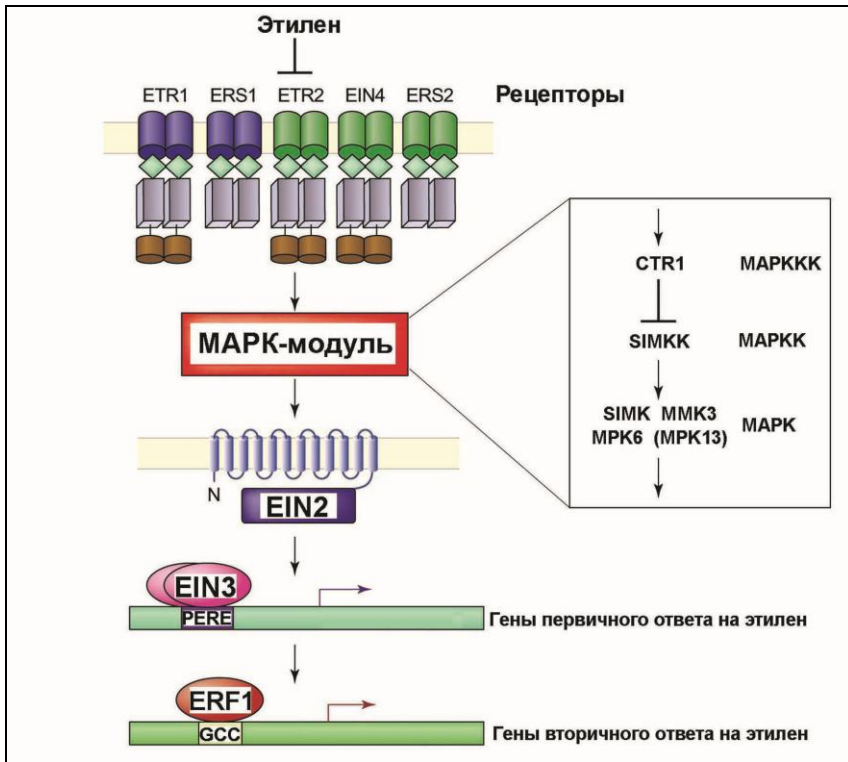


Рис. 8.31. Проведение этиленового сигнала (по Chang, 2003, с изменениями):

EIN2 — трансмембранный белок, участвующий в передаче этиленового сигнала;

EIN3 и ERF1 — этилен-зависимые факторы транскрипции; PERE — этилен-отвечающий элемент в промоторе генов первичного ответа на этилен; GCC-GCC — специфический бокс в промоторе генов вторичного ответа на этилен

Под воздействием внешних стимулов, таких как затопление, инфицирование патогенами или поранение, а также при созревании плодов, старении или повышении концентрации ауксина активируются ферменты синтеза этилена — АЦК-синтаза и АЦК-оксидаза. В результате всех этих процессов содержание этилена в тканях возрастает.

Этилен связывается с рецептором, локализованным в эндоплазматическом ретикулуме, с участием ионов меди в качестве кофактора. Предполагается, что при связывании с гормоном происходит инактивация рецептора. Отсутствие позитивного регуляторного сигнала от рецептора приводит начальный элемент в сигнальной цепи — CTR1-киназу в неактивное состояние. В результате SIMKK становится активной и в свою очередь активирует МАРК-киназы (например, SIMK и MMK3 из *Medicago* или их ортологи МРК6 и МРК13 из *Arabidopsis*).

На следующем этапе активируется белок EIN2 (ethylene-insensitive 2), который может работать как мембранная пора или канал. Предполагается, что EIN2 расположен после киназного каскада. Известно, что EIN2 имеет значительную гомологию с переносчиком двухвалентных катионов (Nramp) у животных организмов.

Последующим элементом сигнального пути служит ядерный белок EIN3. При активации этиленом фактор транскрипции EIN3 формирует димер, который способен связываться с "первичным этилен-отвечающим элементом" (PERE) в промоторной части генов первичного ответа, например, таких как *ERF1* (*ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1*). Ген *ERF1* кодирует этилен-специфичный фактор транскрипции ERF1, который связывается с GCC-боксом генов вторичного ответа и инициирует их транскрипцию.

8.6.3. Физиологическая роль этилена в растениях

Спектр физиологических процессов, контролируемых в растении этиленом, очень широк и включает созревание плодов, старение тканей, опадение плодов и листьев, подавление роста клеток растяжением, развитие цветков, эпинастию, образование корневых волосков и ускорение прорастания семян (рис. 8.32). Этилен участвует в ответных реакциях растительных организмов на различные стрессовые воздействия — резкие колебания температуры, анаэробноз, засуха, механические повреждения, повреждения патогенами. Обычно этилен рассматривают как ингибитор роста, однако имеются факты, указывающие на то, что этот фитогормон может стимулировать ростовые процессы. Оказываемый этиленом эффект зависит от его концентрации и от растительного объекта.

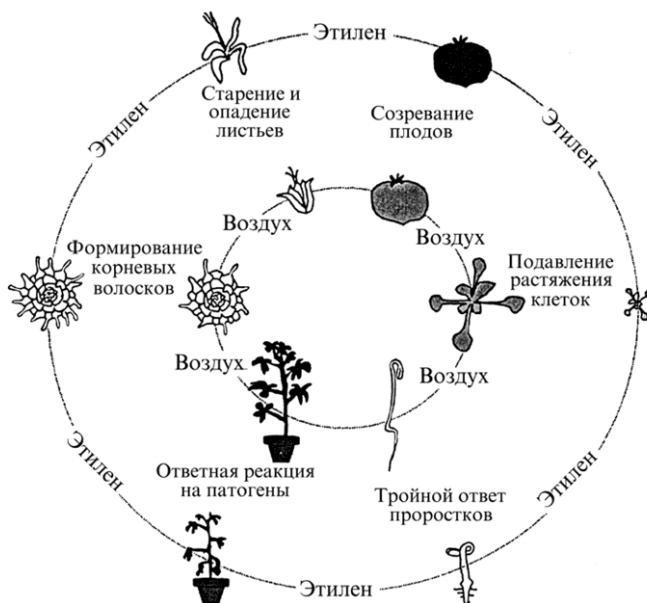


Рис. 8.32. Процессы, контролируемые этиленом в растениях (Johnson, Ecker, 1998)

"Тройной ответ". Наиболее хорошо изученной физиологической реакцией растений на этилен является "тройной ответ", т. е. замедление роста стебля в длину, его утолщение и горизонтальный рост (см. рис. 8.28). Такой тип ответных реакций

показан для всех двудольных растений, а также для колеоптилей и мезокотилей злаков. Замедление удлинения стебля под действием этилена происходит из-за его утолщения, вызванного изодиаметрическим ростом клеток. При этом число клеток и их конечный объем не отличаются у растений, обработанных и не обработанных этиленом.

Формирование гипокотильного крючка. Важную роль этилен играет в процессе прорастания семян двудольных растений. Верхняя часть формирующегося побега этиолированных проростков двудольных растений имеет форму крючка из-за того, что растяжение клеток в его верхней части идет интенсивнее, чем в нижней. Такая форма облегчает продвижение проростка через почву и защищает от повреждения его нежную апикальную меристему. Процесс формирования крючка и поддержания его за счет асимметричного роста контролируется этиленом. Интенсивность синтеза этилена максимальна в зоне изгиба и возрастает при механическом раздражении крючка в процессе его продвижения и трения о почвенные частицы. Как только этиолированный проросток выходит из почвы на свет, содержание этилена снижается и крючок распрямляется. Процесс формирования крючка является следствием различий в скоростях деления и растяжения клеток гипокотыля.

Прорастание семян. У многих видов растений в семенах перед прорастанием резко возрастает содержание этилена. Установлено, что экзогенная обработка этиленом способствует прекращению покоя, ускоряет прорастание семян злаков и развитие почек у древесных растений, активизирует рост клубней и луковиц. У многих видов растений обработка этилен-продуцентами, например этефоном, стимулирует прорастание семян, находящихся в состоянии физиологического или вынужденного покоя. При этом этилен может проявлять стимулирующий эффект сам по себе, аддитивно или синергически с другими факторами, активизирующими прорастание семян.

Эпинастия. Еще одной функцией этилена является индукция эпинастии, т. е. опускания листьев в результате того, что скорость роста клеток на верхней стороне черешка выше, чем на нижней. Эпинастия может также индуцироваться высокими концентрациями ИУК, однако этот эффект объясняется активацией синтеза этилена под действием ауксина. Эпинастические движения листьев наблюдаются также при затоплении. Механизм этого процесса заключается в следующем: в корневой системе при анаэробных условиях активируется синтез АЦК, которая с ксилемным потоком поступает в надземную часть растения, где уже в аэробных условиях быстро превращается в этилен, индуцирующий эпинастию. Однако не все растения способны совершать эпинастические движения в ответ на обработку этиленом.

Ускорение созревания. В обиходе термин "созревшие плоды" предполагает их готовность к употреблению в пищу. Для растения же созревание означает готовность семян и плодов к распространению. В ходе созревания плодов происходит расщепление элементов клеточных стенок, гидролиз крахмала, исчезновение органических кислот и фенольных соединений (включая танины) и накопление сахаров. Этилен ускоряет эти процессы, и поэтому его часто называют *гормоном созревания*.

Усиление дыхания. Одной из характерных особенностей некоторых фруктов, быстрее созревающих при обработке этиленом, является усиление дыхания перед со-

зреванием, называемое *климактерическим*. У таких плодов за усилением дыхания следует резкая активация синтеза этилена. Этот процесс идет в автокаталитическом режиме, поскольку установлено, что обработка плодов этиленом активирует его синтез и вызывает еще большее повышение содержания этого гормона в тканях при созревании. Примерами климактерических плодов являются яблоки, груши, сливы, бананы, авокадо, манго, персики, томаты. Если же в процессе созревания интенсивность дыхания в тканях не изменяется, такие плоды называются неклимактерическими. К ним относятся цитрусовые, виноград, вишня, ананас, клубника и некоторые другие.

Ускорение старения. Еще одним специфически ускоряемым этиленом процессом является *старение листьев*. Другой тип фитогормонов — цитокинины — тормозят этот процесс, поэтому старение листьев зависит от соотношения концентраций этилена и цитокининов. У этиленовых мутантов *etr1* и *ein*, которые не реагируют на обработку этим гормоном, задерживаются процессы распада хлорофилла и других компонентов хлоропластов, а общая продолжительность жизни возрастает на 30%. Предполагается, что механизм действия этилена связан не с индукцией программы старения, а, вероятнее всего, с повышением скорости процессов старения растительного организма. Необходимо отметить, что кроме этилена и цитокининов в регуляции старения листа принимают участие АБК и ИУК. Помимо листьев этилен также ускоряет старение цветков и плодолистиков. Если же цветки обработать ингибиторами синтеза или действия этилена, их цветение будет происходить более длительное время.

На практике для ускорения цветения, например ананаса *Ananas comosus* и манго *Mangifera indica*, применяют обработку этиленом. В результате через 6—12 ч индуцируется почти 100%-е зацветание растений. Обработка этиленом также способна влиять на пол цветков у однодомных растений, стимулируя, например у огурцов *Cucumis sativus*, образование большего числа женских цветков.

Опадение листьев. Этилен является основным регулятором опадения листьев — процесса активного отделения листа от ветви без повреждения ее живых тканей. Опадение листьев обусловлено образованием зоны отделения у основания черешка, вдоль которой лист отделяется от ветви. Отделительная зона может также формироваться перед опадением цветков и плодов. В зоне отделения образуются два слоя клеток: отделительный слой, по которому происходит разлом, и защитный слой, который предохраняет обнажающуюся при опадении листа поверхность от высыхания и внедрения патогенов.

Процесс опадения листьев определяется соотношением в тканях двух гормонов — этилена и ауксина и происходит следующим образом. На ранних этапах развития ауксин активно синтезируется и транспортируется из листовой пластинки через черешок в другие части растения, блокируя чувствительность отделительной зоны к этилену. При этом важна не столько концентрация ИУК, сколько ее градиент вдоль листа, поскольку чувствительность клеток черешка к этилену определяется, главным образом, параметрами аксиального транспорта ауксина. По мере старения листа содержание этилена возрастает, а интенсивность транспорта и градиент кон-

центрации ИУК снижаются, что повышает чувствительность клеток-мишеней зоны отделения к этилену. На этом этапе начинают экспрессироваться гены, кодирующие ферменты, расщепляющие полисахариды и белки клеточной стенки. В клетках отделительного слоя синтезируются гидролитические ферменты целлюлаза и пектиназа, которые в везикулах аппарата Гольджи секретируются в апопласт и разрушают клеточную стенку. Клетки отделительного слоя разделяются, под тяжестью листа сосуды разрываются, и лист отделяется от дерева. Следует отметить, что в высоких концентрациях ауксин также может стимулировать опадение листьев, поскольку при этом сильно активируется синтез этилена.

Формирование аэренхимы. В стеблях и корнях водных растений, а также растений, приспособленных к условиям затопления, за счет ткани, которая называется *аэренхимой*, формируется система межклеточных воздушных полостей, пронизывающая практически все растение и обеспечивающая передвижение кислорода и других газов от устьиц до клеток корней. Благодаря такому строению стебли водных растений значительно легче, чем наземных. Такая же система воздушных полостей образуется (независимо от внешних воздействий) в растениях риса, что позволяет его корням функционировать в анаэробных условиях на глубине 50 см и более.

В корнях наземных растений в условиях дефицита кислорода также может формироваться аэренхима. Этот процесс контролируется фитогормоном этиленом и ионами Ca^{2+} . Этилен индуцирует изменения концентрации ионизированного кальция в цитоплазме клеток-мишеней, что запускает механизм программируемой гибели клеток коры корня и образование системы воздушных межклеточных полостей. При этом не происходит разрушения клеток центрального цилиндра и эпидермы.

Защита растений от патогенов. Этилен способен включать ряд элементов в системе защиты растений от патогенов: синтез ферментов, разрушающих клеточную стенку грибов (хитиназ и β -(1-3)-глюканаз), и фитоалексинов. Этилену также принадлежит важная роль в формировании системного приобретенного иммунитета растений (см. главу 14).

8.7. Брассиностероиды

У растений вещество стероидной природы, обладающее ростостимулирующим эффектом, в чистом виде впервые было получено в 1979 г. из липидной фракции пыльцы рапса М. Гроувом (M. D. Grove) с коллегами. Этот стероидный фитогормон получил название *брассинолида* (рис. 8.33). Брассинолид — самый активный и широко распространенный брассиностероид. В значительных количествах также встречается *кастастерон*, активность которого в стандартных биотестах составляет около 20% активности брассинолида. Брассинолид имеет структурное сходство с такими стероидными гормонами животных, как тестостерон и экдизон.

В растительных организмах выявлено много схожих с брассинолидом веществ, называемых *брассиностероидами* (БС), которые синтезируются главным образом

из кампестерола. Эти фитогормоны в концентрации 10^{-9} — 10^{-6} моль/л нужны для роста побегов и пыльцевой трубки, для ксилогенеза, репродуктивного развития и многих других процессов. В настоящее время известно более 60 БС. Больше всего БС содержится в пыльце и незрелых семенах. В молодых растущих тканях их больше, чем в старых. БС выделены не только из покрыто- и голосеменных растений, но также из папоротников, мхов и зеленых водорослей.

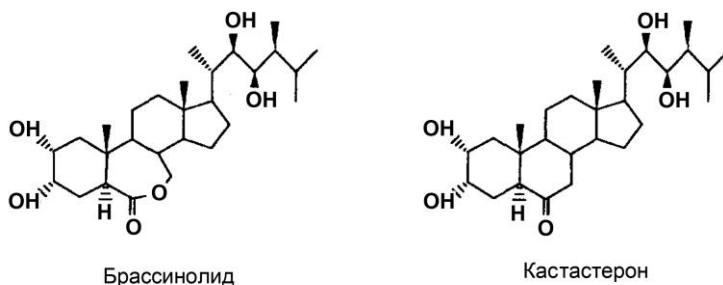


Рис. 8.33. Физиологически активные брассиностероиды

8.7.1. Механизм действия брассиностероидов

Выявлены два типа брассиностероидных мутантов. К первому типу относятся мутанты, у которых нарушен синтез брассиностероидов. К ним относятся, например, два мутанта арабидопсиса: *det2* (*de-etiolated*) и *cpd* (*constitutive photomorphogenesis dwarfism*). У этих мутантов в условиях темноты не проявляется явление этиоляции — растения имеют развернутые семядоли, не вытянутый, а короткий побег и дифференцированные хлоропласты (синтез хлорофилла, как известно, без света невозможен). Обработка таких мутантов экзогенными БС восстанавливает нормальный (этиолированный) фенотип растения. Эти мутации затрагивают гены *DET2* и *CPD*, кодирующие ферменты синтеза брассиностероидов.

Второй тип брассиностероидных мутантов связан с нарушением процессов рецепции или передачи гормонального сигнала, поэтому обработка экзогенным гормоном не оказывает на них влияния. Вначале было получено два таких БС-нечувствительных мутанта: *bri1* (*brassinosteroid insensitive*) и *bin2* (*brassinosteroid insensitive*), с использованием которых удалось идентифицировать белок-рецептор брассиностероидов — BRI1 (см. приложение 2. Рецептор брассиностероидов BRI1) и белок BIN2 — негативный регулятор процессов, регулируемых брассиностероидами.

Позднее выяснилось, что рецепторный комплекс для брассиностероидов состоит не из одной, а из двух киназ: BRI1 и ассоциированной с ней ВАК1-киназы (BRI1-associated receptor kinase 1) (рис. 8.34). Одним из главных элементов трансдукции БС-сигнала является белок BIN2, который следует после рецепторного комплекса. Ген *BIN2* кодирует цитоплазматическую протеинкиназу, гомологичную SHAGGY-киназе дрозофилы и GSK-3 (glycogen synthase kinase-3) млекопитающих.

лены специфические нуклеотидные последовательности — так называемые БС-отвечающие элементы (BRRE — BR-response elements).

Рассмотрим возможный механизм рецепции и трансдукции БС-сигнала (см. рис. 8.35). Ключевым событием, запускаемым БС, является фосфорилирование серин/треонинового остатка в каталитическом домене рецептора BRI1, которое происходит после гетеродимеризации двух рецепторных киназ (BRI1-BAK1). Связывание брассинолида приводит к образованию димера BRI1-BAK1 и последующей активации этих рецепторных киназ посредством трансфосфорилирования. Дальнейшая передача БС-сигнала из цитозоля в ядро осуществляется белками BES1 и BZR1.

В отсутствие брассиностероидов белки BZR1 и BES1 фосфорилируются киназой BIN2, что делает их мишенями для деградации в убиквитин-зависимом 26S протеасомном пути (см. рис. 8.35, а). При связывании брассиностероидов с рецептором происходит фосфорилирование белков BRI1 и BAK1. Это приводит к подавлению негативного регулятора BIN2 (см. рис. 8.35, б).

Освободившись от репрессии, белки BES1 и BZR1 перемещаются в ядро, где дефосфорилируются серин/треониновой фосфатазой BSU1 (*bri1 suppressor1*) и приобретают способность связываться с ДНК и функционировать как активатор и репрессор (соответственно) БС-зависимых генов (см. рис. 8.35, в).

Выявлены десятки генов, чувствительных к БС, которые контролируют биосинтез элементов клеточной стенки и цитоскелета, синтез гормонов и их сигналинг (в особенности ауксина). Мишенью для БС может являться также вакуолярная H^+ -АТФаза. После рецепции и передачи БС-сигнала происходит удаление рецепторного комплекса из плазматической мембраны эндоцитозом, сопровождающееся его протеолизом (см. рис. 8.35, г).

8.7.2. Физиологическая роль брассиностероидов

Брассиностероиды (БС) необходимы для нормального роста, развития и плодоношения растений. Растения, у которых имеются нарушения в синтезе БС или в системе рецепции и трансдукции БС-сигнала, обычно выглядят как темно-зеленые карлики с эпинастическими листьями. При этом наблюдаются нарушения нормального развития растений, снижение или полное отсутствие фертильности.

Влияние на рост растений. Одной из особенностей БС, отличающей их от других фитогормонов, является способность стимулировать ростовые процессы в очень низких концентрациях (10^{-6} — 10^{-12} моль/л). Наиболее специфичный для БС эффект заключается в активации роста второго междоузлия фасоли или гороха. Ни ауксины, ни цитокинины не вызывают такого эффекта, а гиббереллины активируют удлинение междоузлий фасоли только в очень высокой концентрации. Еще более чувствительным традиционным биотестом на БС является рост эпикотилей маша. На этом объекте стимулирующий эффект БС проявляется в концентрации 10^{-10} моль/л и ниже. В дальнейшем оказалось, что стимулирующее действие БС

на ростовые процессы связано с активацией не только растяжения, но и деления клеток. Действие БС на рост клеток растяжением может быть связано с изменением свойств клеточных стенок. Показано, что обработка БС активирует экспрессию ряда генов, которые кодируют ферменты, участвующие в биосинтезе и модификации полимеров клеточной стенки.

Брассиностероиды участвуют в регуляции ростовых процессов во взаимодействии с другими фитогормонами. Выявлено, что БС и гиббереллины оказывают аддитивное действие на рост гипокотилей огурца, особенно чувствительных к брассинолиду. Выявлен сильный синергический эффект ИУК и брассинолида, который проявляется только в том случае, когда растения предварительно обрабатываются БС, а затем ИУК. Если же обработка растений шла в иной последовательности, синергизма не наблюдалось. Ингибитор транспорта ауксина ТИБК устраняла этот синергический эффект. Совместная обработка гипокотилей арабидопсиса брассинолидом и гибберелловой кислотой (или брассинолидом и ауксином) вызывала синергичный ростостимулирующий эффект.

Регуляция процессов развития. На двух модельных объектах — эксплантах *Helianthus tuberosum* и изолированных клетках мезофилла *Zinnia elegans*, которые наиболее часто используются для изучения процессов ксилемогенеза, удалось выявить, что БС (в наномолярных концентрациях) обладают способностью активировать процесс дифференцировки трахеальных элементов.

Получены доказательства, что БС, как и гиббереллины, обладают способностью регулировать выход семян из физиологического покоя, контролируемый АБК. Было обнаружено, что обработка БС устраняет торможение прорастания, наблюдаемое у мутантов с нарушением синтеза гиббереллинов или чувствительности к ним.

И, наконец, следует отметить, что не только этилен, но и БС, по-видимому, ускоряют процессы старения. Замечено, что если обычные растения арабидопсиса дикого типа начинают стареть в среднем через 60 суток от начала прорастания, то БС мутанты остаются зелеными и формируют новые цветки даже через 100 суток от начала развития.

Роль БС в процессах фотоморфогенеза. Программа фотоморфогенеза включается сразу после выхода проростка из почвы на свет. Освещение инициирует экспрессию светорегулируемых генов, активность которых в темноте подавляется белками, являющимися ингибиторами процессов фотоморфогенеза. Известно более 10 генов, кодирующих такие ингибиторы. Имеются убедительные доказательства того, что экспрессия этих генов находится под контролем брассиностероидов. Так, мутанты арабидопсиса по синтезу брассиностероидов *det2* и *cpd* не проявляют явление этиоляции в условиях темноты (см. главу 10).

Интересные результаты в этом плане были получены в 2000—2001 гг. Н. Нагата (N. Nagata) с коллегами при использовании ингибитора синтеза БС — брассиназола. После обработки брассиназолом этиолированные проростки арабидопсиса приобретали вид растений, растущих на свету: формировали широкие семядоли, короткий гипокотиль, истинные листья. В семядолях таких проростков начиналось

формирование пластид и повышался уровень РУБИСКО. Поэтому можно полагать, что БС выполняют функцию репрессора светозависимых генов морфогенеза.

Роль БС в адаптации к стрессовым воздействиям. Установлено, что БС в низких концентрациях оказывают влияние не только на процессы роста и развития растений, но повышают также их устойчивость к таким стрессовым воздействиям как резкие колебания температуры, засуха, засоление, аноксия и воздействие патогенных грибов и бактерий. Поэтому брассиностероиды рассматриваются как одна из наиболее перспективных групп фитогормонов для растениеводства, поскольку их можно применять в ничтожных количествах как для регулирования процессов роста и развития, так и для защиты растений (В. А. Хрипач и др., 2000).

Подводя итог, хотелось бы обратить внимание на парадоксальную ситуацию, которая в настоящее время складывается при изучении БС. Исследования, посвященные расшифровке молекулярного механизма рецепции и трансдукции гормона, значительно опережают работы, связанные с выяснением роли БС в клетках, тканях и органах растения. То есть мы уже значительно продвинулись в выяснении строения рецепторов БС, механизма передачи сигнала по клетке, генов, которые контролируются БС, однако мы пока еще очень мало знаем о конкретных функциях этой группы фитогормонов в растениях.

8.8. Жасмонаты

Жасмонаты входят в большую группу соединений, называемых *оксипипинами*, которые являются оксигенированными жирными кислотами, содержащими один или несколько атомов кислорода (помимо тех, которые имеются в карбоксильной группе). Наиболее хорошо известными жасмонатами являются *жасмоновая кислота* (ЖК), *метиловый эфир жасмоновой кислоты* (МеЖК), *жасмонил-изолейцин*, а также предшественник МеЖК — 12-оксо-фитодиеновая кислота (ОФДК) и ее 16-углеродный гомолог динор-ОФДК (рис. 8.36).

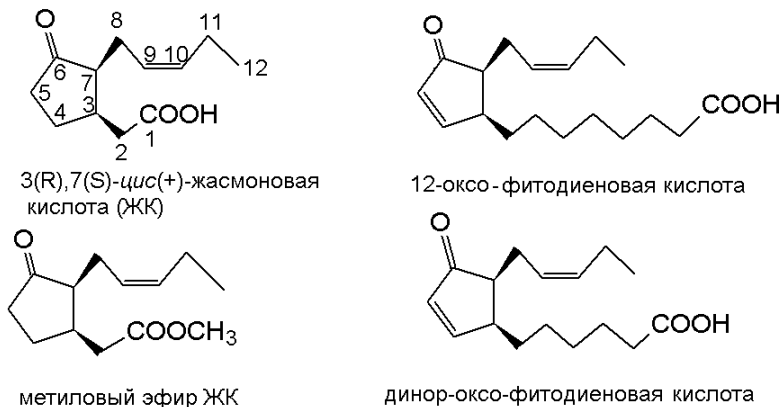


Рис. 8.36. Жасмонаты растений

Впервые *метилловый эфир жасмоновой кислоты* был выделен Демоле (E. Demole) с коллегами (1962) из эфирного масла *Jasminum grandiflorum* как основной липидный компонент аромата жасмина. Свободная жасмоновая кислота впервые была найдена Альдриджем с коллегами (D. C. Aldridge et al., 1971) в культуральной жидкости гриба *Botryodiplodia theobromae*.

Жасмоновая кислота контролирует устойчивость растений к патогенам и насекомым-фитофагам, к осмотическому стрессу и засухе, к повреждению ультрафиолетом и озоном, к поранению и элиситорам. Классический эффект жасмонатов состоит в индукции в условиях биотического стресса экспрессии генов, кодирующих ингибиторы протеиназ и ферменты биосинтеза вторичных соединений (алкалоидов, фитоалексинов). Жасмонаты индуцируют старение и подавляют прорастание семян, контролируют развитие пыльцы и растрескивание пыльников, участвуют в регуляции формирования клубней и луковиц, роста корня и созревания плодов. Содержание ЖСК в тканях растений резко возрастает при механических воздействиях.

Синтезируют жасмонаты все растения, включая водоросли. Эти соединения обнаружены также у грибов. Синтезируются жасмонаты в разных тканях растений в результате перекисного окисления C_{18} - и C_{16} -ненасыщенных жирных кислот. Процесс начинается в хлоропластах и заканчивается в пероксисомах.

Концентрация жасмонатов в тканях растений обычно составляет 10—100 нг/г сырой массы, но в условиях стресса она может возрасть до 3 мкг/г сырой массы. Молодые, развивающиеся части растений содержат больше жасмонатов, чем закончившие рост.

8.8.1. Механизм действия жасмоновой кислоты

К жасмонатам, для которых получены наиболее веские доказательства их биологической активности, относятся (Acosta, Farmer, 2010):

- (+)-7-изо-жасмонил-L-изолейцин — играет важную роль в жасмонатной сигнализации в листьях (возможно, и цветках) арабидопсиса;
- жасмонил-L-триптофан — ингибитор передачи ауксинового сигнала в корнях арабидопсиса;
- ОФДК и динор-ОФДК обладают сигнальными функциями, не зависящими от канонического жасмонатного сигналинга, или используют его частично.

Для расшифровки жасмонатного сигнала очень полезным оказался мутант *coi1*, устойчивый к бактериальному токсину коронатину и метилжасмонату (коронатин является структурным аналогом и имитирует действие ЖК). Оказалось, что белок COI1 (coronatine insensitive1) необходим практически для всех процессов, контролируемых ЖСК. В мутантах *coi1* жасмонат-индуцируемые гены не экспрессируются. В дальнейшем было показано, что белок COI1 представляет собой субъединицу F-бокса убиквитин-лигазного комплекса типа SKP1-CUL1-F-box (SCF) и является рецептором жасмоната (см. приложение 2. *Рецептор жасмоновой кислоты*). Механизм рецепции и трансдукции жасмонатного сигнала приведен на рис. 8.37.

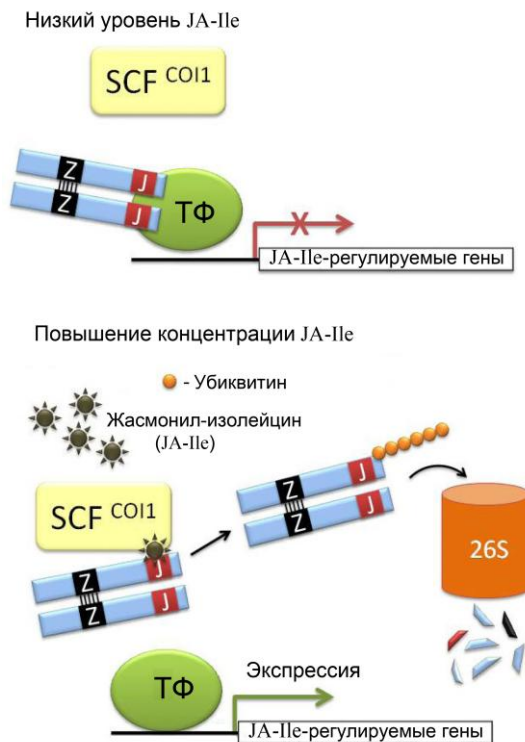


Рис. 8.37. Модель рецепции и передачи жасмонатного сигнала с участием белков COI1–JAZ у арабидопсиса (по Acosta, Farmer, 2010, с изменениями). Объяснения в тексте. JA-Ilc — жасмонил-L-изолейцин; SCF^{COI1} — комплекс, который функционирует, как E3-тип убиквитин-лигаз; COI — рецептор жасмоната, белок F-бокса убиквитин-лигазного комплекса; 26S — протеасома; Z (ZIM) и J (Jas) — домены JAZ-белка, отвечающие за белок-белковые взаимодействия; ТФ — транскрипционные факторы жасмонат-зависимых генов

Когда уровень жасмоната низкий, ингибиторы передачи жасмонатного сигнала — JAZ-белки (jasmonate Zim-domain) — связываются с жасмонат-зависимыми факторами транскрипции (такими, например, как MYC2 (v-мус myelocytomatosis viral oncogene homolog)) и блокируют их работу. При повышении концентрации жасмоновой кислоты происходит превращение ее в активную форму гормона — [(+)-7-изо-жасмонат-изолейцин], который рецептируется белком COI1, являющимся субъединицей F-бокса E3 убиквитин-лигазы, относящейся к типу SKP1-CUL1-F-box (SCF). Взаимодействие гормона с COI1 способствует связыванию гормон-рецепторного комплекса с ингибиторными JAZ-белками через их Jas-домен. В этой модели JAZ-белки можно рассматривать, как корецепторы, взаимодействующие с COI1. Формирование комплекса гормон–COI1–JAZ способствует убиквитинированию JAZ-белков и их последующей деградации в 26S протеасомах (рис. 8.37). После этого происходит высвобождение транскрипционных факторов от JAZ-репрессии и активация транскрипции жасмонат-зависимых генов.

8.8.2. Физиологическая роль жасмонатов

Участие в ответных реакциях при повреждении растений патогенами и насекомыми. Поврежденные патогенами ткани отличаются очень высокой концентрацией этого фитогормона, что резко повышает устойчивость растений к вредителям. Повышение содержания жасмоната активизирует экспрессию целого каскада генов, которые кодируют:

- белки, формирующие механические барьеры в клеточной стенке на пути инфекции;
- ферменты, участвующие в синтезе фитоалексинов;
- ингибиторы протеаз, обеспечивающие защиту растений от повреждения насекомыми;
- белки, обладающие фунгицидной активностью — тионин, осмотин.

Поэтому обработка растений жасмоновой кислотой резко повышает их устойчивость к повреждениям патогенами и фитофагами.

Одним из самых эффективных способов защиты растительных организмов от повреждения является реакция сверхчувствительности (СВЧ), т. е. быстрая локальная гибель инфицированных растительных клеток вместе с патогеном, что в конечном счете обеспечивает устойчивость всего растения (*подробнее см. в главе 14*).

Для защиты от фитофагов растения располагают широким набором веществ вторичного происхождения, которые делают их для насекомых несъедобными. Важным компонентом защитных реакций растений являются также ингибиторы ферментов, участвующих в процессах переваривания пищи насекомыми (*подробнее см. в главе 14*).

Участие в процессах морфогенеза. Установлено, что ЖсК и ее метиловый эфир могут регулировать и деление клеток, и направление их растяжения, определяя таким образом форму будущих органов и тканей растительного организма. Показано, что жасмонаты участвуют в регуляции таких процессов морфогенеза, как созревание плодов и рост корня, тигмоморфогенез усиков и производство жизнеспособной пыльцы, формирование и функционирование арбускулярной микоризы, эмбриогенез, клубнеобразование и формирование луковиц.

Установлено, что ЖсК и ее метиловый эфир индуцируют образование клубней у картофеля *Solanum tuberosum*, ямса *Dioscorea bulbifera*, артишока *Helianthus tuberosum* и батата *Ipomea batatas*. Следует отметить, что процесс клубнеобразования регулируется несколькими фитогормонами и контролируется фотопериодом. Короткодневный фотопериод стимулирует этот процесс, в то время как на "длинном дне" клубнеобразование подавляется. Предпосылкой для формирования клубней является падение уровня гиббереллинов. Жасмонаты тормозят удлинение столонов и индуцируют утолщение их субапикальной области. Цитокинины, накапливающиеся в утолщенной части, стимулируют этот процесс за счет активации деления клеток. АБК, уровень которой постепенно возрастает в формирующихся клубнях, контролирует в дальнейшем их покой. ЖсК и ее метиловый эфир стимулируют процесс клубнеобразования за счет активации растяжения клеток формирующихся клубней.

Жасмонаты играют важную роль в регуляции симбиотических взаимоотношений между растением-хозяином и клубеньковыми бактериями. Установлено, что ЖСК подавляет формирование клубеньков на корнях бобовых растений. Этот угнетающий эффект объясняется в первую очередь способностью ЖСК нарушать симбиотические взаимоотношения между ризобиями и растением-хозяином.

8.9. Салициловая кислота

Салициловая кислота (СК) относится к фитогормонам, которые обеспечивают растению устойчивость к повреждению различными патогенами. Синтез СК играет ключевую роль в реакции сверхчувствительности, а также в пролонгированной системной устойчивости растений к широкому кругу инфекций. Еще одной очень специфической особенностью СК является ее способность активировать цианид-устойчивое дыхание растений, приводящее к выделению тепла. СК в микромолярных концентрациях обнаружена в листьях, корнях, цветках и плодах многих растений.

8.9.1. Биосинтез салициловой кислоты

Синтез салициловой кислоты (СК) в растениях начинается с превращения фенилаланина в *транс*-коричную кислоту. Этот процесс катализирует один из основных ферментов фенольного обмена *фенилаланинаммонийлиаза*. Далее коричная кислота превращается или в бензойную, или в орто-кумаровую кислоты, из которых образуется салициловая кислота (рис. 8.38).

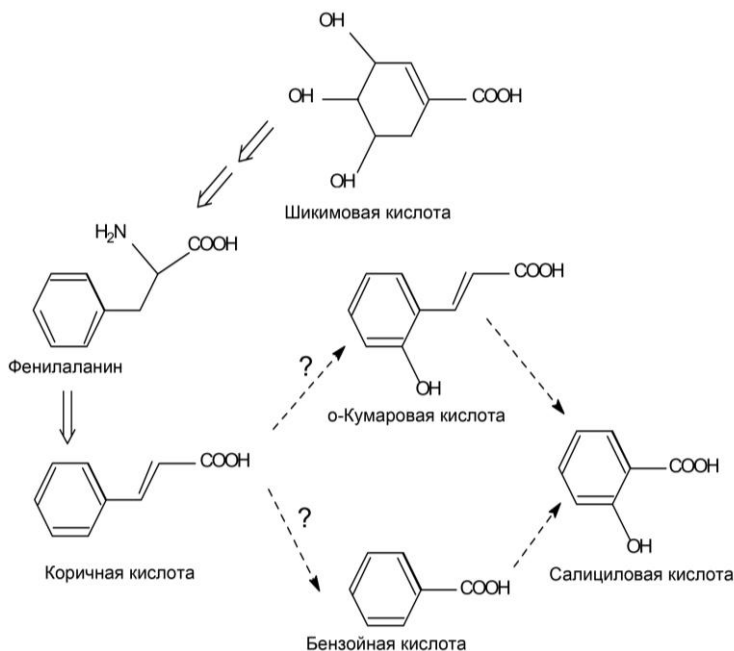


Рис. 8.38. Предполагаемые пути биосинтеза салициловой кислоты (по Nayat et al., 2007)

В концентрациях выше 0,1 ммоль/л салицилат токсичен для растений, поэтому ускорение синтеза и накопление СК (например, при патогенезе) должно сопровождаться ее детоксикацией. Салициловая кислота может образовывать метиловый эфир и (или) связываться с глюкозой под действием глюкозилтрансферазы. Однако, если 2-O-β-глюкозилсалицилат — неактивное соединение, то метилсалицилат является мобильным летучим предшественником, который легко превращается в тканях-мишенях в СК. Салициловая кислота может образовывать и другие связанные формы, например глюкозный эфир СК или амидный конъюгат с аспарагиновой кислотой.

8.9.2. Механизм действия салициловой кислоты при патогенезе

Основным белком, с помощью которого осуществляется передача сигнала от салициловой кислоты, является NPR1 (non-expressor of PR1). Сверхэкспрессия гена *NPR1* (его также называют *NIM1* — *NON-INDUCIBLE IMMUNITY 1*) резко повышает устойчивость растений арабидопсиса и риса к патогенам. Белок NPR1 содержит анкирин-повторяющийся домен, который обеспечивает белок-белковые взаимодействия и дальнейшую трансдукцию салицилатного сигнала в геном. Обработка растительных клеток СК индуцирует перемещение NPR1 в ядро и активацию последующих событий, контролируемых СК.

Помимо NPR1 в салицилатном сигнальном пути также участвуют ДНК-связывающие белки bZIP-типа — TGA. Эти белки связываются со специфической нуклеотидной последовательностью — TGACG, которая имеется в промоторе салицилат-зависимых генов (в частности у SAR-генов). Однако для активации экспрессии *PR1*-генов недостаточно связывания только TGA-белков с этими салицилат-отвечающими промоторными элементами. Для инициации работы салицилат-зависимых генов необходимо, чтобы сформировался белок-белковый комплекс NPR1-TGA, который осуществляет уже непосредственную регуляцию функционирования PR-генов (рис. 8.39).

Белки NPR1 в цитоплазме неинфицированных клеток находятся в окисленном и неактивном состоянии. При воздействии патогена активируется синтез СК, что приводит к изменению редокс-статуса клетки и переходу белков NPR1 в восстановленное состояние (рис. 8.39). Будучи восстановленными, NPR1 приобретают способность передвигаться в ядро, взаимодействовать с факторами транскрипции TGA и, таким образом, запускать экспрессию PR-генов. Более подробные сведения о роли салициловой кислоты в защите растений от патогенов приведены в *главе 14*.

Следует отметить, что при повышении уровня салициловой кислоты в растительных тканях активная, т. е. восстановленная, форма белка NPR1 ингибирует передачу жасмонатного сигнала. Механизм действия жасмоновой кислоты заключается в том, что в отсутствие салицилата индуцируется протеолиз ингибитора жасмонатного сигнала (*см. разд. 8.8.1*). Салицилат-зависимый белок NPR1 подавляет этот протеолиз. В результате происходит накопление ингибитора жасмонатного сигнала

и подавление экспрессии генов, которые регулируются жасмоновой кислотой. Таким образом, повышение уровня СК в растительных тканях приводит к накоплению белка NPR1 и блокированию процессов, индуцируемых жасмоновой кислотой.

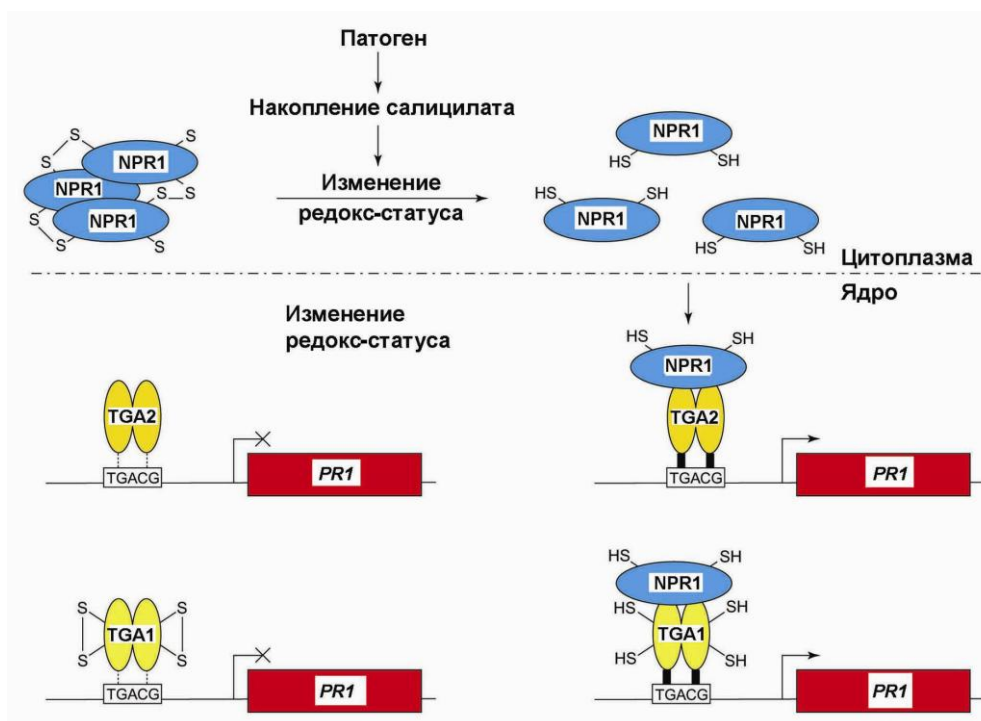


Рис. 8.39. Салицилатный сигнальный путь (по Pieterse, Van Loon, 2004): PR (pathogenesis related) — белки, принимающие участие в формировании устойчивости к патогенам; NPR1 — non-expressor of PR; TGA — ДНК-связывающий белок bZIP-типа; TGACG — специфическая нуклеотидная последовательность (бокс) для салицилат-зависимых генов; PR1 — гены, кодирующие PR-белки

8.9.3. Физиологическая активность салициловой кислоты в растениях

Наиболее важную роль салициловая кислота играет в системе защитных реакций при повреждении растений фитопатогенами (см. главу 14). И салициловая, и жасмоновая кислоты принимают участие в реализации и регуляции одного из главных механизмов устойчивости растений к патогенам — реакции сверхчувствительности (СВЧ), т. е. быстрой локальной гибели инфицированных растительных клеток вместе с патогеном. Следует отметить, что синтез салициловой кислоты и образование ее конъюгатов являются ключевыми элементами не только в СВЧ-реакции, но и в формировании системного приобретенного иммунитета растения.

Одним из специфических свойств СК является ее способность активировать альтернативное цианид-устойчивое дыхание растений, в результате которого происходит выделение энергии в виде тепла. Впервые способность СК повышать температуру растительных тканей была выявлена Раскиным с коллегами (Raskin et al., 1987) у *Arum lilies*.

Известно, что завершающий этап почти всех окислительных процессов заключается в переносе электронов от окисляемого субстрата на кислород. Этот процесс катализируется дыхательными ферментами, которые называют терминальными оксидазами. У растительных клеток к таким ферментам относятся не только цитохромоксидаза, но и *альтернативная оксидаза*, локализованная на внутренней мембране митохондрий (см. разд. 3.10). У многих цветков перед образованием пыльцы наблюдается быстрое повышение активности этого фермента. Это приводит к резкому возрастанию температуры тканей цветка, которая, например у *Sauromatum guttatum*, достигает 25 °С. Одновременно активируется синтез салициловой кислоты, а также определенных аминов и индольных соединений, которые служат аттрактантами для насекомых-опылителей.

8.10. Пептидные гормоны растений

В растениях выявлены десятки различных сигнальных молекул пептидной природы, и их число с каждым годом растет. При изучении пептидных гормонов растений исследователи часто обращают внимание на хорошо изученные пептидные гормоны животных. Пептидные гормоны животных синтезируются в виде высокомолекулярных предшественников, которые затем подвергаются процессингу. Пептидные фитогормоны также синтезируются в виде высокомолекулярных предшественников, а затем подвергаются процессинговому гидролизу. К наиболее хорошо изученным пептидным фитогормонам относятся системин, сигнальный пептид CLAVATA3 (CLV3), сигнальные пептиды ENOD40, цистеин-богатые пептиды S-локуса крестоцветных (SCR), факторы быстрого подщелачивания (RALF), фитосульфокины.

Системин состоит из 18 аминокислотных остатков и синтезируется в листьях пасленовых при их поедании гусеницами. Этот полипептид образуется из просистемина, состоящего из 179 аминокислотных остатков. При повышении уровня системина в растительных тканях инициируется синтез ингибиторов пищеварительных ферментов насекомых (*подробнее см. в главе 14*). Рецепция системина происходит с помощью локализованного в плазмалемме белка-рецептора массой 160 кДа, содержащего богатые лейцином повторы. В результате рецепции включается MAP-киназный каскад, который приводит к освобождению из мембран линоленовой кислоты и ее превращению в жасмоновую кислоту. Жасмоновая кислота вызывает экспрессию генов, кодирующих ингибиторы пищеварительных ферментов насекомых, в частности трипсина.

Сигнальный пептид CLAVATA3 (CLV3), состоящий из 78 аминокислотных остатков, регулирует соотношение между делением и дифференцировкой клеток

в апикальных меристемах побегов и флоральных меристемах (см. главу 9). Рецептором CLV3 являются белки CLV1 и CLV2 (рецепторно-киназный комплекс с молекулярной массой около 185 кДа) (рис. 8.40). Сигнальные пептиды CLV3 синтезируются в клетках верхних (наружных) слоев центральной зоны апикальной меристемы, а затем транспортируются в нижележащие слои центральной зоны, где взаимодействуют со своими рецепторами. После связывания CLV3 с рецептором происходит автофосфорилирование CLV1 и дальнейшая передача сигнала, приводящая к изменению экспрессии генов *WUSHEL*, отвечающих за регуляцию пролиферации клеток.

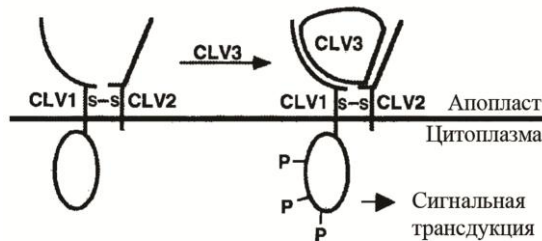


Рис. 8.40. Рецепция сигнального пептида CLAVATA 3 (по Ryan et al., 2002)

Сигнальные пептиды, кодируемые геном *ENOD40*, синтезируются при образовании клубеньков у бобовых. У неинфицированных ризобиями корней ген *ENOD40* экспрессируется только в клетках перикакла, соседствующих с лучами протоксилемы (рис. 8.41). Проникновение *Rhizobium* приводит к экспрессии *ENOD40* в области коры, включающей место проникновения инфекционной нити. Экспрессия *ENOD40* активирует деление клеток коры и формирование клубенька.

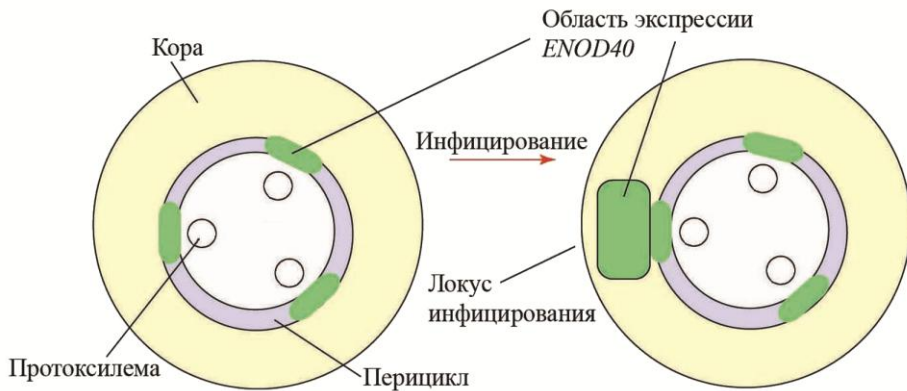


Рис. 8.41. Активация экспрессии *ENOD40* при инфицировании корней бобовых клубеньковыми бактериями (по Lindsey et al., 2002).

Области экспрессии *ENOD40* окрашены в более темный цвет

Один из кодируемых *ENOD40* пептидов имеет в своем составе 12—13 аминокислотных остатков, другой — 24—27. Предполагают, что эти пептиды стимулируют поступление в клетки корней сахарозы, которая способствует активации деления клеток коры корня и формированию клубенька.

Цистеин-богатые пептиды S-локуса SCR (*S*-locus cystein-rich) крестоцветных состоят из 47—60 аминокислотных остатков и содержат 8 консервативных остатков цистеина. Содержащиеся в пыльце цистеин-богатые пептиды SCR отвечают за "пыльцевую" самонесовместимость. Они синтезируются в пыльниках клетками тапетума и транспортируются в экзину пыльцевого зерна.

При попадании пыльцевого зерна на рыльце пестика происходит взаимодействие сигнального пептида SCR с рецепторной киназой SRK (*S*-locus receptor kinase), находящейся в плазматической мембране клеток сосочков пестика. Это приводит к включению каскада фосфорилирования белков, активации аквапоринов и обезвоживанию поверхности пестика. В итоге, происходит отторжение пыльцы, т. к. она не может набухнуть.

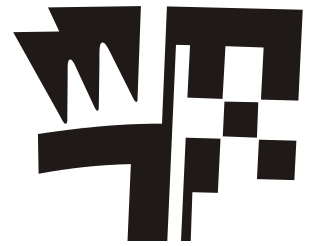
Фитосульфокнины в концентрации 10^{-9} — 10^{-8} моль/л значительно увеличивают скорость деления клеток в разбавленных суспензионных культурах. Из интактных растений фитосульфокнины до сих пор не выделены, однако высокий уровень экспрессии кодирующих их генов (например, в апикальных меристемах побегов и корней риса) позволяет предположить, что эти сигнальные пептиды синтезируются в растительных клетках и регулируют их деление в нативных условиях.

Известны два типа сульфокнинов: α -фитосульфокнин представляет собой пентапептид $\text{Tyr}(\text{SO}_3\text{H})\text{-Phe-Tyr}(\text{SO}_3\text{H})\text{-Thr-Gln}$ и β -фитосульфокнин, который является тетрапептидом $\text{Tyr}(\text{SO}_3\text{H})\text{-Phe-Tyr}(\text{SO}_3\text{H})\text{-Thr}$ (образуется из α -фитосульфокнина). Присоединение сульфита у фитосульфокнинов происходит по гидроксильной группе тирозина. Образуется α -фитосульфокнин из белковых предшественников.

Следует отметить, что функции фитосульфокнинов в растениях, по-видимому, не ограничиваются только их митогенной активностью. Установлено, что они стимулируют дифференцировку клеток мезофилла циннии в трахеальные элементы, а также соматический эмбриогенез в культуре клеток моркови.

Факторы быстрого подщелачивания RALF (rapid alkalization factor) вызывают быстрое и сильное подщелачивание среды в суспензионных культурах клеток. Функции RALF точно не установлены. Установлено, что RALF, выделенные из листьев томата, в микромолярной концентрации подавляют деление клеток корней томата и арабидопсиса. Поэтому предполагается, что эти пептиды необходимы для регуляции деления клеток.

У арабидопсиса выявлено 9 генов, кодирующих RALF. Эти сигнальные пептиды синтезируются в виде предшественников и имеют два расположенных рядом остатка аргинина, за которыми происходит процессинговый гидролиз. У табака предшественник RALF состоит из 115 аминокислотных остатков, а сам сигнальный пептид включает 49 аминокислотных остатков.



Глава 9

Физиология роста и развития растений

Все живые существа ведут свое происхождение от одной клетки, и на ранней стадии своего развития зародыш состоит действительно только из клетки.

М.-Я. Шлейден и Т. Шванн

Развитие любого организма включает такие процессы как рост и дифференцировка. Под термином "*рост*" следует понимать процесс необратимых количественных изменений, которые происходят во время развития организма. Термин "*развитие*" используют для обозначения и количественных, и качественных изменений в структуре и функциональной активности растения в ходе онтогенеза. О *дифференцировке* же говорят, если в ходе развития растительного организма возникают качественные различия у первоначально однородных структур. Дифференцировка может осуществляться на клеточном, тканевом и организменном уровне. В последнем случае речь идет о *морфогенезе*, т. е. процессе формообразования, который связан с закладкой, ростом и развитием специализированных органов растения.

Онтогенезом называют процесс индивидуального развития организма, сопровождающийся последовательной сменой его возрастных этапов (рис. 9.1). У растительных организмов выделяют четыре этапа онтогенеза: *эмбриональный* — от зиготы до созревания семени, *вегетативный* — от прорастания семени до начала образования репродуктивных органов, *генеративный* — закладка и формирование репродуктивных органов, образование плодов и семян и, наконец, *сенильный* — от момента потери способности к цветению до отмирания.

Этапность онтогенеза — это морфологическая и функциональная расчлененность онтогенеза, проявляющаяся в поэтапном (дискретном) изменении характера роста, дифференциации и функциональной активности организма. Однако отдельные этапы онтогенеза не изолированы друг от друга, а представляют собой последовательно переходящие друг в друга периоды развития, в основе которых лежат постепенные изменения организма и его отдельных частей в течение всей жизни растения.

Наиболее важные отличия растений от животных организмов касаются прежде всего особенностей их роста и развития. Можно выделить, по крайней мере, три принципиальных различия. Во-первых, растения, в отличие от большинства животных организмов, способны размножаться неполовым, вегетативным путем.

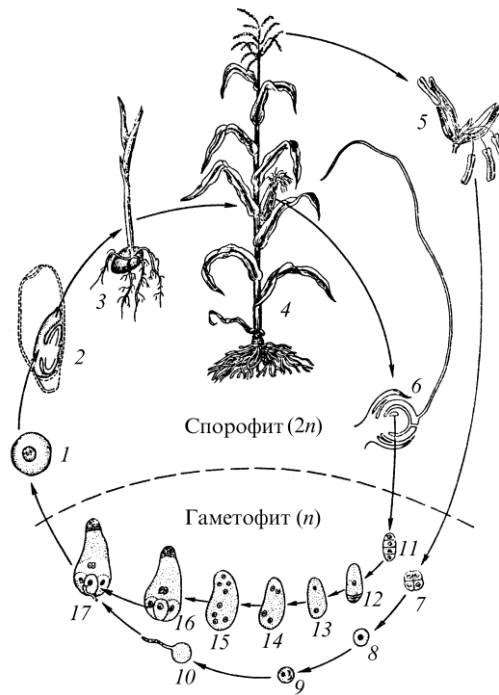


Рис. 9.1. Цикл развития покрытосемянного растения на примере кукурузы (*Zea mays*) (по Хржановскому, 1982). 1—6 — развитие спорофита ($2n$): 1 — зигота, 2 — зародыш, 3 — проросток, 4 — взрослое растение, 5 — тычиночный цветок, 6 — разрез семянки; 7—17 — развитие гаметофитов ($1n$): 7—8 — развитие микроспор, 9, 10 — развитие мужского гаметофита, 11, 12 — образование мегаспор, 13—16 — развитие женского гаметофита, 17 — начало полового процесса

Во-вторых, у растений очень высока способность к регенерации при повреждении за счет клеток меристематических тканей, а также путем дедифференцировки некоторых клеток в меристематические, образования каллусных тканей и формирования новых очагов деления и роста.

В-третьих, растения "в погоне" за питательными веществами вынуждены расти и формировать органы на протяжении всей жизни. У большинства животных органогенез охватывает сравнительно небольшой отрезок времени — они перестают расти, как только достигают половозрелости.

9.1. Основные элементы в механизме морфогенеза растения

У растительных организмов можно выделить несколько основных элементов, морфогенеза и определяющих его факторов:

- *геном*, который является основной матрицей — носителем информации о том, как растению пройти путь от семени до семени;

- эпигенетические факторы развития, к которым относятся ферменты, участвующие в модификации ДНК и хроматина;
- микро-РНК — эндогенные РНК, которые не кодируют белки, а играют ключевую роль в подавлении экспрессии генов путем расщепления их транскриптов или за счет блокирования трансляции мРНК;
- полярность клеток и тканей — основа для пространственной разметки активности морфогенетических факторов в растительном организме и, как следствие, дифференциальной активности генома;
- факторы внешней среды — температура, свет, вода и минеральные элементы определяют этапность онтогенеза и влияют на фенотипическое проявление конкретного генотипа растения;
- донорно-акцепторные отношения — для каждого этапа развития растительного организма характерны различные акцепторы, к которым от донорных участков передвигаются органические и минеральные соединения;
- позиционная информация, т. е. местоположение клетки в ткани или органе — определяет ее дифференцировку и будущую специализацию;
- фитогормоны — интегральные химические сигналы состояния окружающей клетку среды.

9.1.1. Гены и транскрипционные факторы — регуляторы развития растений

Центральной проблемой биологии развития является вопрос о том, каким образом многократное деление всего лишь одной клетки приводит к формированию организма, обладающего многоклеточными системами органов и тканей, не похожих друг на друга? Ответ на этот вопрос лежит в дифференциальной экспрессии генов в клетках, составляющих эти ткани и органы. Именно дифференциальная активность генома является основой и структурных, и функциональных различий между различными клетками одного и того же организма, т. е. клеточной дифференцировки. Именно геном является основным носителем информации о том, как растению пройти путь от семени до семени.

Гены, которые детерминируют процессы роста и дифференцировки, часто называют *генами-регуляторами* (переключателями) развития. Они кодируют белки — транскрипционные факторы, контролирующие программы формирования органов и тканей растения. Иногда эти гены также называют *гомеозисными*. Мутации в гомеозисных генах могут вызвать трансформацию одной части тела в другую. Гомеозисными мутантами называются те, у которых на месте нормального органа развивается орган другого типа. Например, у дрозофилы при мутации *antennapedia* формируется антенна вместо ноги. У растительных организмов также известны процессы, которые контролируются гомеозисными генами: филлотаксис, развитие цветков и соцветий. Наиболее хорошо у высших растений изучено функционирование двух типов генов-регуляторов развития: гомеобокс-содержащих и генов с MADS-боксом.

Гомеобокс-содержащие гены определяются по наличию характерной последовательности ДНК из приблизительно 180 пар нуклеотидов (гомеобокса), кодирующей гомеодомен — консервативный участок ряда транскрипционных факторов. Первым клонированным геном растений, кодирующим гомеодомен-содержащий белок, был *KNOTTED1* (*KN1*) кукурузы. Мутация *knotted 1* приводит к тому, что ген *KN1* начинает экспрессироваться в несоответствующее время и не в том месте. У мутантов *kn1* вокруг уже дифференцированных клеток листа появляются группы клеток, которые еще продолжают делиться. Группы делящихся клеток, расположенные вдоль сосудистых элементов по всей листовой пластинке, образуют так называемые узлы (*knots*).

Позднее было обнаружено целое семейство генов, подобных *KN1*, названное *KNOX* (*KNOTTED1-like HOMEODOMAIN*). Сверхэкспрессия генов семейства *KNOX* также искажает развитие листа. Эти гены подразделяются на два класса — *KNOXI* и *KNOXII*. Гены, относящиеся к классу *KNOXI* — *STM* (*SHOOT MERISTEMLESS*), *KNAT1*, *KNAT2*, *KNAT6* (*KNOTTED-like for Arabidopsis thaliana1*), экспрессируются преимущественно в меристемах, а экспрессия *KNOXII*-генов (*KNAT3*, *KNAT4*, *KNAT5*) выявлена в разных тканях.

Среди *KNOX*-генов растений наиболее детально исследована большая группа, участвующая в регуляции деятельности апикальной меристемы побегов и в развитии листьев: *KN1* и *RS1* (*ROUGH SHEATH1*) кукурузы; *KNAT1*, *KNAT2* и *STM* арабидопсиса; *HvKNOX3* (*Hordeum vulgare KNOX3*) ячменя и *OSH1* (*Oryza sativa HOMEODOMAIN1*) риса. Гены семейства *KNOX* отвечают за поддержание деления клеток меристем, репрессируя их дальнейшую дифференцировку. Эти гены и их аналоги экспрессируются в апикальных меристемах побегов и корней, а также во флоральных и латеральных меристемах.

Гены, содержащие MADS-боксы. Термин "*MADS-боксы*" образован начальными буквами четырех генов: *MCM1* дрожжей, *AG* арабидопсиса, *DEF* львиного зева и *SRF* млекопитающих. К генам, содержащим MADS-боксы, относятся, в частности, *AG* (*AGAMOUS*), *DEF* (*DEFICIENCE*), *AP1* (*APETALA1*) и *AP3* (*APETALA3*), *TFL1* (*TERMINAL FLOWER1*), *PI* (*PISTILLATA*). Гены этого типа регулируют флоригенез и определяют судьбу клеток в семяпочке; их экспрессия выявлена в зародыше, корнях и листьях. К MADS-боксы генам относится большинство гомеозисных генов растений, в частности гены идентичности органов цветка.

В настоящее время идентифицированы ключевые гены, которые контролируют процессы эмбриогенеза, старения и фотоморфогенеза, регулируют функционирование апикальных, латеральных и флоральных меристем, отвечают за формирование корня, листьев и сосудов. Наиболее хорошо изучена экспрессия генов, регулирующих развитие цветков. На основе имеющейся в настоящее время генетической информации, математического аппарата и компьютерных программ стало возможным построение так называемых генетических регуляторных сетей (*gene regulatory network*, GRN), которые позволяют эффективно оценивать взаимодействия между различными регуляторными генами в процессе дифференцировки клеток и формирования органов растения. Отдельные элементы этих сетей способны на разных

этапах развития контролировать несколько процессов. Поэтому мутации, затрагивающие разные участки одного регуляторного гена, могут отличаться своим фенотипическим проявлением.

Транскрипционные факторы. Непосредственный контроль за развитием органов и тканей растения осуществляется транскрипционными факторами (ТФ) — белками, которые после перемещения в ядро клетки регулируют транскрипцию, специфически взаимодействуя с ДНК либо с другими белками, которые могут образовывать комплекс "белок—ДНК". Именно ТФ отвечают за селективность и специфичность генной регуляции в различных клетках и тканях растительного организма. В процессе клеточной дифференцировки именно появление нового ТФ является сигналом для активации (или подавления) транскрипции генов на определенной стадии морфогенеза и появления необходимых генных продуктов. Трехмерные модели строения ряда ТФ и механизм их взаимодействия с ДНК приведены на сайте: <http://science.pozhvanov.com/mol/> (см. приложение 2).

В растениях выявлены практически все типы транскрипционных факторов, которые функционируют у животных и дрожжей. У арабидопсиса выявлено более 2000 белков-регуляторов транскрипции, которые обычно классифицируют по строению ДНК-связывающих доменов.

Гомеодомен-содержащие белки растений принимают участие в регуляции формирования листа, стебля и сосудов, развитии корня, программированной гибели клеток, процессе избегания тени. Наиболее хорошо изученными представителями этих белков являются семейства KNOX и WOX, которые участвуют в формировании и функционировании апикальных меристем.

Транскрипционные факторы KNOX относят к группе гомеодомен-содержащих факторов транскрипции TALE (Three amino acid loop extension). В отличие от типичного гомеодомена (homeodomain, HD), состоящего из 60 аминокислотных остатков, гомеодомены TALE содержат еще 3 аминокислоты.

Транскрипционные факторы семейства WOX (WUSHELL related homeobox) содержат нетипичный гомеодомен из 66 аминокислотных остатков. Наиболее хорошо охарактеризованными белками этого семейства являются WUS (WUSHELL) и WOX5, регулирующие пролиферацию клеток в апикальных меристемах, соответственно, побега и корня.

MADS-белки. Мишенями MADS-белков являются гены, в промоторной области которых имеется специфическая 10-нуклеотидная последовательность — CC(AT)6GG, называемая CArG-боксом. В составе всех MADS-белков имеется специфический, состоящий из 56 аминокислот, ДНК-связывающий домен, который обеспечивает распознавание этого бокса. Более чем у половины MADS-белков имеется К-домен (keratin-like), который обеспечивает белок-белковые взаимодействия и возможность для димеризации. MADS-белки контролируют процесс перехода к цветению (SOC1, FLC1, CAL), формирование органов цветка (AP1, AP3, PI, AG, SEP1, 2, 3), принимают участие в регуляции формирования плодов и семян, а также развития корня.

AP2/ERF (APETALA2/ethylene response factor) — семейство транскрипционных факторов, которые участвуют в регуляции развития цветков и семян, а также в передаче этиленового сигнала. ДНК-связывающий участок этих белков, называемый AP-доменом, содержит два повтора из 68 аминокислотных остатков. Именно AP-домен способен распознавать нуклеотидную последовательность GСС-бокс в промоторах генов, контролируемых AP2/ERF-белками.

МУВ-белки (myeloblastosis) относятся к самому многочисленному типу ТФ растений. Это семейство ТФ включает белки, контролирующие такие процессы, как развитие корня, паттернирование листа, формирование трихом, клеточный цикл, циркадные ритмы, передачу фитохромного сигнала. ДНК-связывающий домен МУВ-белков содержит от одного до трех повторов из приблизительно 50 аминокислот. Этот тип ТФ специфически взаимодействует с генами, содержащими (С/Т)ААС(Г/Т)G-нуклеотидные последовательности.

bHLH-белки (basic helix-loop-helix) относятся к транскрипционным факторам, имеющим основной ДНК-связывающий домен типа "спираль—петля—спираль". Их ДНК-связывающий участок из 9—11 положительно заряженных аминокислот обеспечивает распознавание специфической нуклеотидной последовательности, называемой E-боксом, в то время как HLH-домен обеспечивает возможность для гомо- и гетеродимеризации белка и взаимодействие с ДНК. В это семейство ТФ входят белки, которые участвуют в регуляции развития корней, трихом и плодolistиков, в передаче фитохромного сигнала, а также в формировании устьиц.

bZIP-белки (basic leucine zipper) — семейство транскрипционных факторов с основным ДНК-связывающим доменом типа "лейциновая застежка-молния". В этом домене остатки лейцина расположены через каждые шесть аминокислотных остатков на равном расстоянии друг от друга и оказываются на одной стороне α -спирали через каждые два витка. Такие домены не связываются с ДНК, но обеспечивают димеризацию содержащих их транскрипционных факторов путем взаимопроникновения лейциновых α -спиралей, которые переплетаются друг с другом, как в застежке-молнии. В результате в димере появляются две правильно расположенные друг относительно друга полипептидные цепи, составленные преимущественно из основных аминокислотных остатков, которые образуют ДНК-связывающий центр фактора транскрипции. Этот домен обеспечивает специфическое связывание с такими нуклеотидными последовательностями, как ССАСGТСА, ССАСGТGG и TGACGТАА. bZIP-белки участвуют в регуляции ответных реакций растений на АБК и гиббереллины, контролируют синтез гиббереллинов, фотоморфогенез, развитие цветка и листа.

НАС-белки (NAM, АТАF1, 2, СUP2) контролируют развитие меристем и формирование органов, а также участвуют в передаче ауксинового сигнала. Регуляция уровня НАС-белков может осуществляться двумя путями:

- убиквитин-зависимым протеолизом;
- микро-РНК-зависимым расщеплением их мРНК.

ARF-семейство (auxin response factor) транскрипционных факторов участвуют в передаче ауксинового сигнала, эмбриогенезе, регуляции формирования цветков

и сосудов. ARF-белки специфически связываются с TGTCTC-последовательностями ауксин-регулируемых генов и функционируют вместе с репрессором этих генов Aux/IAA (Auxin/IAA) (см. разд. 8.2.3).

C2H2(Zn)-белки относятся к транскрипционным факторам, содержащим "цинковые пальцы". Они отвечают за процессы эмбриогенеза, регулируют развитие цветков, побегов и семян, контролируют время цветения и формирование клубеньков.

GRAS-семейство ТФ включают белки, участвующие в регуляции развития корня и побегов, в ответных реакциях на гиббереллины, в передаче фитохромного сигнала. Белки этого семейства содержат консервативный GRAS-домен, название которого произошло от начальных букв типичных представителей этой группы — GAI (GA-insensitive), RGA(repressor of GA), SCR.

К GRAS-семейству транскрипционных факторов относятся DELLA-белки, участвующие в передаче гиббереллинового сигнала (см. разд. 8.3.2), а также белки, SCARECROW (SCR) и SHORTROOT (SHR), контролирующие дифференцировку клеток эндодермы.

GARP семейство транскрипционных факторов участвуют в передаче цитокининового сигнала и формировании дорзо-вентральной симметрии листа.

ССААТ-семейство факторов транскрипции специфически связываются с ССААТ-боксом за счет ДНК-связывающего домена bZIP-типа. Они участвуют в регуляции эмбриогенеза и включают более 30 белков.

C2C2(Zn)-белки отвечают за процессы прорастания семян, циркадные ритмы, регуляцию времени цветения, дорзо-вентральную симметрию.

АВ13/VP1-белки контролируют эмбриогенез, развитие и прорастание семени, передачу сигнала от АБК, дифференцировку пластид.

Белки WRKY, относящиеся к классу белков, содержащих "цинковые пальцы", сходны с этилен-зависимыми факторами транскрипции, например с ERF1. Большинство этих белков содержат так называемые WRKY-домены, состоящие из 60 аминокислотных остатков, в которые входит очень консервативная последовательность аминокислот — WRKYGQK на N-конце молекулы. Этот тип регуляторов транскрипции имеет большое значение в устойчивости растений к патогенам и абиотическим стрессовым воздействиям, которая формируется с участием таких гормонов, как салициловая, жасмоновая и абсцизовая кислоты. Помимо этого WRKY-гены участвуют в регуляции развития и прорастания семени, контролируемом гиббереллинами, а также процесса старения.

9.1.2. Эпигенетический контроль развития

Гены функционируют в некой среде, которая не может не оказывать влияние на характер их экспрессии. Поэтому реализация информации, заключенной в геноме, будет зависеть не только от нуклеотидных последовательностей конкретных генов, но также и от внешних условий, состояния хроматина, модификаций ДНК и ее транскриптов, т. е. находиться под *эпигенетическим контролем*.

Эпигенетика изучает стабильные, передаваемые в длинном ряду клеточных делений и даже в ряду поколений изменения уровня экспрессии генов, не связанные с изменениями последовательности нуклеотидов в ДНК. Один из наиболее известных эпигенетических феноменов, описанный на кукурузе еще в середине прошлого века Барбарой МакКлинток (McClintock, 1950), — это циклическая активность транспозонов. Он состоит в том, что в ряду поколений происходит периодическое освобождение транспозонов от гетерохроматинового подавления их активности.

Ярким примером эпигенетической регуляции индивидуального развития растений является также репрессия у арабидопсиса гена, который кодирует ингибирующий цветение фактор транскрипции *FLC*. Репрессия этого гена происходит в процессе вернализации, или яровизации, которая необходима многим растениям умеренных широт для индукции цветения. Вернализация достигается воздействием на растения в течение нескольких дней, недель или месяцев низкой положительной температуры на той или иной стадии их вегетативного развития. Например, цветение арабидопсиса значительно ускоряется, если замоченные семена в течение двух-трех дней выдерживать при 2 °С. Происходящая в этих условиях репрессия ингибирующего цветение гена *FLC* сохраняется на всю жизнь растения независимо от того, при какой температуре оно в дальнейшем выращивается.

Эпигенетический статус организма определяется характером и уровнем метилирования ДНК, посттрансляционными модификациями гистонов, присутствием определенных изоформ гистонов и характером укладки хроматина. Наиболее хорошо описанным эпигенетическим механизмом регуляции является метилирование ДНК.

Модификация ДНК. Эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов в основном реализуются посредством стойких модификаций хроматина в тех участках, где эти гены расположены. Эпигенетическая регуляция активности генов главным образом проявляется в их долгосрочной репрессии. Транскрипционное подавление генов достигается посредством ремоделирования хроматина, метилирования ДНК и метилирования гистонов.

Хроматин-ремоделирующий комплекс участвует в АТФ-зависимом скольжении гистоновых октамеров, составляющих ядро нуклеосом, вдоль цепи ДНК. Таким образом, достигается реорганизация нуклеосомной структуры хроматина. Нарушение работы хроматин-ремоделирующего комплекса у мутантов арабидопсиса приводит к нарушению образования хромоцентров, к реактивации заглушенных транспозонов, ретротранспозонов и трансгенов или к глушению ряда генов, активных у нормальных растений.

Поскольку линкерная ДНК более доступна для транскрипции, чем нуклеосомная, уровень транскрипции многих генов может быть изменен самим фактом перемещения гистоновых октамеров вдоль молекулы ДНК. Однако это не главная причина глушения генов. Гораздо важнее то, что работа хроматин-ремоделирующего комплекса необходима для дальнейших модификаций хроматина, главной из которых является метилирование ДНК — важнейшая детерминанта эпигенетики. Метилированию подвергаются остатки цитозина в положении 5, что приводит к глушению транскрипции в зоне метилированного промотора.

Модификация гистонов. Еще одним эпигенетическим механизмом, позволяющим контролировать экспрессию генов, являются химические модификации гистонов. Активность гистонов в растениях, как и у животных, может модифицироваться путем их метилирования, ацетилирования, фосфорилирования, гликозилирования и убиквитинирования с последующим протеолизом.

Гистоны в составе нуклеосомы имеют обращенные наружу N-концы полипептидов, которые могут подвергаться многочисленным модификациям. Эти модификации очень сильно влияют на уровень транскрипции генов, находящихся в контакте с модифицированными гистонами. Некоторые из этих модификаций, такие как фосфорилирование и, в меньшей степени, ацетилирование, носят динамичный характер. Они могут довольно быстро возникать и исчезать. Наиболее статичный характер носит метилирование гистонов.

Состояние хроматина сильно изменяется в ходе развития растений. В целом содержание гетерохроматина возрастает при дифференцировке и формировании органов, а в каллусе и протопластах оно снижается. Однако до сих пор неизвестны механизмы, посредством которых упаковка ДНК в ядре влияет на развитие растений.

9.1.3. МикроРНК

К *микроРНК* (miРНК) относят эндогенные короткие РНК, которые не кодируют белки и играют ключевую роль в подавлении экспрессии генов путем расщепления транскриптов этих генов или за счет блокирования трансляции их мРНК. Таким способом микроРНК могут контролировать уровень экспрессии почти половины известных генов, кодирующих синтез факторов транскрипции. МикроРНК, как и факторы транскрипции, по-видимому, также могут выполнять функции "переключателей" программ развития клеток. Как только в клетке индуцируется синтез определенных микроРНК, это приводит к изменению судьбы данной клеточной линии.

Поэтому асимметрия (поляризация) распределения микроРНК в растительных органах и тканях будет приводить к подавлению экспрессии соответствующих генов-мишеней. Хорошо изучена репрессия посредством miРНК165 и miРНК166 генов *PHABULOSA*, *PHAVOLUTA* и *REVOLUTA*, кодирующих факторы транскрипции семейства HD-ZIP, которые важны для становления дорсовентральной симметрии листа. Репрессия достигается путем дегградации мРНК. В генах *PHABULOSA* и *PHAVOLUTA*, кроме того, происходит метилирование ДНК. Другим ярким примером участия микроРНК в регуляции развития растений может служить репрессия посредством miРНК172 флорального гена *APETALA2* в примордиях плодолистиков и тычинок.

МикроРНК принимают участие также в регуляции эмбриогенеза и формирования семени, морфогенеза листа и корня, пролиферации клеток в меристемах и формирования органов цветка, трансдукции гормональных сигналов. В каждом растении содержатся сотни различных микроРНК, которые могут передаваться по симпласту от клетки к клетке, а также передвигаться по флоэме на большие расстояния.

9.1.4. Полярность

В любом многоклеточном организме деятельность отдельных органов, тканей и клеток должна быть скоординирована таким образом, чтобы обеспечить функционирование организма как целого. Одним из наиболее существенных элементов целостности растительного организма является *полярность*, т. е. осевая или аксиальная (от англ. *axis* — ось) организация тела в пространстве. Под полярностью понимают специфическую ориентацию активности и морфогенеза растения в пространстве. Полярность также можно определить как существование функционально значимых асимметричных структур, образующихся в ответ на действие векторизованных стимулов (внешних или внутренних).

Осевая, или аксиальная полярность, предполагает наличие хорошо развитой продольной оси, несущей латеральные органы — боковые ветви и корни, листья и цветы. Вследствие аксиальной организации в процессе роста не происходит образования бесформенной массы живого вещества. Вдоль осей и симметрично по отношению к ним происходит закладка всех органов и тканей растения. Помимо аксиальной выделяют также и другие формы полярности — дорсовентральную, радиальную. Однако чаще всего термин "полярность" используется для обозначения осевой полярности.

Поляризация может быть индуцирована как с помощью физических (свет, гравитация, электрическое и магнитное поле), так и химических (гормоны, ионы) воздействий. Особенно эффективным способом поляризации клеток является создание локальных градиентов ионов, в первую очередь таких, как Ca^{2+} , K^+ и H^+ . Отличительной особенностью поляризующих воздействий является их векторный, направленный характер.

Физиологическое проявление полярности. Если взять черенки ивы и поместить их во влажную атмосферу, то адвентивные корни будут развиваться на морфологически нижнем, а почки — на верхнем конце, даже если черенки перевернуть (рис. 9.2). Если такой побег разрезать поперек на более короткие черенки, у каждого из них сохраняется та же полярность при формировании корней и побегов. Таким образом, несмотря на то, что черенки ивы не имеют каких-либо морфологических различий между верхними и нижними концами, видно, что они обладают отчетливой физиологической полярностью.

На протяжении всего жизненного цикла практически у всех растительных организмов можно зарегистрировать четко выраженные *градиенты скорости роста*. Например, скорость роста листьев пшеницы характеризуется убывающим градиентом от основания к верхушке. У гипокотилей фасоли имеется крутой аксиальный градиент скорости роста, наиболее высокий у клеток, примыкающих к подсемядольному колену, и постепенно снижающийся по направлению к основанию проростка.

Многим исследователям удалось зарегистрировать так называемые *градиенты цветения*, ориентированные параллельно главной оси растения. Наличие хорошо выраженных градиентов цветения продемонстрировано на культуре эксплантов табака, взятых из различных участков растения. Из эксплантов, полученных

из цветоносов, образовывались только цветковые почки. Если экспланты получали из верхних частей стебля, то на них формировались как цветковые, так и вегетативные почки. Из нижних междоузлий стебля возникали только вегетативные почки.

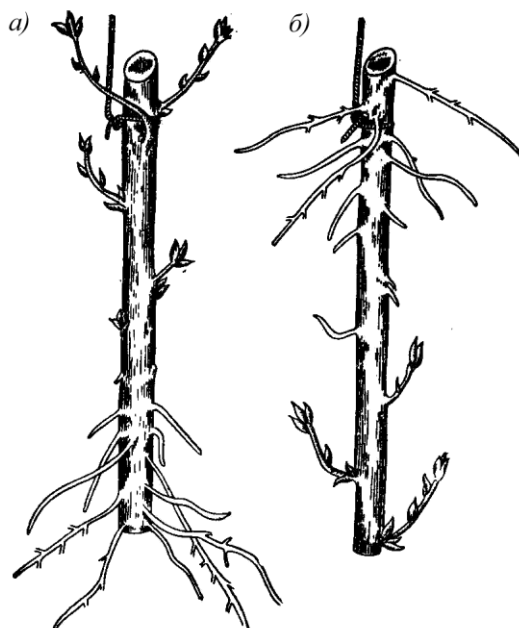


Рис. 9.2. Черенок ивы, посаженный нормально (а) и нижним концом вверх (б) (Pfeffer, 1903)

Полярность растительной клетки. Основа поляризации растительных клеток связана с формированием аксиальных градиентов биоэлектрических потенциалов (БЭП) за счет изменения мембранной проницаемости, в первую очередь к ионам Ca^{2+} , K^+ , Cl^- и H^+ . Полярный рост клеток, например верхушечный рост пыльцевой трубки или корневого волоска, характеризуется сфокусированным в направлении роста цитозольным градиентом ионов Ca^{2+} , поляризацией актинового цитоскелета, апикальным транспортом мембранных везикул с их последующим экзоцитозом. В процессе формирования оси симметрии растительных клеток также участвуют мономерные ГТФ-связывающие белки, фосфоинозитиды, активные формы кислорода и Са-зависимые протеинкиназы. Интегральная поляризация клетки также может быть вызвана локальными контактами с другой клеткой, внеклеточным веществом или субстратом.

Полярность растительных органов и тканей. Полярность в организации растений легче всего обнаруживается по морфологическим различиям. Для растительных организмов характерно наличие хорошо развитой продольной оси, несущей латеральные органы, такие как побеги, листья, цветки и боковые корни. Вдоль этой

оси возникают различия: на одном конце главной оси формируется корневая система, на другом — побег.

Формирование электрофизиологической оси полярности будущего растения происходит на самых ранних этапах его развития. Уже через 30 мин после оплодотворения у зиготы бурой водоросли *Fucus* происходит "электрическая" поляризация клетки. В этот момент появляется трансцитоплазматический ток, входящий в область будущего ризоида и выходящий с противоположной стороны, где будет формироваться таллом (рис. 9.3). Наибольшая плотность тока регистрируется при этом в области наиболее интенсивно растущего ризоидального полюса. Аксиальные градиенты БЭП также зарегистрированы вдоль прорастающей пыльцы, растущего корневого волоска и кончика корня, у развивающихся эмбриоидов.

Главным фактором полярной организации роста, морфогенеза и тропизмов служит процесс полярного транспорта ИУК, который корректируется полярными потоками ионов Ca^{2+} . Практически любые векторные воздействия внешней среды индуцируют полярные потоки ионов Ca^{2+} и формируют градиенты этого катиона в клетках и тканях растительного организма. Именно полярные потоки кальция несут первичную информацию о возникающем векторе поляризации и задают пространственную разметку активности обменных процессов и морфогенеза. При этом в первую очередь изменяется ионная проницаемость клеточных мембран, формируется специфическая система ионных электрических токов, появляется, как удачно выразился А. Голдсуорси (A. Goldsworthy, 1986), "электрический компас", который позволяет ориентировать в пространстве процессы роста и морфогенеза. Дальнейшая реализация этой позиционной информации приводит к изменениям в активности ROP-ГТФаз, элементов цитоскелета, гормонального статуса и, в итоге, к дифференциальной экспрессии генов и запуску процессов полярного роста и дифференцировки.

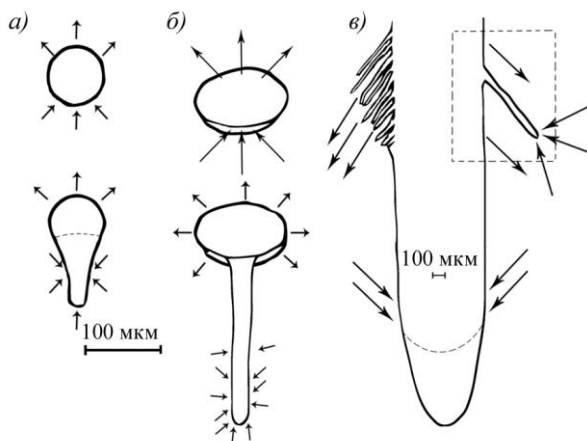


Рис. 9.3. Распределение силовых линий электрического тока вокруг: *a* — прорастающей зиготы фукуса; *б* — прорастающей пыльцы лилии; *в* — корня и корневого волоска ячменя. Стрелками показано направление движения положительных зарядов (по Ventrup, 1984)

9.1.5. Корреляции в ходе роста и морфогенеза

Процессы роста различных органов и тканей растительного организма протекают не независимо, а тесно взаимосвязаны. В результате деятельности апикальных меристем постоянно увеличиваются длина стебля и масса корневой системы. Их толщина и прочность возрастают благодаря активности камбия и перидикла. Упорядоченную взаимосвязь между отдельными частями растения (клетками, тканями, органами), а также влияние одних частей растения на другие (нередко находящиеся на очень большом расстоянии) называют *корреляциями*.

Самый простой тип корреляций связан с питанием. Побегов, снабжая корни ассимилятами, стимулируют рост корневой системы. В свою очередь, растения с более мощной корневой системой поглощают больше питательных веществ и имеют более развитую систему побегов. С возрастанием массы побегов увеличивается и корневая система. Листья за счет синтезируемых в них ассимилятов стимулируют рост и развитие собственных пазушных почек.

При *коррелятивном торможении*, из-за конкуренции за питательные вещества один орган подавляет другой. С увеличением количества развивающихся плодов (например, у томатов) их размер уменьшается. Нередко рост листьев усиливается при удалении соцветий, пазушных побегов или других листьев. Рост вегетативных органов подавляется при формировании цветков, плодов и семян.

Однако взаимоотношения растущих частей растений нельзя объяснить только конкуренцией за питательные вещества. Коррелятивные взаимодействия очень часто определяются количественным соотношением фитогормонов. Именно гормональная система растений играет главную роль в определении интенсивности роста и направления морфогенеза клеток и тканей растений.

Донорно-акцепторные взаимосвязи. Ткани и органы растения, к которым направлен постоянный поток органических и минеральных соединений, называются *акцепторными* (зоны интенсивного роста, гетеротрофные и репродуктивные органы), а те зоны, из которых происходит перемещение питательных веществ, называют *донорными* (листья, запасующие ткани и органы). Например, молодые листья являются акцепторами ассимилятов, поступающих из зрелых и активно фотосинтезирующих листьев-доноров. *Донорно-акцепторные* отношения играют очень важную роль в процессах роста и развития таких органов как листья и боковые корни, цветки, плоды и семена, клубни и луковицы. В течение онтогенеза происходит постоянная смена тканей-доноров и тканей-акцепторов.

Активность донорных или акцепторных участков в растении зависит от гормонального статуса ткани и определяется процессами синтеза, транспорта, конъюгации и катаболизма фитогормонов. В формирующихся плодах, клубнях и клубеньках (у бобовых) наблюдается возрастание концентрации эндогенных ауксина и цитокининов. Гормоны, синтезируемые в молодых развивающихся тканях, играют также важную роль в формировании сосудов, связывающих эти ткани с другими частями растительного организма.

Фитогормоны могут усиливать поступление ассимилятов практически во все органы растения, а именно: в верхушки стеблей, корни, молодые распускающиеся листья, репродуктивные органы, молодые растущие плоды, а также запасные органы. Именно уровень фитогормонов определяет "запрос" на ассимилянты и на фотосинтетическую активность листьев. Фитогормоны способны оказывать прямое воздействие на функционирование листа, влиять на активность практически всех процессов и в световой, и в темновой стадиях фотосинтеза.

Распускающиеся почки являются акцепторами ассимилятов, которые поступают из зрелых, активно фотосинтезирующих листьев. Аттрагирующая способность развивающихся почек обусловлена высоким содержанием в них таких гормонов как ауксины и цитокинины.

Апикальное доминирование. Известно, что в апикальной меристеме побега клетки делятся и дифференцируются гораздо интенсивнее, чем в меристеме пазушных почек. В результате наблюдается более активный рост и дифференцировка апикальной почки и подавление развития лежащих ниже пазушных почек. Это явление было названо *апикальным доминированием* или *коррелятивным ингибированием почек*.

Степень доминирования апикальной почки над боковыми варьирует у разных видов растений. У некоторых видов, например у подсолнечника, доминирование полное и распространяется на всю длину стебля. У других видов, в частности томатов, доминирующий эффект апикальной почки слабее, и растения похожи на куст. У многих растений (ясень, явор) доминирование верхушки побега ослабевает по мере старения. Вначале у них интенсивно растет только основной побег, а в последующие годы наблюдается активное ветвление и усиленное развитие боковых побегов. У ряда однолетних растений эффект апикального доминирования снижается к концу вегетационного периода и/или после формирования цветка.

Причина подавления апикальной почкой развития боковых почек и побегов заключается в разном снабжении их ауксином. Для апикальной почки главного побега характерно наиболее высокое содержание ИУК, что является основой для формирования мощного проводящего пучка и максимального аттрагирующего эффекта. Именно полярный базипетальный поток ИУК, синтезируемой в апикальной части растения, лежит в основе явления апикального доминирования. Показано, например, что обработка экзогенной ИУК листьев или апексов хризантемы приводила к угнетению развития цветочных почек, задерживала зацветание, снижала процент раскрывшихся цветков. Удаление апикальной почки или ингибирование полярного транспорта ИУК, например триодбензойной кислотой (ТИБК), снимает эффект апикального доминирования. Это вызывает резкую активацию роста пазушных побегов и ветвления растений.

Важную роль в явлении апикального доминирования также играют цитокинины. В ряде случаев апикальное доминирование может быть снято обработкой цитокининами, которые стимулируют рост боковых почек стебля.

Ауксин, производимый верхушкой побега, угнетая рост боковых почек стебля, стимулирует закладку латеральных корней. Цитокинины, которые производятся

в верхушке корня, угнетают инициацию боковых корней, но стимулируют рост боковых почек стебля.

Позиционная информация. Клетки в многоклеточном организме находятся в тесном контакте и постоянно обмениваются между собой продуктами жизнедеятельности. *Позиционной информацией* называют систему распределения в пространстве неких сигналов, которые обуславливают специализацию (дифференциацию) клеток и тканей растительного организма. Концепция "позиционной информации" была предложена эмбриологом Л. Вольпертом (L. Wolpert, 1971), который полагал, что развитие каждой клетки определяется разницей в концентрациях (градиентом) неких веществ — морфогенов. Вольперт считал, что каждая клетка способна "химически оценить" свое месторасположение и, в зависимости от этого, "определить" свою специализацию и дифференцироваться.

Поэтому очень важным фактором, определяющим направление роста и развития клетки, является ее местоположение в ткани или органе.

Это было хорошо показано тонкими экспериментами сотрудников группы Б. Шереса (B. Scheres) в Нидерландах (van der Berg et al., 1995). С помощью лазера они последовательно повреждали (удаляли) клетки-инициали в меристеме корня и следили за судьбой клеток, которые из этих инициалей обычно образуются. Оказалось, что при удалении, например, кортикально-эндодермальных инициалей производимая ими совокупность клеток коры и эндодермы не исчезает. Клетки перикала, смежные с поврежденными кортикальными инициалами, занимали место удаленной инициали и начинали выполнять ее функции, производя клетки коры и эндодермы.

Эти эксперименты показывают, что именно позиционные сигналы определяют путь развития растительной клетки, т. е. место клетки в ткани и ее окружение (позиционная информация) могут играть более важную роль при определении направления дифференцировки, чем тип инициали, из которой клетка произошла.

9.2. Меристемы

Процессы роста и развития вегетативных органов идут постоянно в течение всего онтогенеза растения, в отличие от животных, у которых размеры тела увеличиваются только в эмбриональный период развития и в молодости. Это обеспечивается функционированием меристем, которые дают начало всем органам и тканям растительного организма.

Меристемы представляют собой популяции небольших постоянно делящихся клеток с "эмбриональными" свойствами. Основная роль меристем — формирование органов растения. Вегетативные меристемы дают начало не только органам и тканям, но также постоянно пролиферируют сами. У древесных растений меристемы могут находиться в "эмбриональном" состоянии тысячи лет. Причина такого явления состоит в том, что эти клетки не способны перейти к дифференцировке и постоянно делятся, поскольку у них заблокированы гены, направляющие дифференцировку клеток по определенному пути.

Однако не все меристематические клетки делятся с одинаковой скоростью или частотой. Центральные клетки делятся значительно медленнее, чем окружающие клетки. Эта группа медленно делящихся клеток меристемы корня называется *покоющимся центром* (рис. 9.4). В меристеме также выделяют группы клеток, которые постоянно делятся, чтобы продуцировать другие клетки, дающие начало органам и тканям. Эти клетки, называемые инициалами, можно сравнить со стволовыми клетками животных организмов. *Клетки-инициали* окружают покоящийся центр, однако они не являются его частью. Когда клетка-инициаль делится, одна из дочерних клеток остается в меристеме, а вторая начинает быстро делиться и дифференцироваться, давая начало различным органам и тканям растительного организма.

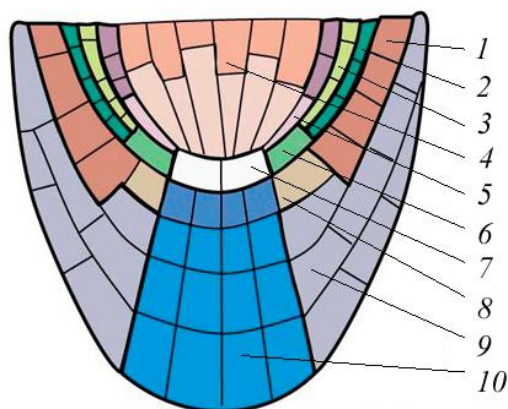


Рис. 9.4. Схематическое строение апикальной меристемы корня арабидопсиса (Nakajima, Benfey, 2002): 1 — эпидерма; 2 — кора; 3 — эндодерма; 4 — сосуды и их инициали; 5 — перицикл и его инициаль; 6 — инициали коры и эндодермы; 7 — покоящийся центр; 8 — инициаль эпидермы и корневого чехлика; 9 — латеральная часть корневого чехлика; 10 — колумелла и ее инициаль

Меристемы различают по местоположению в растении, происхождению и структурам, которые они могут продуцировать. *Апикальные* меристемы корня и побега, иногда называемые *первичными*, формируются в течение эмбриогенеза (см. разд. 9.4.1). Осевой план строения растения задается в результате работы именно апикальных меристем корня и побега.

На более поздних этапах развития возникают первичные и вторичные *латеральные* меристемы. Существуют два типа *первичных* латеральных меристем — перицикл и прокамбий. *Перицикл* — это обычно первый хорошо выраженный слой клеток в центральном цилиндре, который находится непосредственно под эндодермой. Он ограничивает массив клеток центрального цилиндра и проводящих тканей сразу же за апикальными меристемами корня и побега. Перицикл можно представить в виде цилиндра, состоящего из одного, двух, реже нескольких слоев

клеток, периодически делящихся внутри стебля и корня. Клетки перицикла долго сохраняют свойства меристемы и способность к новообразованиям. Однако они делятся периодически, а не постоянно, как клетки камбия. Перицикл дает начало боковым корням, клеткам паренхимы и млечникам, феллогену (пробковому камбию), придаточным почкам у корнеотпрысковых растений и, частично, обычному камбию. Под перициклом находятся клетки *прокамбия*, которые дают начало первичным проводящим тканям.

Первичные ксилемные элементы, которые образуются из прокамбия, называют *протоксилемой*, более поздние — *метаксилемой*. Из прокамбия также образуются флоэмные элементы, именуемые соответственно *протофлоэмой* и *метафлоэмой*.

Камбий и *феллоген* относятся к *вторичным* латеральным меристемам. Их деятельность способствует увеличению толщины корней и побегов. Камбий представляет собой меристему, которая образует вторичные проводящие ткани — флоэму и вторичную ксилему. Выделяют два типа камбиальных клеток. Длина клеток первого типа — *веретеновидных* инициалей — в несколько раз больше ширины. Клетки второго типа — *лучевые* инициали — лишь слегка удлинены или изодиаметричны. Расположение камбиальных инициалей влияет на организацию вторичных проводящих тканей. Веретеновидные инициали определяют осевое строение тканей и органов растения, а лучевые инициали — их радиальную симметрию. Формирование клеток сосудов из камбиальных инициалей идет попеременно — то в сторону ксилемы, то в сторону флоэмы, однако это чередование не всегда бывает равномерным. Индукция и интенсивность деления клеток камбия, а также направление их дифференцировки определяются содержанием фитогормонов и ассимилятов, поступающих из развивающихся почек и листьев.

Из меристематических клеток феллогена формируется покровная защитная ткань вторичного происхождения — *перидерма*. Перидерма замещает эпидерму в тех стеблях и корнях, которые разрастаются в толщину путем вторичного роста. Перидерма включает три типа тканей: сам феллоген (или пробковый камбий), феллему и феллодерму. *Феллема* (обычно называемая пробкой) представляет собой защитную ткань, которая возникает из феллогена по направлению к периферии органа. *Феллодерма* — живая паренхимная ткань, которая формируется за счет деления меристематических клеток феллогена внутри органов растения.

У некоторых растений имеются *интеркалярные* (вставочные) меристемы, которые представляют собой активно растущие группы клеток, расположенные большей частью у основания междоузлий стебля. Эти меристемы, которые находятся между участками дифференцированных тканей, иногда называют *остаточными*, поскольку они являются недифференцированными производными апикальных меристем. Интеркалярные меристемы отличаются от апикальных и латеральных тем, что, во-первых, содержат некоторые дифференцированные элементы (например, проводящие ткани), а во-вторых, в них нет клеток-инициалей.

Интеркалярные меристемы хорошо выражены у основания молодых растущих листьев, дифференциация тканей в которых идет базипетально (ткани в верхушке

листа дифференцируются раньше, чем у его основания). Хорошим примером таких меристем являются злаки, у которых междоузлия и листовые влагалища продолжают нарастать основанием даже после того, как верхние части уже дифференцировались. Клетки интеркалярной меристемы долго сохраняют способность к росту после того, как закончится удлинение данного междоузлия. У "полегающих" злаков, например, возобновление роста клеток на нижней стороне интеркалярной меристемы в основании междоузлия (и окружающего его листового влагалища) помогает растениям "подниматься" с земли.

9.3. Рост растений

Рост представляет собой одно из наиболее легко обнаруживаемых проявлений жизнедеятельности растений, т. к. при этом увеличиваются размеры растительных органов и тканей. Однако Д. А. Сабинин писал, что рост нельзя сводить только к увеличению растительной массы, поскольку при этом происходит "новообразование элементов структуры растительного организма".

Под термином "*рост*" понимают процесс необратимых количественных изменений, которые происходят во время развития организма, органа, ткани или клетки. Рост любого многоклеточного растения включает такие процессы, как увеличение числа клеток за счет их *деления*, а также увеличение размеров клеток путем *растяжения*.

В апикальных участках побегов и корней наиболее интенсивное деление клеток происходит в меристеме, а зона наиболее быстрого увеличения размеров клеток находится в нескольких миллиметрах от апекса. В органах с детерминированным ростом, например в листьях и плодах, эти два процесса разделены во времени. На ранних этапах развития преобладает клеточное деление, а затем наступает фаза, в которой деление прекращается и начинается увеличение размеров клеток путем их роста растяжением.

9.3.1. Деление клеток

Деление клеток (репродукция) включает репликацию клеточных органелл, в том числе и ядра. Основным результатом этого процесса является удвоение наследственной основы клеток и появление двух дочерних клеток. Репродукция клеток включает *интерфазу*, в течение которой осуществляется синтез (*редупликация*) ДНК и образуется двойной набор хромосом, а также процесс *митоза*, когда происходит равномерное распределение хромосом между дочерними клетками. Процесс деления растительных клеток зависит от соотношения ауксинов и цитокининов в ткани.

Во время деления клетки происходит репликация различных органелл, включая пластиды и митохондрии. Однако распределение пластид материнской клетки между дочерними идет, по-видимому, случайным образом. Каждая дочерняя

клетка, образовавшаяся в результате деления, вдвое меньше родительской. Поэтому эти клетки начинают расти и увеличиваться в размерах путем новообразования элементов цитоплазмы и материала клеточных стенок, но не за счет вакуолизации.

В типичном *клеточном цикле* выделяют четыре последовательно сменяющих друг друга этапа: митоз, интерфаза, включающая в себя пресинтетический период (G_1 -фаза), синтез ДНК (S-фаза), постсинтетический период (G_2 -фаза) и снова митоз. В интерфазе иногда выделяют период G_0 (период покоя), когда клетка после митоза не вступает в клеточный цикл, а переходит в состояние покоя на неопределенное время (пока пролиферация не будет индуцирована внешним стимулом). В состоянии G_0 у клеток увеличивается устойчивость к температурным и некоторым другим стрессовым воздействиям, и они могут выживать при неблагоприятных условиях внешней среды.

В диплоидных соматических клетках семян ядра содержат 2С набор ДНК (символом "С" обозначают количество ДНК в генеративном ядре). В конце синтетической (S) фазы и на протяжении G_2 -фазы ядра содержат удвоенный (4С) набор ДНК.

Митоз состоит из четырех фаз: профазы, метафазы, анафазы и телофазы. Во время митоза на стадиях профазы и метафазы происходят следующие события: разрушается ядерная мембрана, за счет конденсирования хроматина становятся заметными хромосомы, формируется митотическое веретено, с которым хромосомы связываются. На этапе от метафазы до анафазы хроматиды, связанные кинетохорами, разделяются на дочерние хромосомы, которые с участием митотического веретена перемещаются к противоположным полюсам клетки. После разделения ядерного материала, в случае типичного митоза, происходит деление цитоплазмы — *цитотомия* (*цитокинез*).

Ключевыми ферментами, регулирующими вхождение клетки в клеточный цикл, а также переходы от одной фазы клеточного цикла к другой ($G_1 \rightarrow S \rightarrow G_2 \rightarrow$ митоз) являются циклинзависимые протеинкиназы. У растений подобные переходы могут регулироваться цитокининами и ауксинами, которые контролируют разные этапы клеточного цикла путем регуляции активности циклинзависимых киназ. В частности цитокинины (в присутствии ауксинов) индуцируют деление клеток, регулируя переходы $G_1 \rightarrow S$ и $G_2 \rightarrow$ митоз.

Ключевой точкой в фазе G_1 и соответственно началом клеточного цикла является процесс инициации синтеза ДНК. Как только клетка проходит эту точку, процессы удвоения ДНК, а также митоза и цитокинеза становятся необратимыми. Инициация следующего клеточного цикла или переход клетки к дифференцировке возможны лишь после полного завершения митоза, т. е. судьба клетки будет зависеть от того, вступила она в фазу G_1 или нет.

9.3.2. Рост растяжением

Для растительных организмов важен процесс роста *растяжением* за счет увеличения размеров вакуоли, разрыхления и новообразования элементов клеточной стенки. Этот процесс является специфической особенностью клеток растений. Увеличение клетки достигается за счет образования большой центральной вакуоли, при этом цитоплазма сохраняется лишь в виде тонкого пристеночного слоя (см. рис. 1.1). Активное увеличение размеров растительных клеток связано с вакуолизацией клеток и поглощением воды, которое обеспечивается накоплением осмотически активных веществ в вакуоли. Процесс растяжения растительных клеток контролируется ИУК. Этот фитогормон вызывает активацию локализованной в плазматической мембране H^+ -АТФазы и подкисление фазы клеточных стенок, что приводит к их размягчению и растяжению.

Оптимальная концентрация ауксина, стимулирующая рост растяжением клеток колеоптиля злаков и стебля двудольных растений, составляет 1—10 мкМ. Угнетение роста, наблюдающееся при более высоких концентрациях ауксина, как правило, связано с возрастанием (под действием ИУК) содержания этилена. ИУК также может активировать рост растяжением клеток корневой системы растений, однако этот эффект проявляется при очень низких концентрациях ауксина (0,1—1,0 нМ) и ингибировании синтеза этилена. Более высокая концентрация ИУК (1 мкМ) угнетает растяжение клеток корня. Таким образом, корням для роста растяжением необходим очень низкий уровень ауксина.

Способность клеточной стенки растягиваться обусловлена разрывом химических связей между ее структурными полисахаридами. Увеличение объема клетки и ее рост становятся возможными только потому, что одновременно с вакуолизацией происходят изменения структуры и свойств клеточных стенок. Растяжение клеточной стенки сопровождается активацией процессов синтеза целлюлозы и везикулярной секреции, поставляющих новые полисахариды для растущей клеточной стенки. В большинстве случаев рост клетки растяжением идет равномерно всей поверхностью, однако у некоторых клеток (корневые волоски, пыльцевые трубки, гифы грибов, зигота фукуса) имеет место полярный, верхушечный тип роста растяжением.

9.4. Эмбриональный этап развития растительного организма

У растений, размножающихся семенами, эмбриональный этап онтогенеза охватывает развитие зародыша от зиготы до созревания семени. *Эмбриогенезом* называют процесс формирования зародыша внутри материнского растения из оплодотворенной яйцеклетки (зиготы) за счет асимметричного деления и дифференцировки клеток. Эмбриогенез сопровождается формированием тканей и органов будущего растительного организма и завершается формированием семени.

Все процессы эмбриогенеза у покрытосеменных растений происходят в *семязачатке*, внутри которого развивается женский гаметофит, происходят оплодотворение, формирование зародыша и семени (рис. 9.5). Семязачаток состоит из *нуцеллуса* (ядра), *интегументов* (покровов), образующих своими краями узкий канал (*микропиле*), через который пыльцевая трубка проникает в зародышевый мешок, а также *фуникулуса* (семяножки), посредством которого семязачаток прикрепляется к *плаценте*. Место прикрепления семязачатка к семяножке называют *рубчиком*. Противоположную микропиле часть семязачатка называют *халазой*. В халазальной части у многих покрытосеменных образуются клетки, оболочки которых сильно преломляют свет. Эту ткань называют *гипостазой*. Для многих покрытосеменных характерны так называемые *обтураторы* — образования, состоящие из клеток, растущих по направлению к микропиле и способствующих проникновению пыльцевой трубки в зародышевый мешок, ее росту и питанию.

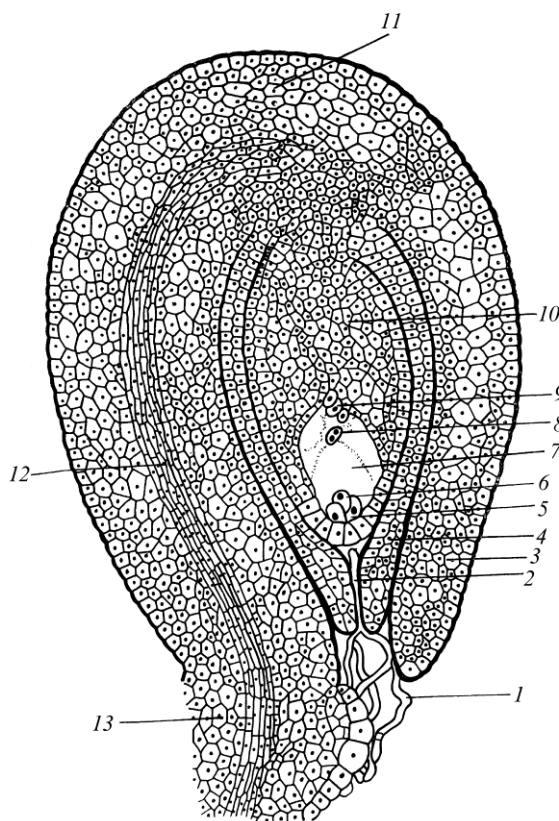


Рис. 9.5. Строение семязачатка ириса (*Iris sibirica*) (по Dodel-Port, 1883):

- 1 — пыльцевая трубка; 2 — микропиле; 3 — наружный интегумент;
 4 — внутренний интегумент; 5 — синергиды; 6 — яйцеклетка; 7 — зародышевый мешок;
 8 — вторичное ядро центральной клетки зародышевого мешка; 9 — антиподы;
 10 — нуцеллус; 11 — халаза; 12 — проводящий пучок; 13 — фуникулус

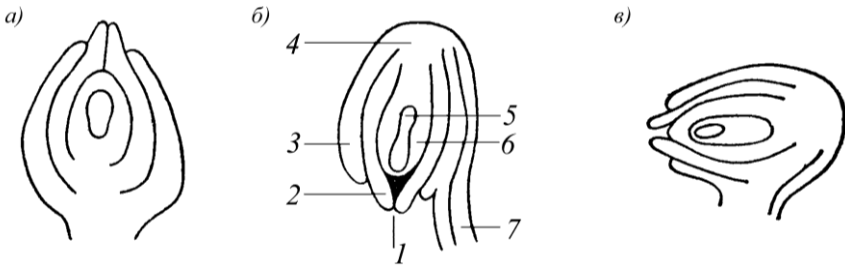


Рис. 9.6. Основные типы и части семязачатка: *a* — ортотропный (прямой) тип; *б* — анатропный (обращенный); *в* — гемитропный (согнутый). 1 — микропиле; 2 — внутренний интегумент; 3 — наружный интегумент; 4 — халаза; 5 — зародышевый мешок; 6 — нуцеллус; 7 — фуникулус

На рис. 9.5 приведен анатропный (обращенный) тип строения семязачатка ириса (микропиле находится на оси, обращенной на 180° по отношению к оси фуникулу-са). Выделяют также ортотропный (прямой) и гемитропный (согнутый) типы семязачатков (рис. 9.6). Между этими основными типами семязачатков встречаются переходные формы.

Женский гаметофит покрытосеменного растения, в котором после оплодотворения формируется зародыш, называют *зародышевым мешком* (см. рис. 9.5). Он включает гаплоидные *яйцеклетку*, две *синергиды*, расположенные на микропиллярном полюсе, *антиподы* — группу гаплоидных клеток, расположенных на халазальном конце, и диплоидную *центральную клетку*.

Оплодотворенная яйцеклетка некоторое время (от нескольких часов до нескольких дней) находится в латентном состоянии (не делится). В первые часы после оплодотворения синтез РНК незначителен и основная масса белков образуется на мРНК, синтезируемой при формировании яйцеклетки. Затем происходит постепенное возрастание синтеза РНК, белков, увеличивается объем центральной вакуоли, которая вскоре распадается на множество мелких вакуолей и, наконец, зигота начинает делиться. При этом характер ее развития у разных групп покрытосеменных растений может сильно отличаться.

Эмбриогенез может быть разделен на два этапа. На первом этапе формируется *зародыш (эмбрион)* — задается общий план строения тела растительного организма, создаются оси симметрии, формируются апикальные меристемы и ряд других тканей. Второй этап эмбриогенеза (постэмбриональное развитие) связан с формированием семени: дальнейшей дифференцировкой клеток и тканей, их обезвоживанием и синтезом биополимеров (липидов, крахмала и белков), необходимых в период прорастания и роста проростков.

9.4.1. Формирование зародыша

В процессе эмбриогенеза (для большинства двудольных растений) выделяют стадии проэмбрио, глобулы, сердцевидной, торпедо и зрелого зародыша. У большинства видов растений *зигота* делится перпендикулярно продольной оси зародыше-

вого мешка. В результате возникают две неравные клетки — крупная базальная вблизи *микротила* и более мелкая апикальная, примыкающая к *центральной клетке* (рис. 9.7, б). Последующий паттерн деления варьирует не только у разных видов растений, но даже в пределах одного вида. Тем не менее появление основных тканей и органов зародыша идет по одному и тому же плану.

На рис. 9.7 показано развитие зародыша рапса *Brassica napus*. Из базальной клетки формируется цепочка клеток, которая называется *суспензором* (*подвеском*), а из апикальной клетки — *зародыш*. Суспензор связывает зародыш с тканями материнского растения и служит для закрепления зародыша в полости зародышевого мешка и переноса к нему питательных веществ. Клетка суспензора, примыкающая к зародышу, морфологически выделяется и называется *гипофизой*. Путем серии поперечных и продольных делений гипофиза дает начало клеткам, из которых формируются корневой чехлик, эпидерма, кора и другие ткани корня.

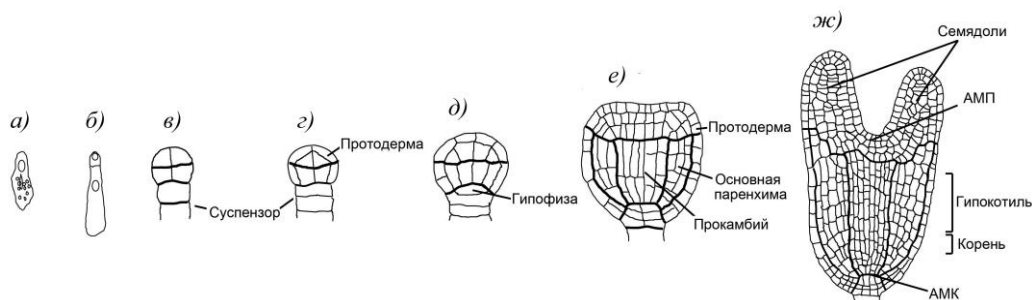


Рис. 9.7. Происхождение тканей и органов из различных зон зародыша в ходе эмбриогенеза у рапса (по West, Narada, 1993): а — зигота; б — двухклеточный зародыш; в — октант; г — ранняя глобула; д — глобулярная стадия; е — ранняя сердцевидная стадия; ж — торпедо, апикальные меристемы побега (АМП) и корня (АМК)

Из второй (апикальной) клетки путем последовательных делений образуется *квадрант*, а затем *октант*, т. е. соответственно четырех- и восьмиклеточный зародыши. Эту стадию эмбриогенеза называют *проэмбрио*. Далее все восемь клеток проэмбрио делятся периклинально (плоскость их деления параллельна поверхности октанта). На этом этапе возникает радиальная симметрия и формируется *глобулярный зародыш*.

Глобулярная стадия заканчивается, когда одна или две семядоли начинают формироваться вблизи апикальной меристемы побега. Перед началом роста семядолей наблюдается уплощение зародыша, приводящее к билатеральной симметрии. На *сердцевидной стадии* развития происходит формирование семядолей и расположенного между ними апекса побега. Затем сердцевидный зародыш удлиняется и переходит к стадии *торпедо*. При этом паттерн тканей и органов сохраняется.

Дифференциация тканей начинается при переходе от стадии октанта к глобулярной. На поверхности зародыша формируется эпидермис, клетки которого обычно

гораздо меньше клеток тканей, находящихся под ним. Эпидермис зародыша, в отличие от эпидермиса побега и корня, называют *протодермой* (рис. 9.7, з). В конце глобулярной стадии формируется *гипофиза* (рис. 9.7, д).

В начале сердцевидной стадии в центре зародыша появляются крупные вакуолизованные клетки и тяж из мелких клеток без вакуолей. Тяж из мелких клеток служит основой для формирования сосудистой ткани, называемой *прокамбием* (рис. 9.7, е). Из крупных клеток формируется *основная паренхима* (иногда называемая *основной меристемой*) — предшественник основных тканей зародыша. На этой же стадии (или позже) возникают *апикальные меристемы корня и побега*, как кластеры клеток с плотной цитоплазмой по обоим концам прокамбиального тяжа (рис. 9.7, ж). Апикальная меристема корня формируется вблизи суспензора (и часто включает ближайшую к зародышу клетку суспензора). Апикальная меристема побега возникает с противоположной стороны прокамбиального тяжа.

У однодольных после стадии глобулы растет только одна семядоля, и их форма отличается от сердцевидной. У злаков в эмбриогенезе формируются такие уникальные органы, как *колеоптиль*, *щиток* и *колеорица*.

У растений процесс формирования зародыша характеризуется последовательными изменениями скорости и направления деления клеток, дифференциацией клеток и тканей, формированием органов и накоплением питательных веществ. Перемещения клеток (как у животных организмов) у растений при этом не происходит. Созревание зародыша (и семени) завершается тем, что ткани начинают терять воду, уменьшается их метаболическая активность и наступает период покоя. Наряду с *зиготическими* (половыми) *зародышами*, растительный организм способен формировать *соматические зародыши* (эмбриониды) на различных репродуктивных и вегетативных органах, а также в культуре растительной ткани (см. главу 11).

9.4.2. Регуляция эмбриогенеза растений

У цветковых растений выделяют две группы генов, контролирующих эмбриогенез:

- гены, которые отвечают за формирование зародыша в целом;
- гены, которые контролируют программы дифференцировки и образования будущих органов растения.

К первой группе генов относятся те, которые отвечают за деление клеток (*KNOLLE*, *KN*; *KEULE*, *KEU*) и полярный транспорт фитогормона ауксина (*GNOM*, *GN*; *PINs*). Примерами второй группы являются гены *GURKE* (*GK*), *FACKEL* (*FK*), *MONOPTEROS* (*MP*), *BODENLOS* (*BDL*).

При мутации *gurke* (рис. 9.8) обычно отсутствуют семядоли и повреждаются клетки апикальной меристемы. Растение становится похожим на огурец, отсюда и название мутации — "*gurke*". Мутантный фенотип начинает проявляться на сердцевидной стадии эмбриогенеза. При мутации *fackel* выпадает середина зародыша — он состоит только из семядолей и корня. Мутации *monopteros* и *bodenlos* приводят к полной потере корня и гипокотила — остаются только семядоли. Мутация *monopteros* становится заметной на этапе перехода от сердцевидной стадии

к стадии торпедо. Мутация *gnom* приводит к тому, что не образуются корни и семядоли, поскольку редуцированы апикальные меристемы корня и побега. Проростки с такой мутацией теряют апикально-базальную полярность и имеют сферическую форму. При этом не формируется сосудистая система.

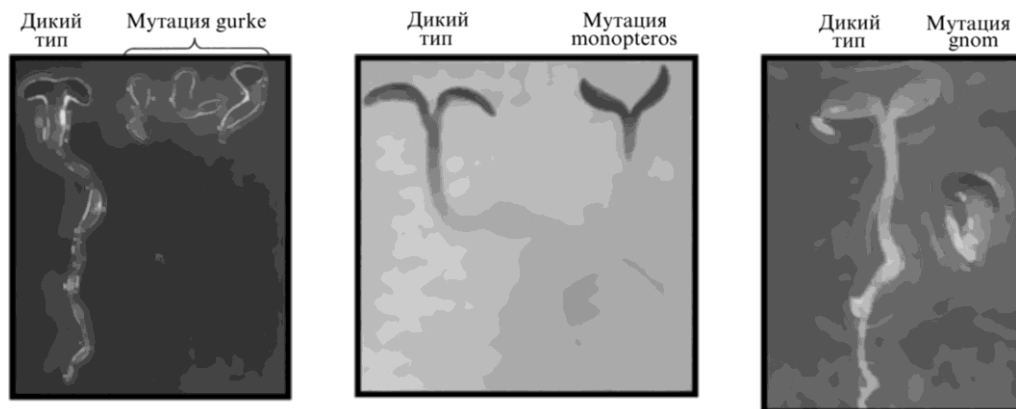


Рис. 9.8. Фенотипические проявления мутаций *gurke*, *monoapteros* и *gnom* (соответственно Torres-Ruiz et al., 1996; Berleth, Jürgens, 1993; Mayer et al., 1993)

Таким образом, продукты генов *GURKE*, *FACKEL*, *MONOPTEROS* и *GNOM* определяют апикально-базальную симметрию зародыша и участвуют в закладке основных тканей будущих органов, контролируя дифференциацию клеток по морфогенетическим программам "корня", "семядолей", "гипокотыля" или других тканей и органов. При этом мутации, затрагивающие одни части зародыша, как правило, не проявляются в других, т. е. экспрессия "эмбриональных генов" пространственно-специфична.

К числу генов, регулирующих ранние этапы эмбриогенеза, также относятся *WUS* (*WUSHEL*) и *WOX5* (*WUS-related homeobox5*), кодирующие гомеодоменсодержащие факторы транскрипции. Они отвечают за поддержание необходимого пула делящихся клеток в апикальных меристемах побега (*WUS*) и корня (*WOX5*). Завершение эмбриогенеза и переход семени к состоянию покоя регулируют продукты генов *LEC1*, *LEC2* (*LEAFY COTYLEDONE*) и *FUS3* (*FUSCA3*), а также фитогормон АБК.

В обеспечении полярности при формировании зародыша главную роль играют процесс полярного транспорта и градиенты фитогормона ИУК (см. разд. 8.2.2). Именно градиенты ауксина определяют формирование апикально-базальной оси зародыша, зоны дифференцировки и формирования тканей и органов. Причем, если на стадии проэмбрио ИУК поступает в зародыш из тканей материнского растения, то уже на стадии глобулы клетки зародыша начинают синтезировать и снабжать себя ауксином самостоятельно. В этот же период в зародыше начинает формироваться система полярного транспорта ИУК, которая создает необходимый уровень этого гормона в зонах закладки будущих тканей и органов растения.

9.4.3. Формирование семян

Эмбриональный этап завершается формированием семян, которые являются функциональной единицей распространения, т. е. органом размножения растения. Семена имеют больше шансов выжить и дать начало новым поколениям, чем споры. Способность к образованию семян позволила семенным растениям (особенно покрытосеменным) доминировать над споровыми растениями и завоевать господство в растительном мире.

Семя развивается из семязачатка, который у цветковых растений располагается внутри пестика (в завязи). В процессе формирования семени происходит накопление питательных веществ и отложение их в запас, а также обезвоживание клеток и тканей. Созревшие семена у большинства видов растений переходят в состояние покоя. После оплодотворения завязь превращается в плод, при этом семена оказываются внутри плода.

Семя цветкового растения состоит из зародыша, эндосперма (или перисперма) и семенной кожуры. Оно представляет собой созревший семязачаток, содержащий зародыш и запас питательных веществ, а также интегументы, превратившиеся в защитную семенную кожуру. До тех пор пока вырастающий из семени спорофит не станет способным к фотосинтезу, его существование поддерживается за счет запасов питательных веществ семени. Хранение питательных веществ семени осуществляется, в основном, вне зародыша — в *эндосперме* или *перисперме*. Эндосперм развивается из двух полярных ядер, слившихся с ядром спермия в центральной клетке зародышевого мешка, а перисперм — это нуцеллярная ткань спорофита.

Вначале эндосперм развивает активную метаболическую деятельность, перерабатывая и передавая зародышу вещества, поступающие в зреющее семя от материнского организма. Затем эта активность затухает и в эндосперме начинается отложение запасных питательных веществ.

Эндосперм зрелого семени обычно состоит из крупных клеток запасочной ткани. В клетках *мучнистого* эндосперма преобладают зерна вторичного крахмала, в клетках *маслянистого* эндосперма — отложения жиров, нередко в сочетании с запасными белками в виде алейроновых зерен. Последние могут быть сосредоточены в специальном наружном слое клеток эндосперма, который называют *алеяроновым слоем*.

У многих двудольных ткани эндосперма (или перисперма) недолговечны и целиком или частично ассимилируются развивающимся зародышем до того, как семя перейдет в состояние покоя. В этом случае запас питательных веществ содержится в тканях зародыша, особенно в семядолях.

Снаружи семя покрыто *семенной кожурой*, которая образуется из интегументов. Основной функцией семени является поддержание жизнеспособности зародыша и хранение запасных питательных веществ. Семенная кожура служит не только для защиты заключенного в ней зародыша, но также оказывает влияние на прорастание семени, приурочивая его ко времени и условиям, наиболее благоприятным для развития проростка.

В процессе превращения семязачатка в семя происходит изменение его частей: большую часть семени занимает зародыш (вместе с эндоспермом), а интегументы (по мере превращения в семенную кожуру) сильно уменьшаются в толщину и подвергаются частичному распаду. Микропиле исчезает (иногда на его месте видно заполненное тканью отверстие), семяножка (фуникулус) частично или полностью отпадает от семязачатка, оставляя *рубчик* или *семенной шов*.

9.4.4. Формирование плодов

Процесс двойного оплодотворения, которое инициирует развитие зародыша и эндосперма, сопровождается также специфическими изменениями цветка, которые ведут к развитию плода. Быстрый рост завязи, формирование плода и семян начинаются сразу же после успешного опыления и образования зиготы.

По мере того как развивается зародыш, происходит разрушение нуцеллуса и большей части органов цветка. Околоцветник и тычинки обычно засыхают и опадают, а завязь, напротив, увеличивается в размерах и претерпевает различные гистологические изменения, связанные, как правило, с формированием приспособлений, облегчающих распространение семян. Из завязи формируется плод, а из интегументов — семенная оболочка. Начальный рост завязи во время развития цветка практически не сопровождается вакуолизацией клеток, а осуществляется только за счет их деления.

У большинства видов растений, например томатов *Lycopersicon esculentum*, черной смородины *Ribes nigrum*, после раскрытия цветков рост клеток делением прекращается, а последующее увеличение размеров плода определяется только растяжением клеток, а не изменением их числа. У других видов, например у яблони *Malus domestica*, деление клеток завязи продолжается некоторое время после опыления. Клетки плодов некоторых растений, например арбуза *Citrullus vulgaris*, увеличиваясь путем вакуолизации, достигают огромных размеров и видны даже невооруженным глазом.

Основываясь на свойствах тканей стенки плода, выделяют *сочные плоды* и *сухие* (вскрывающиеся и невскрывающиеся). Плоды могут развиваться без оплодотворения и образования семян. Это явление, называемое *партенокарпией*, широко распространено среди видов с большим числом семязачатков в плоде (банан, инжир, дыня, ананас, томат). Бессемянные плоды могут также развиваться в результате нарушения развития зародыша, например у кишмишных сортов винограда.

Рост плодов в значительной степени зависит от развития семян. Одной из причин преждевременного опадения плодов являются нарушения в процессах развития семян. Развивающиеся семена являются наиболее богатым источником фитогормонов и влияют на рост плодов посредством вырабатываемых в семенах ауксинов, гиббереллинов и цитокининов. Выявлено, что наибольшая концентрация ИУК регистрируется в семенах, а самая низкая — в стенке плода. Такой градиент распределения гормона делает развивающиеся плоды мощным аттрагирующим центром, который становится наиболее активным потребителем фотоассимиля-

тов и минеральных веществ, имеющихся в растении. Развитие плодов сопровождается резким замедлением вегетативного роста, а у однолетних растений — старением всего организма. При созревании плодов усиливается синтез фитогормона этилена, который резко ускоряет эту завершающую фазу онтогенеза растительного организма.

9.4.5. Покой семян

Явление покоя очень важно для растений, поскольку позволяет им переждать неблагоприятные условия среды. Для жизненного цикла двулетних и многолетних растений состояние покоя характерно для почек, семян и таких запасующих органов как клубни, корнеплоды и луковицы. У однолетних растений в состояние покоя переходят семена.

Различают покой физиологический и вынужденный. Причиной *вынужденного покоя* являются факторы внешней среды, которые препятствуют прорастанию семян. *Физиологический покой* зависит от физиологического состояния растения и определяется соотношением гормонов ингибиторов и активаторов. Переход растений от активного роста к физиологическому покою определяется балансом эндогенных ингибиторов (АБК) и активаторов роста (гиббереллины, цитокинины). Переход в состояние покоя семян сопровождается значительным увеличением содержания АБК. Выход из этого состояния связан с уменьшением содержания АБК и повышением уровня гиббереллинов и (или) цитокининов.

Покой семян определяется физиологическим состоянием зародыша и (или) семенной кожуры, которая содержит соответствующие ингибиторы и непроницаема для воды и газов. В окружающих семя тканях отмечается наиболее высокое содержание АБК. Семена могут сохранять жизнеспособность в состоянии покоя довольно длительное время.

Процесс развития семян обычно делится на два этапа. На первом этапе, который характеризуется интенсивным делением клеток, формируется зародыш и эндосперм. В этот период содержание АБК в тканях обычно очень низкое. После того как зародыш завершает свое развитие, происходит переключение клеток от роста делением к росту растяжением и накоплению в семени запасных соединений. В этот момент именно АБК останавливает деление клеток на этапе G_1-S , а также обеспечивает регулирование транспорта сахаров, аминокислот, белков и синтез их запасных форм.

На втором этапе происходит резкое обезвоживание семян (теряется до 90% воды). Скорость метаболических процессов постепенно замедляется, и семена переходят в состояние покоя. Содержание АБК между этими двумя стадиями обычно достигает максимального значения. АБК накапливается в формирующихся семенах двумя путями: большая часть фитогормона синтезируется и поступает из тканей материнского растения по флоэме, а меньшая часть — синтезируется в клетках зародыша и эндосперма.

Для выхода семян из покоя необходимы благоприятные внешние условия (определенные влажность, температурный и световой режимы). Обязательным условием при этом является изменение параметров не одного, а нескольких факторов внешней среды.

9.4.6. Апомиксис

Помимо типичного полового процесса растений, в котором участвуют две сливающиеся гаметы и формируется зиготический зародыш, у ряда видов встречается особый тип бесполого размножения, называемый *апомиксисом* (от греч. *apo* — без и *mixis* — смешение). При апомиксисе зародыш формируется не из зиготы, а из неоплодотворенной яйцеклетки, которая может быть гаплоидной или из-за аномалий гаметогенеза остается диплоидной. Поэтому при апомиксисе могут формироваться как гаплоидные, так и диплоидные зародыши. В случае апомиксиса зародыш может развиваться и из других гаплоидных или диплоидных клеток, ассоциированных с яйцеклеткой.

Апомиксис выявлен более чем в 300 родах из 43 семейства цветковых растений и широко встречается у многих видов ястребинок, одуванчиков, манжеток, лютиков, лапчаток, мятликов, зверобоев, ежевик и у некоторых сортов сельскохозяйственных растений — свеклы, хлопчатника, льна, табака, ячменя, пшеницы.

Образование семян путем апомиксиса может рассматриваться как особая форма бесполого размножения, поскольку генотип потомков апомиктического клона идентичен генотипу материнского растения. Апомиктические растения часто обладают морфологическими отклонениями — у них дегенерирует пыльца, редуцируются пыльники.

9.5. Вегетативный этап онтогенеза растения

Вегетативный этап развития растения включает прорастание семени или органов вегетативного размножения (клубней, луковиц) и формирование вегетативных органов (листьев, стеблей, корней). На этом этапе онтогенеза происходит новообразование клеток, тканей и органов, их активный рост и быстрое увеличение в размерах. Вегетативный период иногда делят на два этапа:

- прорастания семени;
- ювенильную стадию.

Ювенильный этап развития включает период от первого листа до заложения цветка и связан с накоплением вегетативной массы растения. В этот период развития растение не способно к цветению (т. е. ювенильно) и размножению.

9.5.1. Прорастание семени

Прорастание семян начинается при благоприятных условиях увлажнения, температуры и освещения. Этот процесс начинается с *набухания семени* и заканчивается *проклеванием* зародышевого корешка сквозь семенную оболочку. Выход из покоя

и инициация прорастания семян обусловлены увеличением уровня оводненности осевых частей зародыша и изменением баланса фитогормонов, в первую очередь таких как АБК, гиббереллины и ауксины.

Процесс набухания осуществляется благодаря повышению проницаемости семенных покровов и гидратации коллоидов и осмотически активных веществ внутри семени. Когда семена достигают критической влажности (40—60% от их сырой массы), через разорванные семенные покровы появляется зародышевый корень (фаза проклевывания). Корень выходит в почву, закрепляется в ней и начинает снабжать молодой растительный организм водой и минеральными элементами. Вода поступает в клетки семян через *аквапорины*, которые синтезируются на поздних стадиях созревания и регулируют поступление воды в клетки семян при набухании.

АБК накапливается в семенах при их созревании на материнском растении и участвует в регуляции покоя, а гиббереллины играют ключевую роль при выходе из покоя и стимуляции прорастания. При этом имеет значение не столько абсолютное содержание каждого из гормонов, сколько их соотношение. Цитокинины аккумулируются в развивающихся семенах и играют важную роль для стимуляции клеточного деления. Цитокинины также способны преодолевать ингибирующее действие АБК при прорастании семян и индуцировать их выход из покоя. Ауксины при прорастании семян переходят из связанной в свободную форму или синтезируются *de novo*. Максимальное содержание ИУК приходится на начальные этапы набухания, далее к началу видимого проклевывания оно снижается и повышается вновь уже в развивающемся проростке.

Процессы прорастания у однодольных и двудольных растений различаются. У злаков для защиты зародышевых листьев при продвижении побега через плотную почву служит *колеоптиль* — своеобразный чехол, формируемый первым видоизмененным листом. У двудольных растений дистальная часть первого междоузлия загнута крючком, с помощью которого раздвигаются частицы почвы.

У одних видов (дуб, горох, настурция) семядоли остаются под землей (*подземное прорастание*), и крючок формируется эпикотилем (надсемядольное колено, или первое междоузлие стебля), а у других (фасоль, подсолнечник, огурцы) семядоли выносятся на поверхность почвы (*надземное прорастание*), и крючок формируется гипокотилем (подсемядольное колено).

После того как этиолированный побег достигает поверхности почвы, включаются процессы *фотоморфогенеза*: резко замедляется рост гипокотилия у двудольных растений и мезокотилия (первое междоузлие) у злаков, усиливается рост эпикотилия и листьев. Происходит снижение содержания этилена в зоне крючка, проросток распрямляется и переходит к автотрофному типу питания.

9.5.2. Апикальная меристема побега

Основные части побега — стебель, листья, почки и цветки — формируются из апикальной меристемы побега (АМП). Хотя меристема побега и является самой верхушкой побега, она окружена и закрыта молодыми листьями, которые образуются

в результате активности меристематических клеток. Поэтому необходимо различать верхушку побега (апикальную меристему) и листовые примордии (рис. 9.9). АМП, которую также иногда называют конусом нарастания побега, представляет собой плоскую, но чаще более или менее выпуклую зону (100—300 мкм в диаметре), состоящую из небольших, тонкостенных клеток с плотной цитоплазмой, без крупной центральной вакуоли.

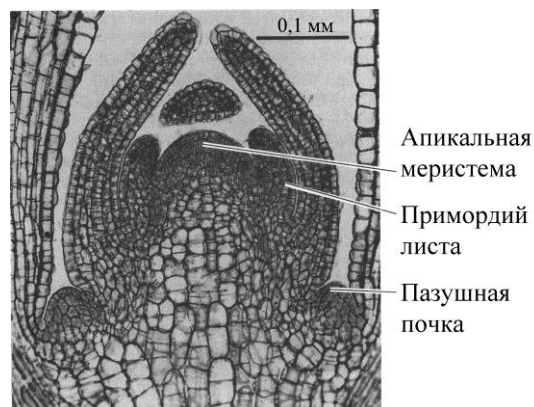


Рис. 9.9. Продольный срез верхушки побега льна (*Linum usitatissimum*) (Esau, 1960)

АМП у большинства цветковых растений насчитывает около 800—1200 клеток, у арабидопсиса их меньше — только 50—70. В апикальной меристеме выделяют *тунику* и *корпус* (рис. 9.10). Туника, как правило, состоит из двух слоев клеток (L_1 и L_2), которые делятся исключительно антиклинально, т. е. образуют перегородки перпендикулярно поверхности апекса. За счет антиклинальных делений происходит рост поверхности апикальной меристемы побега. Из верхнего слоя туники (L_1) формируется эпидерма различных органов, а из второго слоя (L_2) и более глубоко лежащих слоев — внутренние ткани побега. Меристематические клетки, находящиеся под туникой, называют *корпусом*. Клетки корпуса (слой L_3) делятся в разных направлениях, давая основу для формирования внутренних тканей побега.

Помимо клеток туники и корпуса, в апикальной меристеме побега выделяют три структурно и функционально различающиеся зоны: центральную, периферическую и стержневую, последняя в англоязычной литературе именуется как *rib meristem*. Границы между этими тремя зонами весьма условны и зависят от вида растения, внешних условий и фазы онтогенеза. Центральная зона (ЦЗ) содержит инициалы для формирования клеток туники и корпуса. Клетки центральной зоны делятся реже, чем другие клетки апикальной меристемы. Под центральной зоной лежит стержневая (сердцевинная) меристема (СМ), которая является границей между недифференцированными и дифференцированными клетками апекса побега. Ее клетки делятся с высокой скоростью и формируют внутренние ткани стебля. Клетки периферической зоны окружают центральную зону в виде кольца, поэтому ее ино-

гда называют областью инициального кольца. Здесь определяется порядок заложения примордиев листьев и пазушных почек, эта зона дает начало первичной коре и прокамбию. Именно деление клеток сердцевинной меристемы и периферической зоны является основой для роста стебля вверх.

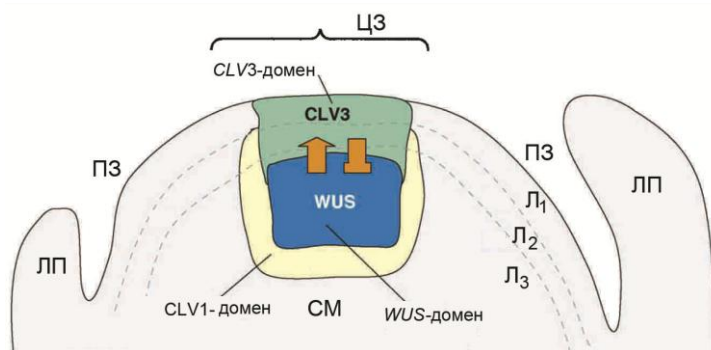


Рис. 9.10. Схема строения апикальной меристемы побега и зоны экспрессии генов, контролирующих пролиферацию клеток (по Fiers et al., 2007, с изменениями): Л₁, Л₂ — слои туники; Л₃ — слой корпуса; ЦЗ — центральная зона; ПЗ — периферическая зона; СМ — стержневая меристема; ЛП — листовой примордий. Стрелками показаны взаимодействие и зоны (домены) экспрессии генов *WUS* и *CLV*

Зона растяжения у побегов достигает больших размеров (несколько сантиметров) по сравнению с корнями. Рост клеток стебля растяжением контролируется гиббереллинами и ауксинами. Утолщение стебля у двудольных растений происходит за счет деятельности клеток камбия, для активации которого необходим ауксин, поступающий из верхушки побега.

В течение вегетативного развития в АМП постоянно идет формирование новых меристематических клеток и листовых зачатков. При переходе к репродуктивному этапу развития в апексе начинают формироваться флоральные меристемы. Следует отметить, что судьба клеток в апикальной меристеме побега так же, как и корня, зависит от их положения по отношению к соседним клеткам. И, если меристематическая клетка будет повреждена, ее функции берет на себя другая.

У многих однодольных растений в основании каждого междоузлия имеются группы клеток, называемые *интеркалярными* (т. е. вставочными) *меристемами*, которые способны делиться и расти растяжением. Такой локальный участок меристемы в вытягивающемся междоузлии может сохранять способность к росту даже после того, как закончится его удлинение.

Этапность развития и характер дифференцировки клеток в АМП находятся под контролем различных генов. За пролиферацию клеток меристемы отвечают ген *WUSHEL* (*WUS*) и комплекс генов *CLAVATA* (*CLV1*, *CLV2*, *CLV3*). Регуляция дифференцировки клеток осуществляется генами *SHOOTMERISTEMLESS* (*STM*), *KNOTTED* (*KNAT1*), *ASYMMETRIC LEAVES* (*AS*) и др.

Экспрессия гена *WUS* необходима для формирования нормальной апикальной меристемы побега в эмбриогенезе и поддержания пролиферации клеток в центральной зоне АМП в процессе вегетативного и генеративного растения.

Ген *CLV3* кодирует сигнальный пептид, который регулирует соотношение между делением и дифференцировкой клеток в АМП и флоральных меристемах (см. разд. 8.10). Рецептором *CLV3* являются белки *CLV1* и *CLV2* (см. рис. 8.40). *CLV3* синтезируются в верхних клетках центральной зоны АМП и транспортируются в нижележащие слои, где взаимодействуют со своими рецепторами. После связывания *CLV3* с рецептором происходит автофосфорилирование *CLV1* и дальнейшая передача сигнала, приводящая к подавлению экспрессии генов *WUS*.

На рис. 9.10 можно видеть, что экспрессия гена *CLV1* приурочена к двум слоям (L_2 и L_3) центральной зоны АМП, в то время как экспрессия *CLV3* наблюдается во всех трех слоях (L_1 , L_2 и L_3). Ген *WUS* экспрессируется только в слое L_3 центральной зоны.

Из апикальной меристемы развиваются все типы побегов, которые состоят из метамеров (фитомеров). Каждый метамер обладает относительной автономностью и представляет собой элементарную единицу побега, включающую лист, узел, междоузлие и боковую почку. Модульный принцип строения является характерной особенностью растительных организмов.

Вегетативные апикальные меристемы побега обычно не детерминированы в своем развитии. Их основная функция — постоянное формирование и увеличение числа фитомеров до тех пор, пока не создадутся внешние условия, вызывающие появление стимулов цветения. В этом случае вместо листьев появляются флоральные меристемы, из которых развиваются репродуктивные органы растения — цветоносы и цветки.

9.5.3. Развитие листа

Первые листовые органы растения — семядоли — формируются в зародыше, еще до возникновения апекса. Все последующие листья возникают на апексе побега в виде меристематических бугорков, или валиков, называемых листовыми зачатками, или *примордиями*.

Промежуток времени между заложением двух листовых зачатков называется *пластохроном*. Листовые зачатки образуются в апексе в строго заданной последовательности, предопределяя порядок размещения листьев на оси побега — *филлотаксис*. Филлотаксис отражает радиальную симметрию побега и является наследуемым признаком для каждого вида. Он одинаков в пределах вида, рода и даже семейства. К основным типам расположения листьев относятся спиральный и мутовчатый филлотаксисы.

Основным правилом филлотаксиса является равенство угловых расстояний между смежными листьями, что приводит к равномерному размещению листовых зачатков вокруг растущего побега. При мутовчатом листорасположении с тремя листьями

на одном узле, например у элодеи и олеандра, листовые зачатки закладываются по окружности узла так, что углы между ними равны 120° . Листья новой мутовки закладываются точно в промежутке между уже сформированными листьями. Правило равенства угловых расстояний соблюдается и при других типах филлотаксиса. Поэтому ни один лист на стебле не располагается под другим, что обеспечивает их минимальную затененность.

Формирование листовых примордиев находится под контролем гормонов и связано с изменением экспрессии ряда генов. Инициация закладки листовых примордиев происходит за счет формирования локусов повышенной концентрации ИУК по периферии АМП. Сигналом к дифференцировке является прекращение экспрессии *KNOX*-генов класса I и начало экспрессии генов *ANT* (*AINTEGUMENTA*), *AS1*, *AS2* и ряда других.

Экспрессия *KNOX*-генов подавляет синтез гиббереллинов и формирование листовых примордиев. Транскрипционные факторы, кодируемые генами *AS1* и *AS2*, а также фактор ремоделирования хроматина белок *HIRA*, связываясь с промоторами *KNOX*-генов, репрессируют их транскрипцию и запускают, таким образом, синтез гиббереллинов и формирование листа. Экспрессия гена *ANT* стимулирует пролиферацию клеток формирующихся листовых примордиев. Помимо ауксина, в формировании листа принимают участие также и другие гормоны. На рис. 9.11 показано взаимодействие фитогормонов и ряда генов, функционирующих в АМП.

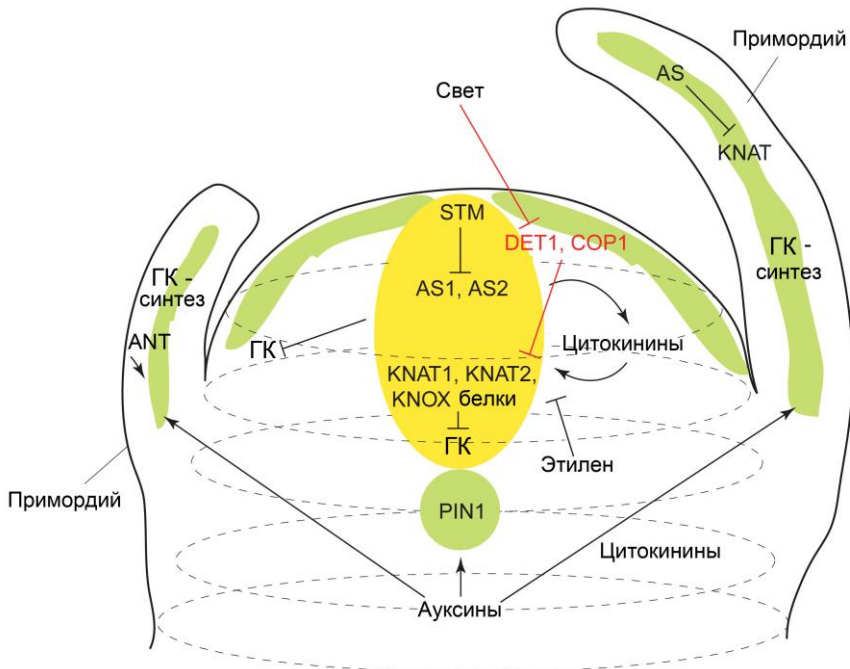


Рис. 9.11. Генетический и гормональный контроль развития апикальной меристемы побега (по Vandebussche, Van Der Straeten, 2004, с изменениями). Пояснения в тексте

В центральной зоне меристемы взаимодействие между цитокининами и *KNOX*-генами стимулирует пролиферацию клеток. Этилен подавляет эту активность. Функционирующий в центральной зоне ген *STM* снимает угнетающий эффект *AS1* и *AS2* на экспрессию *KNOX*-генов. Экспрессия *KNAT* репрессирует синтез гиббереллинов в центральной зоне АМП. Активность гена *KNAT2*, вероятно, контролируется также светом через белки *DET1* и *COP1*, кодируемые светозависимыми генами (см. разд. 10.1).

В листовых примордиях ген *STM* не экспрессируется и транскрипционные факторы *AS* подавляют экспрессию *KNAT*, что приводит к активации синтеза гиббереллинов. Экспрессия генов *ANT* активирует деление клеток примордиев листа.

Транспорт ауксина в центральную зону и к формирующимся листовым примордиям обеспечивают *PIN*-белки. В комбинации с цитокининами ИУК регулирует пролиферацию клеток меристемы, а в комбинации с гиббереллинами обеспечивает закладку и формирование листовых примордиев.

Первоначально листовая зачаток увеличивается, главным образом, за счет деления клеток и постепенно приобретает форму, характерную для взрослого листа, но остается миниатюрным, сложенным или свернутым. Затем лист разворачивается и сильно разрастается за счет деления и растяжения клеток.

Лист закладывается в результате периклинального деления клеток в периферической части апекса побега. Листовой примордий постепенно разрастается и превращается в пальцеобразный выступ (рис. 9.12). Этот выступ состоит в основном из клеток будущей средней жилки и является осью будущего листа. Собственно листовая пластинка образуется по бокам этой оси за счет так называемого краевого (маргинального) роста. На двух сторонах примордия начинает функционировать маргинальная (краевая) меристема, дающая начало всем клеткам листовой пластинки.

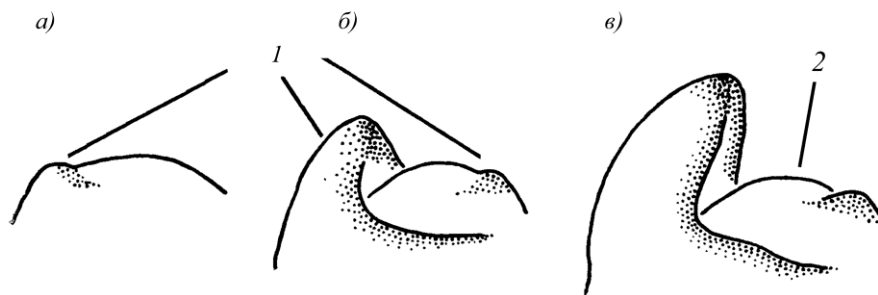


Рис. 9.12. Ранние этапы развития (а—в) листа двудольного растения на примере энотеры двулетней (*Oenothera biennis*) (Esau, 1960): 1 — примордий листа; 2 — апекс побега.

Точками отмечена локализация меристематической активности

Клетки маргинальной меристемы делятся, главным образом, антиклинально, что приводит к увеличению площади листовой пластинки. После завершения деления клетки переходят к растяжению. При разворачивании почек поверхность листьев

увеличивается в десятки и сотни раз, при этом форма листового зачатка сохраняется. У двудольных растений это происходит за счет равномерного поверхностного роста. Если нанести на листовые зачатки равномерно расположенные метки, то в процессе разрастания листьев все они раздвигаются практически одновременно (рис. 9.13).

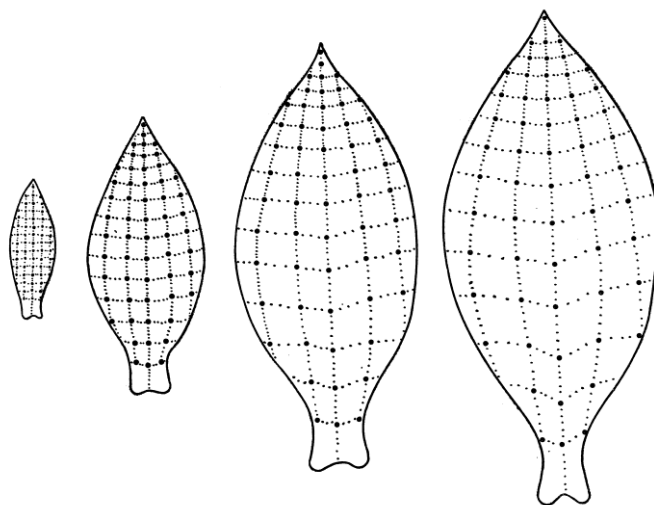


Рис. 9.13. Рост поверхности листа при разворачивании почки у табака (*Nicotiana tabacum*)

9.5.4. Развитие корня

Корни приспособлены для роста в почве и поглощения минеральных элементов и воды. Выполнение именно этих функций определяет структуру корневой системы растений (см. рис. 4.8). Корень является осевым органом, обладающим радиальной симметрией. В корне выделяют пять зон: корневой чехлик, апикальную меристему, зону растяжения, зону корневых волосков и проводящую зону. Клетки *корневого чехлика* защищают меристему от повреждения. Функция *апикальной меристемы* заключается в том, чтобы обеспечивать рост корня за счет постоянного деления клеток. *Зона растяжения* включает клетки, которые увеличиваются в размерах за счет роста растяжением. После деления и растяжения клетки дифференцируются в *зоне корневых волосков*.

В центре меристемы корня арабидопсиса находится группа клеток, составляющая его покоящийся центр. Эти клетки часто называют центральными (см. рис. 9.4). Вокруг них располагаются клетки-инициали, из которых развиваются все ткани корня. Одни из них дают начало чехлику и эпидерме, другие — коре, третьи — тканям стелы. Клетки покоящегося центра подавляют дифференцировку окру-

жающих клеток-инициалей, постоянно поддерживая их в инициальном состоянии. При образовании корня клетки-инициали возникают из клеток покоящегося центра.

Наибольшее значение в регулировании процессов роста и развития корня имеет содержание и полярный транспорт ауксина. Благодаря различной локализации белков семейства PIN возможен полярный транспорт ауксина в разных направлениях. В кончиках корней PIN1, PIN4 и PIN7 направляют ауксин вниз по стели, переносчик PIN3 перераспределяет потоки ауксина в латеральном направлении, а локализованный в верхней части клеток коры и эпидермиса PIN2 направляет ауксин наверх, задавая базипетальное направление транспорта ИУК (рис. 9.14). Поэтому в апикальной меристеме корня направление полярного транспорта ауксина имеет форму перевернутого зонтика.

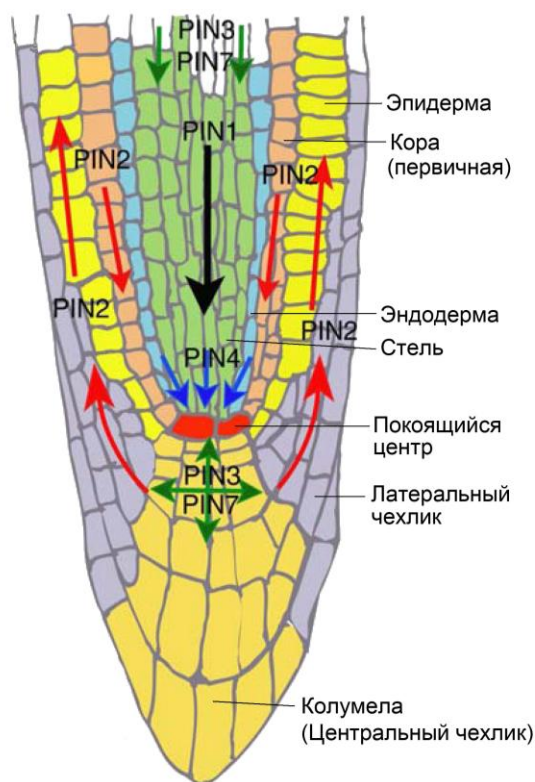


Рис. 9.14. Полярные потоки ауксина в кончике корня арабидопсиса, контролируемые белками-переносчиками PIN1, PIN2, PIN3 и PIN4 (по Dhonukshe et al., 2005).

Стрелками указано направление транспорта ИУК

Несмотря на то, что удлинение первичного корня ИУК подавляет в концентрациях больших, чем 10^{-9} М, этот гормон необходим для образования боковых и адвентивных корней. Боковые корни обычно закладываются из клеток перцикла выше

зоны растяжения и зоны корневых волосков. Ауксин влияет на образование боковых корней, стимулируя деление клеток перикабла. В растениеводстве этот эффект ауксина часто используется для укоренения черенков.

9.5.5. Дифференциация сосудов

Дифференциация сосудов индуцируется и ориентируется потоком сигналов, главным из которых является ауксин. Новые сосудистые ткани формируются прямо под развивающимися почками и молодыми листьями, которые являются источником ИУК. Формирование сосудов идет полярно. Поэтому предполагают, что регулирование процесса формирования сосудов осуществляется ауксином, транспорт которого в растении также полярен. Способность верхушки побега инициировать образование сосудов может быть продемонстрирована в культуре ткани. Когда верхушка побега помещается на каллус, под ней начинают формироваться элементы флоэмы и ксилемы. В процессе дифференцировки камбия в элементы флоэмы или ксилемы определяющее значение имеет латеральный градиент концентрации ИУК и сахарозы.

При изучении влияния ауксина на дифференцировку флоэмных и ксилемных элементов в корнеплоде репы было обнаружено (M. Gersani, 1987), что локальное нанесение ИУК индуцирует (в месте обработки) формирование сосудов в течение двух суток. Поскольку ИУК-индуцируемая дифференцировка сосудистых элементов подавлялась триодбензойной кислотой, можно полагать, что для инициации морфогенеза важна не только определенная концентрация, но также процесс полярного транспорта ауксина. Изменяя (хирургическим путем) направление транспорта ИУК, удавалось влиять на направление и интенсивность формирования сосудов у гипокотилей фасоли (рис. 9.15). Таким образом, именно ауксин, образующийся в молодых листьях и передвигающийся в стебель, может быть сигналом для формирования сосудистой системы.

Процесс формирования сосудов предполагает наличие специализированных меристем, в которых имеется популяция постоянно делящихся клеток, которые затем

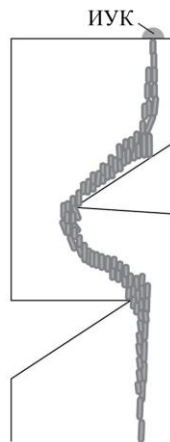


Рис. 9.15. Изменение направления и интенсивности формирования сосудов у гипокотилей фасоли *Phaseolus vulgaris* при изменении (хирургическим путем) направления полярного транспорта ИУК (Gersani, Sachs, 1984)

дифференцируются в элементы флоэмы и ксилемы. Большой прогресс в понимании этих процессов произошел:

- с открытием *HD-ZIP* III класса генов (*PHB*, *PHV*, *REV*, *ATHB8*, *ATHB15*), которые являются регуляторами как про(камбиальной) активности, так и дифференцировки клеток сосудистых элементов;
- выявлением компонентов везикулярного транспорта (*SFC/VAN3*), необходимых для паттернирования сосудов;
- генетической характеристикой ксилогенеза;
- идентификацией транскрипционных факторов и гормональных сигналов, которые управляют образованием элементов флоэмы и ксилемы.

На рис. 9.16 показаны процессы, которые контролируют формирование сосудистой системы растения. Выявлено как минимум 7 процессов, которые участвуют в формировании сосудов: 1) полярный транспорт ИУК; 2) формирование "сосудистых"

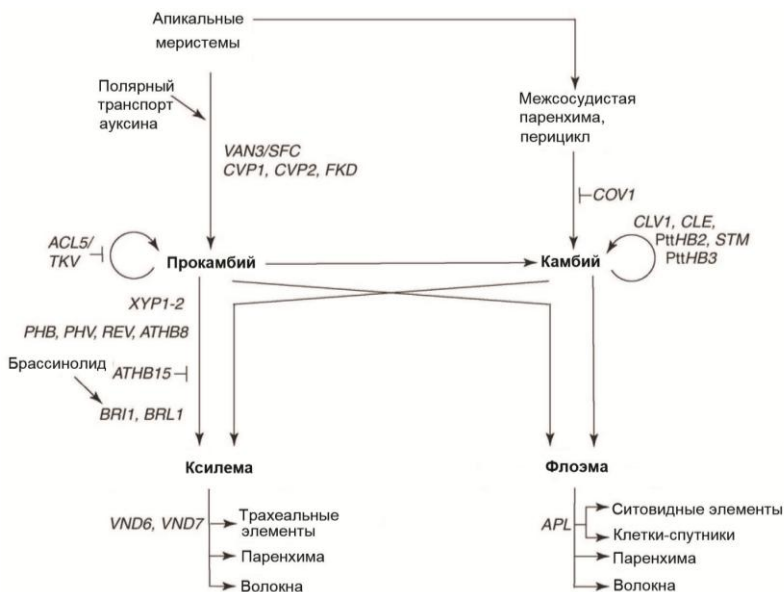


Рис. 9.16. Процессы, контролирующие формирование сосудистой системы растения (по Sieburth, Deyholos, 2006, с изменениями). *VAN3/SFC* — фактор везикулярного транспорта PIN-белков; *CVP1*, *CVP2* (*COTYLE DON VEIN PATTERN 1*) и *FKD* (*FORKE D1*) — гены, контролирующие полярный транспорт ИУК; *COV1* (*CONTINUOUS VASCULAR RING-1*) — ген, отвечающий за превращение несосудистых тканей в камбий; *CLV1* (*CLAVATA1*), *CLE* (*CLAVATA3 — LIKE*), *PttHB2* и *PttHB3* (*WUSHELL — related*) — гены, контролирующие поддержание пролиферации клеток камбия; *ACL5/TKV* — ген, отвечающий за поддержание пролиферации клеток прокамбия; *XYP1-2*, *PHB* (*PHABULOSA*), *PHV* (*PHAVOLUTA*), *REV* (*REVOLUTA*), *ATHB8* и *ATHB15* (*ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX 8* и *15*), *BRI1* (*BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1*), *BRL1* (*BRI-LIKE1*) — гены, отвечающие за дифференцировку клеток прокамбия в ксилему и флоэму; *VND6* и *VND7* (*VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN 6* и *7*) — гены, контролирующие образование элементов ксилемы; *APL* (*ALTERED PHLOEM DEVELOPMENT*) — гены, отвечающие за образование элементов флоэмы

меристем; 3) пролиферация клеток камбия; 4) пролиферация клеток прокамбия; 5) процессы дифференцировки клеток меристем в ксилему и флоэму; 6) образование элементов ксилемы; 7) образование элементов флоэмы. Процесс формирования сосудов начинается с превращения несосудистых тканей (апикальных меристем, паренхимных клеток, перицикла) в сосудистые меристемы (прокамбий и камбий). Затем следует пролиферация этих клеток и дифференцировка их в ткани ксилемы и флоэмы. На завершающих этапах дифференцировки происходит формирование всех элементов флоэмы и ксилемы.

9.6. Генеративный этап развития

Генеративный этап развития растения охватывает период от закладки органов размножения до образования гаметофитов, оплодотворения и образования зиготы. К этому моменту онтогенеза растительного организма накапливается вегетативная масса, достаточная для формирования цветков, семян и плодов.

Размножение является одним из основных свойств живого. Процесс размножения растений обеспечивает непрерывность существования вида и заключается в воспроизведении себе подобных организмов и расселении их в окружающей среде. У растительных организмов выделяют половой, бесполой и вегетативный типы размножения. В процессе *полового размножения* новый организм формируется из *зиготы*, которая образуется после слияния двух половых клеток — *гамет*. *Бесполом путем* размножаются споровые растения. При бесполом размножении новый организм образуется из спор, которые формируются на спорофите. *Вегетативное размножение* представляет собой воспроизведение нового растения из части родительского (*подробнее см. главу 11*).

Органом полового размножения у покрытосеменных растений является цветок (рис. 9.17). Растения начинают формировать генеративные органы и приобретают способность к размножению при определенных условиях внешней среды после того, как накопят необходимую вегетативную массу. После инициации генеративного этапа развития в апикальных меристемах вместо примордиев листьев начинают закладываться цветочные почки, содержащие зачатки органов цветка (рис. 9.18).

Цветок представляет собой совокупность соматических (стерильных) и репродуктивных (фертильных) частей. К стерильным частям относятся *чашелистики*, образующие чашечку, и *лепестки*, образующие венчик. Чашечка и венчик называются *околоцветником*. Репродуктивные органы цветка включают *андроцей* (совокупность тычинок) и *гинецей* (совокупность плодолистиков). Мужская гаметофитная фаза включает формирование пыльцевых зерен в пыльнике и прорастание пыльцевой трубки (*см. разд. 9.6.4*). Формирование женского гаметофита (зародышевого мешка), образование яйцеклетки, оплодотворение и развитие нового спорофита (зародыша) происходят в гинецее на родительском спорофите (*см. разд. 9.6.3 и 9.4*).

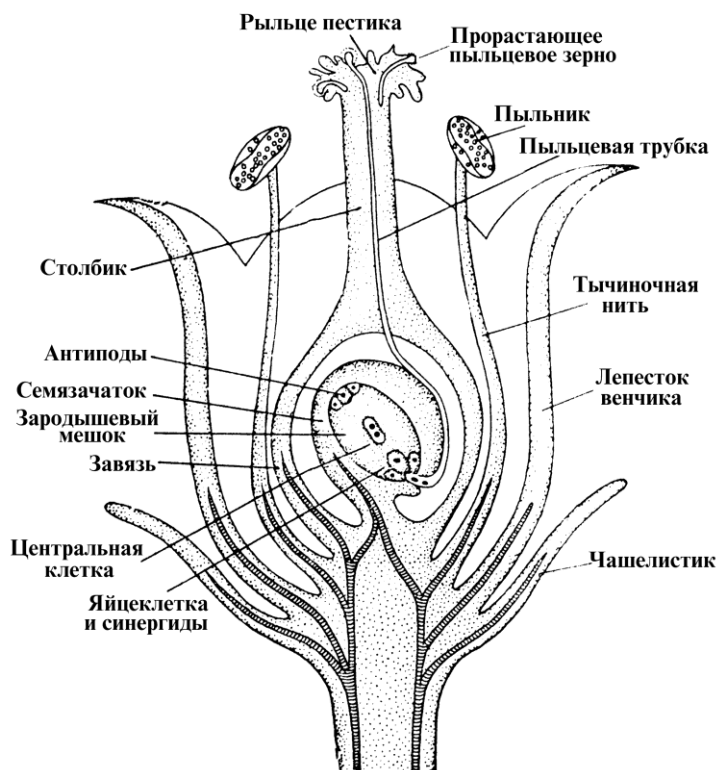


Рис. 9.17. Строение цветка



Рис. 9.18. Строение апикальной части генеративного побега *Arabidopsis thaliana* (Taiz, Zeiger, 1998)

Цветки как органы полового размножения могут быть обоеполыми или раздельнополыми. Если раздельнополые (т. е. или мужские, или женские) цветки формируются на одном растении, такие виды называют *однодомными*. В том случае, когда раздельнополые цветки формируются на разных особях, такие растения называют *двудомными*. Двудомных видов растений сравнительно мало, к ним относятся многие растения семейства *Salicaceae*, например, тополь (*Populus*) и ива (*Salix*), а также другие растения — конопля (*Cannabis sativa*), хмель (*Humulus lupulus*), шпинат (*Spinacia olerifera*), морозка (*Rubus chamaemorus*).

Формирование пола цветка определяется условиями среды и зависит от таких факторов, как фотопериод, температура, интенсивность и спектральный состав света. Регуляция пола у раздельнополых растений контролируется фитохромом и зависит от гормонального баланса растения.

Процесс цветения включает несколько этапов:

1. Индукция цветения или перцепция флорального стимула эндогенной или экзогенной природы.
2. Транспорт флорального стимула.
3. Эвокация цветения — необратимые процессы, происходящие в апикальной меристеме побега, которые приводят к формированию репродуктивных органов.
4. Формирование цветковых меристем.
5. Формирование органов цветка.
6. Формирование женского (зародышевый мешок с яйцеклеткой) и мужского (пыльца) гаметофитов.

Процессы развития цветка регулируются тремя группами генов. К первой группе относятся гены, которые определяют время индукции цветения; их активность контролируется сигналами внешней и внутренней среды. Вторая группа генов, называемая *генами идентичности меристем*, отвечает за формирование флоральной меристемы. Третья группа генов — *гены идентичности органов цветка* отвечает за формирование органов цветка.

9.6.1. Инициация цветения

Для растительных организмов очень важно сформировать семена при наиболее благоприятных для этого климатических условиях. Поэтому большинство растений, ориентируясь на определенные условия внешней среды, способны переходить от вегетативного роста к цветению только в определенное время года.

Факторы инициации цветения делятся на эндогенные (внутренние) и экзогенные (внешние). Внешними факторами, индуцирующими переход к цветению, являются фотопериод и температура. К эндогенным факторам цветения относятся возраст растения, вегетативная масса, содержание фитогормонов (в первую очередь гиббереллинов) и сахаров.

Под воздействием этих внешних и внутренних факторов в листьях образуется так называемый флоральный стимул (*флориген*), который передвигается по флоэме в апикальную меристему побега, где инициирует формирование цветка. Эта гипотеза впервые была предложена в 1937 г. М. Х. Чайлахяном.

У растений арабидопсиса выявлено около 80 генов, продукты которых влияют на процесс перехода к цветению. К ним относятся фитохромы и криптохромы, ферменты синтеза гиббереллинов, элементы рецепции и передачи флорального сигнала, транскрипционные факторы и др. Выделяют 4 типа сигнальных путей, которые могут инициировать начало цветения: фотопериодический, холододовой, гиббереллиновый и автономный (рис. 9.19).

Фотопериодический путь инициации цветения. Важнейшим фактором, который влияет на переход растительного организма к генеративному этапу развития, является *фотопериод*, т. е. относительная продолжительность светлого и темного времени суток. Понятия "фотопериод" и "фотопериодизм" были введены в 1920 г. У. Гарнером и Г. Аллардом (W. Garner и H. Allard). Они впервые установили, что для многих видов растений фотопериод является важнейшим фактором, который влияет на процессы роста, развития и особенно цветения растений. Это явление было названо *фотопериодизмом*.

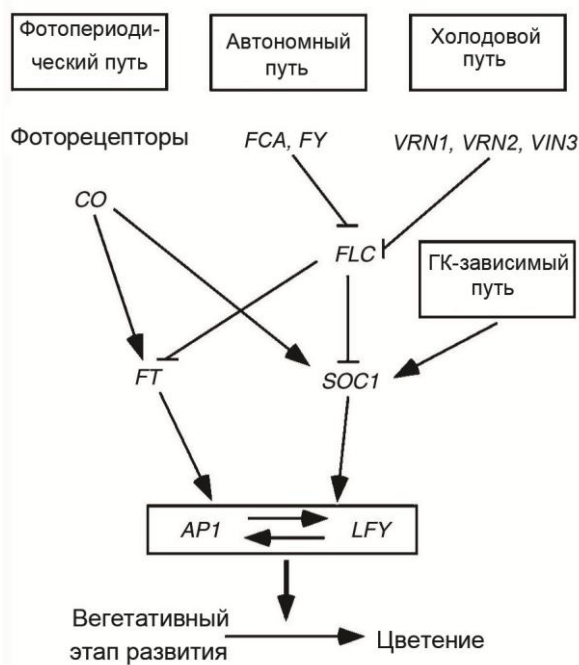


Рис. 9.19. Четыре типа сигнальных путей, инициирующих цветение (по Lee et al., 2006, с изменениями). Пояснения в тексте

Растения, у которых цветение индуцируется "коротким днем", называют *короткодневными*. В том случае, когда зацветанию благоприятствуют "длинные дни", растения называют *длиннодневными* (рис. 9.20). Виды растений, у которых "длина дня" не оказывает существенного влияния на цветение, называют *нейтральными* (к длине дня). У длиннодневных растений 100%-е зацветание наблюдается при продолжительности светового периода от 11 до 24 ч в сутки, у короткодневных — при длине дня от 6 до 15 ч. Главную роль в восприятии фотопериодического стимула играют фоторецепторы синего и красного света, соответственно, криптохромы и фитохромы (см. главу 10).

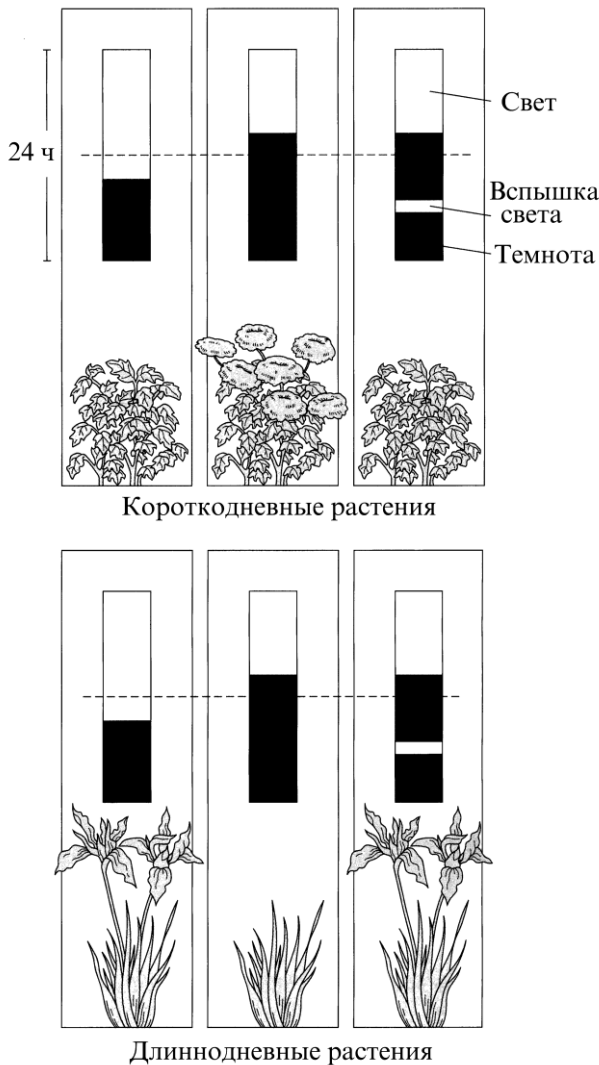


Рис. 9.20. Фотопериодическая регуляция цветения коротко- и длиннодневных растений (Taiz, Zeiger, 1998)

Одним из основных элементов, который определяет время цветения, является фактор транскрипции, который кодируется геном *CONSTANCE* (*CO*) — ключевым геном в фотопериодической индукции цветения. Именно с помощью фактора транскрипции *CO* осуществляется перцепция длины дня. Экспрессия *CO* осциллирует в циркадном режиме, а мутант *co* не зацветает при создании необходимого фотопериода. Белок *CO* очень нестабилен и при недостатке света быстро разрушается. Только при "длинном дне" его экспрессия повышается настолько, что белка накапливается в листе достаточно для активации экспрессии последующих генов и переходе к цветению. Одним из таких генов является *FLOWERING LOCUS T* (*FT*). Индуктивный фотопериод приводит к резкому повышению экспрессии *FT* в клетках-спутниках флоэмы (рис. 9.21). Сверхэкспрессия *FT* (независимо от фотопериода) приводит к быстрому зацветанию. Все эти факты указывают, что именно *FT* является тем *флоригеном*, существование которого предположил М. Х. Чайлахян еще в 1937 г.

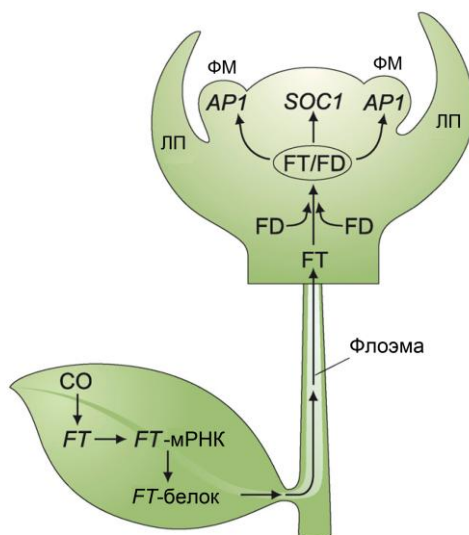


Рис. 9.21. Сигнальные функции белка *FT* (флоригена) в растении (по Zeevaart, 2008): ЛП — листовые примордии; ФМ — флоральные меристемы. Пояснения в тексте

После синтеза в листе *FT* передвигается в апикальную меристему побега, где образует гетеродимер с bZIP-типом фактором транскрипции *FD* (*FLOWERING LOCUS D*). Главными мишенями *FT/FD* являются ген *SOC1* (*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1*) и ген *AP1* (*APETALA1*). Повышение экспрессии *SOC1* активирует ген *LFY* (*LEAFY*), кодирующий транскрипционный фактор, который определяет переход апикальной меристемы побега во флоральную меристему. Экспрессия гена идентичности цветковых меристем *AP1* запускает процессы формирования органов цветка.

Холодовой путь инициации цветения. Важным внешним фактором, влияющим на цветение, являются низкие положительные температуры. Воздействие последних в течение определенного времени (*яровизация*, или *вернализация*) необходимо для формирования флорального стимула у *озимых форм растений* и способствует последующему ускорению их развития и зацветания. Растения, не нуждающиеся в яровизации, называют *яровыми*. Впервые сравнительное изучение развития яровых и озимых форм культурных злаков было проведено в 1918 г. Г. Гаснером (G. Gassner). Он установил, что озимая рожь зацветает, если во время прорастания или на стадии проростка находится в условиях низких положительных температур. Цветение же яровой формы ржи не зависит от температурных условий во время ювенильного этапа развития.

Для яровизации (вернализации) необходимыми условиями являются: наличие делящихся клеток (в зародыше, апикальных меристемах, молодых листьях) и холодовая обработка в диапазоне температур от 1 до 5 °С в течение 1—3 мес. Для растений южных широт эти температуры могут превышать 10 °С. У некоторых растений, например *Arabidopsis thaliana*, могут яровизироваться как семена, так и проростки. В некоторых случаях эффект низких положительных температур может имитироваться рядом других воздействий.

Ключевым геном, который определяет потребность растений арабидопсиса в яровизации и контролирует инициацию цветения холодом, является ген *FLOWERING LOCUS C (FLC)*. Этот ген экспрессируется в апикальных меристемах побега и корня. Продукт *FLC*, который относится к MADS-семейству ТФ, является основным репрессором цветения (см. рис. 9.19).

При яровизации активируется экспрессия гена *VERNALIZATION INSENSITIVE 3 (VIN3)*, а также *VERNALIZATION 1, 2 (VRN1 и VRN2)*, что приводит к "замолканию" гена *FLC*. Следует отметить, что подавление экспрессии *FLC* осуществляется эпигенетическим путем — под действием низких температур происходит ремоделирование (метилование) хроматина в области гена *FLC* и его замолкание, которое сохраняется в ряду поколений. После "замолкания" гена-репрессора *FLC* запускается программа формирования цветка.

Автономный путь инициации цветения. В этом пути индукции цветения участвуют такие гены, как *FCA (FLOWERING TIME CONTROL LOCUS A)*, *FY (FLOWERING LOCUS Y)* и др., мутации в которых вызывают задержку цветения независимо от фотопериода (см. рис. 9.19). Продукты генов автономного пути ускоряют зацветание, подавляя экспрессию гена *FLC*.

Гиббереллиновый путь. Установлено, что гиббереллины способны стимулировать превращение генеративной меристемы в цветковую. Гиббереллин-зависимый путь инициации цветения становится основным в условиях короткого дня (см. рис. 9.19). Гиббереллин индуцирует цветение, активируя транскрипцию гена *LFY*, который является ключевым на втором этапе развития цветка — на этапе детерминации флоральной меристемы.

Завершается процесс инициации цветения *эвокацией* — необратимыми процессами, происходящими в апикальной меристеме побега, которые приводят к формиро-

ванию репродуктивных органов растения. В процессе эвокации возрастает частота деления клеток в меристеме, увеличивается ее объем и изменяется форма (меристема приобретает куполообразную форму), дифференцировка клеток меристемы побега необратимо направляется по генеративному пути развития. Органы цветка на стадии эвокации морфологически еще не выявляются. Эвокация считается завершенной, когда апикальная меристема "обречена" сформировать цветок, что легко выявляется различными воздействиями, предотвращающими цветение. Как только эти воздействия становятся неэффективными, этап эвокации считается завершенным, и начинается следующая стадия морфогенеза.

Последующие этапы генеративного развития растения включают:

- формирование цветковых меристем;
- формирование органов цветка;
- гаметогенез.

9.6.2. Формирование флоральных меристем

За превращение генеративной меристемы в цветковую отвечают гены идентичности меристем. У мутантов по генам идентичности меристем вместо цветков развиваются побегоподобные структуры или цветки, похожие на побеги.

Ключевую роль в формировании флоральной меристемы у арабидопсиса играет ген *LEAFY (LFY)*, который обеспечивает связь глобальных внешних событий и локальных процессов, происходящих при формировании цветка. Его экспрессия необходима и достаточна для превращения недифференцированных побегов в цветки. Аналогами *LFY* являются: у львиного зева — *RLORICAULA*, у томатов — *FALSIFLORA*, у петунии — *ABERRANT LEAF NON FLOWER*.

У растений арабидопсиса именно *LFY* является молекулярным интегратором информации, поступающей от разных путей инициации цветения (рис. 9.22). Изменения освещенности, температуры, содержания питательных веществ, а также гормонального фона напрямую влияют на экспрессию гена *LFY*. Работа *LFY* контролируется фотопериодом, зависит от яровизации и активируется гиббереллинами. Ген *LFY* кодирует транскрипционные факторы bHLH-типа, которые, образуя гомодимеры, взаимодействуют с ДНК генов-мишеней.

Важную роль в определении мест локализации транскрипции гена *LFY* играет ауксин. Его накопление в местах формирования флоральных меристем предшествует активной экспрессии *LFY*. Концентрирование ауксина в апексе необходимо для формирования проводящей системы под формирующейся флоральной меристемой.

Для проявления интегрирующих функций *LFY* необходимо функционирование гена *UFO (UNUSUAL FLORAL ORGANS)*, который, так же как и *LFY*, отвечает не только за формирование флоральных примордиев, но и за экспрессию гомеозисных генов *AP3* и *PI*.

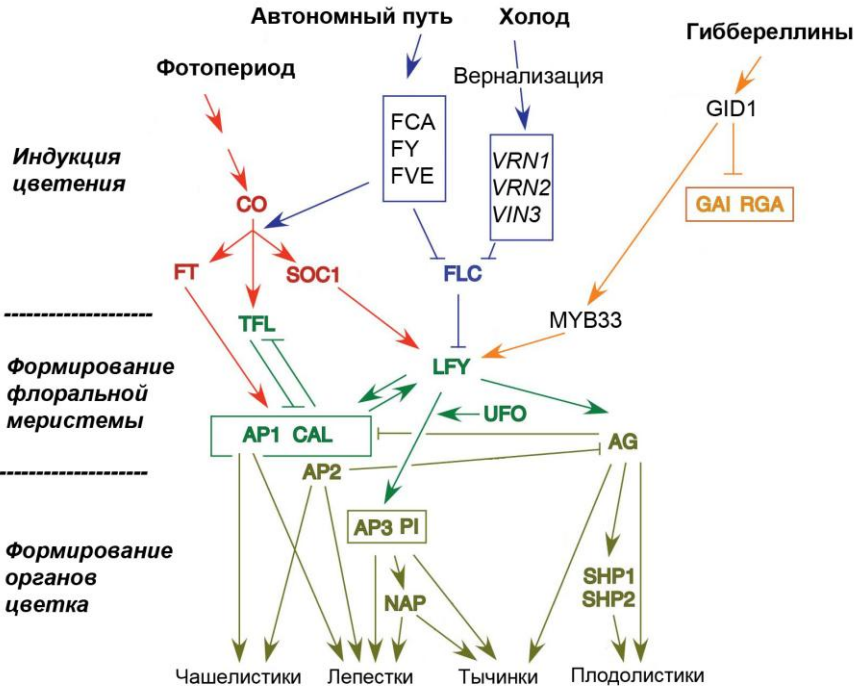


Рис. 9.22. Сигнальные пути инициации цветения, формирование флоральных меристем и органов цветка (по М. Blázquez, 2000, с изменениями): GID1 — рецептор гиббереллинов; MYB33 — ГК-зависимый фактор транскрипции; NAP (NAC-like, activated by AP3/PI), SHP1 и SHP2 (SHATTERPROOF1 и 2) — мишени ABC-генов

Геном-антагонистом *LFY* является ген *TERMINAL FLOWER1 (TFL1)* (рис. 9.22), который кодирует небольшой липофильный белок TFL1, способствующий поддержанию клеток флоральной меристемы в недифференцированном состоянии. У мутантов *tfl1* индукция цветения и формирование флоральных меристем происходит значительно раньше, чем у растений дикого типа. Ген *LFY* является негативным регулятором транскрипции гена *TFL1* в зонах формирования флоральных примордиев по периферии апикальной меристемы побега.

Еще одним геном, который участвует в формировании флоральных примордиев, является ген *AP1* и его паралог — ген *CAULIFLOWER (CAL)*. *AP1* кодирует MADS-домен содержащие факторы транскрипции, мишенями которых являются гены индукции цветения (в частности *SOC1*), а также гены, отвечающие за развитие органов цветка (*AP3* и *PI*). Ген *CAL*, который является паралогом *AP1*, дублирует его функции. Гены *AP1* и *CAL* (как и *LFY*), подавляют транскрипцию гена *TFL1* по периферии АМП, поддерживая необходимый уровень экспрессии *LFY*, который, в свою очередь, активирует работу *AP1* и *CAL*.

9.6.3. Формирование органов цветка

Цветковые меристемы дают начало четырем органам цветка: чашелистикам, лепесткам венчика, тычинкам и плодолистикам (пестику). После образования цветковой меристемы активируется третья группа генов — гены идентичности органов цветка (см. рис. 9.22). Именно эта группа гомеозисных генов контролирует процессы формирования органов цветка. У растений арабидопсиса выявлено (J. L. Bowman et al., 1989; D. Weigel, E. M. Meyerowitz, 1994) пять различных генов, экспрессия которых определяет специфичность будущего органа цветка: *APETALA1* (*AP1*), *APETALA2* (*AP2*), *APETALA3* (*AP3*), *PISTILLATA* (*PI*) и *AGAMOUS* (*AG*). Мутации по этим генам приводят к трем различным фенотипам. У мутантов по гену *AP2* вместо чашелистиков формировались плодолистики (пестики), а вместо лепестков — тычинки. Мутации в генах *PI* и *AP3* приводили к образованию лепестков вместо тычинок и чашелистиков вместо плодолистиков (карпел). Мутации по гену *AG* вызывали образование лепестков вместо тычинок и чашелистиков вместо плодолистиков (карпел). На рис. 9.23 приведены фотографии дикого типа цветков арабидопсиса, имеющего все органы, и тройного мутанта по генам *AP2*, *PI* и *AG*, у которого вместо органов цветка образуются листья.

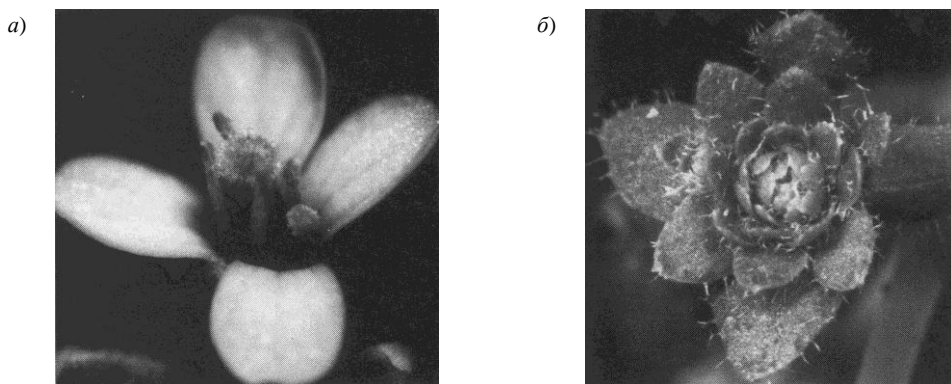


Рис. 9.23. Фенотипическое проявление тройной мутации — *apetala2*, *pistillata* и *agamous* у арабидопсиса (Weigel, Meyerowitz, 1994): *a* — цветок дикого типа; *б* — цветок тройного мутанта ABC

Генетический анализ этих мутаций показал, что гомеозисные гены, контролирующие процессы формирования органов цветка, разделяются по гомеозисным функциям А, В и С. Функция А связана с проявлением активности генов *AP1* и *AP2*, функция В определяется экспрессией генов *AP3* и *PI*, а функция С зависит от активности гена *AG*. Эти положения легли в основу модели генетического контроля формирования органов цветка, названной ABC. Согласно этой модели для формирования четырех органов цветка (чашелистиков, лепестков, тычинок и плодолистиков (пестика) вполне достаточно трех гомеозисных функций, которые были названы А, В и С.

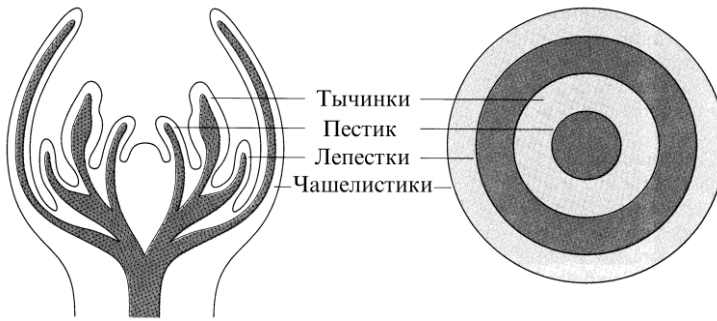


Рис. 9.24. Схема закладки органов цветка из флоральной меристемы двудольного растения (Sussex, 1989)

Все органы цветка закладываются, как мутовки, т. е. расположены в виде концентрических кругов вокруг цветковой меристемы (рис. 9.24).

На рис. 9.25 показано, каким образом проявление трех гомеозисных функций определяет развитие органов цветка. В первой мутовке в результате гомеозисной активности А формируются чашелистики (Ч). Совместное действие активностей А и В во второй мутовке приводит к формированию лепестков (Л). В третьей мутовке при взаимодействии гомеозисных функций В и С появляются тычинки (Т). И, наконец, из-за проявления гомеозисной активности С в четвертой мутовке формируются плодолистики (пестик, П). Модель предполагает, что гомеозисные функции А и С являются антагонистами. Поэтому при проявлении активности генов, определяющих функцию А (в 1-й и 2-й мутовках), функция С подавляется. С другой стороны, при активации генов, определяющих функцию С (в 3-й и 4-й мутовках), подавляется активность генов, определяющих функцию А.

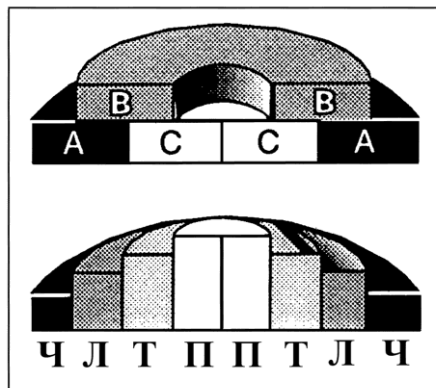


Рис. 9.25. ABC-модель развития цветка (Parcy et al., 1998): Ч — чашелистики; Л — лепестки; Т — тычинки; П — пестик

Однако оказалось, что одновременная эктопическая экспрессия АВС-генов не превращает листья в органы цветка. Это объясняется тем, что для регуляции генов-мишеней, участвующих в дальнейшем формировании цветка, продукты генов АВС-класса должны сформировать белковый комплекс с продуктами группы генов, названных классом Е. Установлено, что продукты генов класса Е стабилизируют и связывают белки, которые отвечают за транскрипцию генов, контролирующих последующую дифференцировку клеток флоральных меристем. У арабидопсиса эту функцию выполняют гены *SEP1*, 2, 3, 4 (*SEPALLATA1*, 2, 3, 4). Таким образом, продукты генов класса Е необходимы для образования функционально-активных комплексов белков, кодируемых АВС-генами. Поэтому к традиционной модели АВС была добавлена функция Е (рис. 9.26).

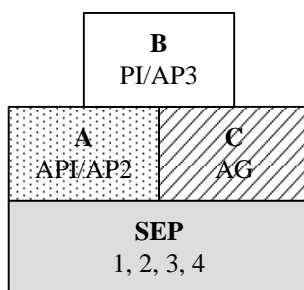


Рис. 9.26. АВСЕ-модель развития цветка

9.6.4. Формирование женского гаметофита

Гаметы — репродуктивные клетки, имеющие гаплоидный, т. е. одинарный, набор хромосом и участвующие в половом размножении. При слиянии двух гамет образуется *зигота*, развивающаяся в организм, который наследует признаки обоих родительских организмов, продуцировавших гаметы.

Гинецей (лат. *Gynoeceum*) является той частью цветка, в которой происходит женский гаметогенез. После оплодотворения гинецей разрастается в плод с семенами. Гинецеем называют совокупность *плодолистиков* (*carpellum*) — листовидных органов, формирующих один или несколько семязачатков. Цветок может иметь один или несколько плодолистиков (карпелл). По отношению к гинецею используют также давно укоренившийся термин *пестик*, однако многие анатомы этот термин считают излишним.

Сросшиеся плодолистики образуют *завязь* — нижняя вздутая часть с гнездами для семяпочек, выше которой формируются *столбик* и *рыльце* (см. рис. 9.17). В завязи на внутренней стороне плодолистиков формируются бугорки, которые развиваются в *семязачатки* (семяпочки). Часть завязи, на которой возникает и остается прикрепленным семязачаток (вплоть до созревания), называется *плацентой*. После опыления и оплодотворения завязь превращается в плод, а семязачатки в семена.

Женский гаметофит, называемый также *зародышевым мешком*, формируется внутри завязи (см. рис. 9.5). Он включает *яйцеклетку*, две *синергиды*, *антиподы* и диплоидную *центральную клетку*.

Местом образования женского гаметофита и мегаспор является *семязачаток*, который возникает на плаценте в виде выроста, состоящего из однородных меристематических клеток. Спустя некоторое время в апикальной части семязачатка появляется одна (или несколько) спорогенных клеток, из которых формируется материнская клетка мегаспор — *мегаспороцит*. Затем начинают закладываться внутренний и наружный интегументы, постепенно окружая нуцеллус. Одновременно происходит формирование зародышевого мешка. Развитие интегументов завершается, когда зародышевый мешок готов к оплодотворению.

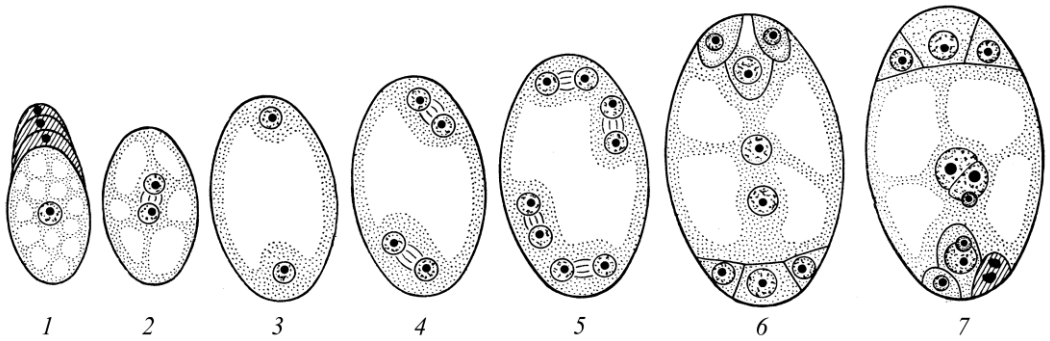


Рис. 9.27. Схема развития женского гаметофита *Polygonium*-типа: 1 — мегаспора; 2—3 — первое деление ядра мегаспоры; 4 — второе деление, четырехядерная стадия развития женского гаметофита; 5 — третье деление, восьмиядерная стадия; 6 — зрелый семиклеточный женский гаметофит (в нем различаются яйцевой аппарат, состоящий из яйцеклетки и двух синергид, центральная клетка с двумя полярными ядрами и три антиподы); 7 — двойное оплодотворение (слияние спермиев с ядром яйцеклетки с объединившимися ядрами центральной клетки). Одна из синергид дегенерирует (заштрихована), в ней видны остатки содержимого пыльцевой трубки

Процесс мегаспорогенеза идет внутри нуцеллуса. Из *мегаспороцита*, имеющего диплоидный набор хромосом, путем мейотического деления возникают четыре гаплоидные, линейно расположенные *мегаспоры*. У большинства растений лишь одна из них продолжает развитие, а остальные три отмирают (рис. 9.27). Затем единственная мегаспора сильно увеличивается в размерах, трижды делится и дает начало зародышевому мешку. Вначале зародышевый мешок представляет собой 8-ядерную клетку, у которой в каждом из двух полюсов расположено по три ядра, а два ядра остаются в центре. Затем происходит превращение 8-ядерной клетки в 7-клеточный зародышевый мешок. Три клетки, сформированные на микропиллярном конце, образуют *яйцевой аппарат*, состоящий из яйцеклетки и двух синергид. Три клетки противоположного полюса получили название *антипод*. Между этими

двумя группами располагается крупная *центральная клетка* с двумя гаплоидными полярными ядрами. Последние могут сливаться до оплодотворения, образуя диплоидное вторичное ядро — основу будущего эндосперма.

9.6.5. Формирование мужского гаметофита

Мужской гаметофит цветковых растений представляет пыльца, которая формируется в пыльниках, расположенных на тычинках (см. рис. 9.1). *Андроцеум* (греч. *andros* — мужчина и *oikos* — дом) называют совокупность тычинок покрытосеменного растения. Это та часть цветка, в которой происходит мужской гаметогенез.

Тычинка состоит из тычиночной нити, связника и пыльников. Зрелый *пыльник* имеет две половины, соединенные между собой *связником* — осевой частью тычинки, которая как бы является продолжением *тычиночной нити* (рис. 9.28, 9.29, *а*). В каждой половине по два *пыльцевых мешка*. Снаружи пыльник покрыт эпидермой. Под ней располагаются внутренние слои пыльника — эндотеций и тапетум (рис. 9.28, 9.29, *б*, *в*). Характерной чертой клеток *эндотеция* является наличие в клеточной стенке неравномерных утолщений. Эти утолщения, называемые *фиброзным слоем*, при подсыхании сокращаются и способствуют вскрыванию пыльника.

Самый внутренний слой в стенках пыльников — *тапетум*. Он непосредственно выстилает пыльцевое гнездо и участвует в питании созревающей пыльцы. Клетки тапетума часто бывают полиплоидными или многоядерными. У большинства растений ко времени созревания пыльцы клетки тапетума разрушаются. Уплотненные остатки цитоплазмы, называемые *трифиной*, откладываются на пыльцевых зернах в виде наружного покрытия. Основными компонентами трифины являются липиды. Именно в пыльниках идут процессы микроспорогенеза и формируется мужской гаметофит цветковых растений — *пыльца*.

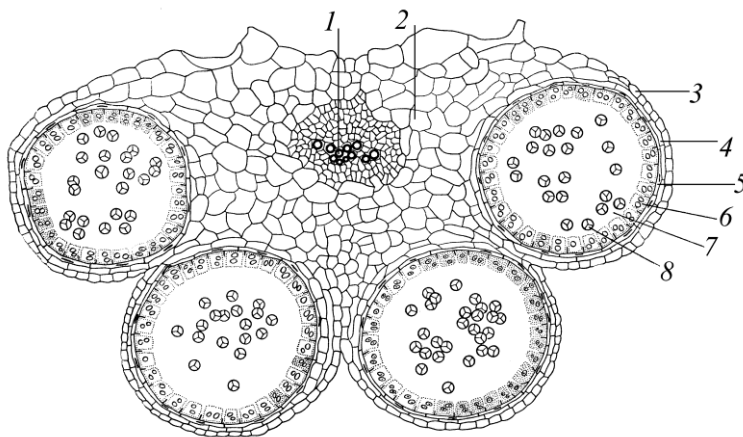


Рис. 9.28. Поперечный срез пыльника капусты огородной (*Brassica oleracea*) (Тахтаджян, 1980): 1 — проводящий пучок; 2 — связник; 3 — эпидерма; 4 — эндотеций; 5 — средний слой; 6 — тапетум; 7 — гнездо пыльника; 8 — тетрады микроспор

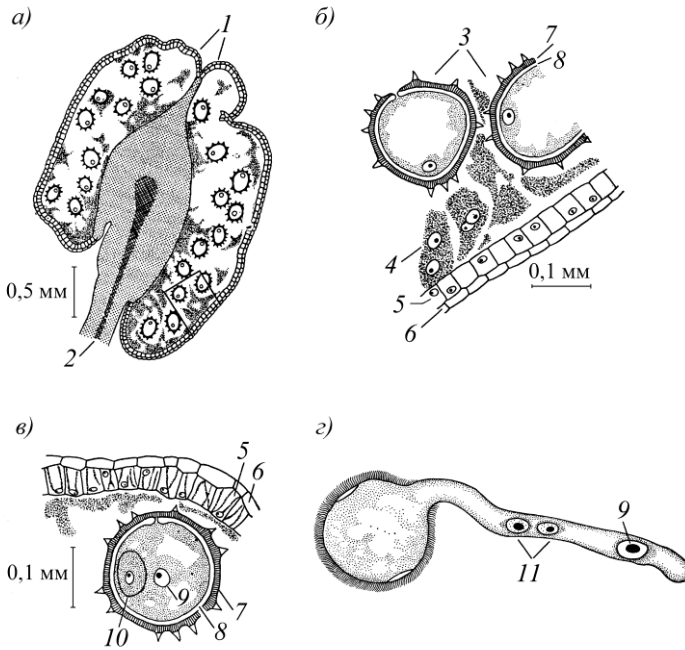


Рис. 9.29. Формирование и прорастание пыльцы: *a* — продольный срез микроспорангиев у хлопчатника (*Gossypium arboreum*); *б* — одноядерные пыльцевые зерна хлопчатника с экзиной и интиной, тапетум на стадии плазмодия; *в* — зрелые двухъядерные двухклеточные пыльцевые зерна хлопчатника; *г* — прорастание пыльцы у сирени обыкновенной. (*a*, *б*, *в* — Esau, 1980; *г* — Тутаюк, 1980.) 1 — микроспорангии (пыльцевые мешки); 2 — проводящий пучок; 3 — одноядерные пыльцевые зерна; 4 — амебоидный тапетум; 5 — эндотеций; 6 — эпидерма; 7 — экзина; 8 — интина; 9 — ядро вегетативной клетки; 10 — генеративная клетка; 11 — клетки-спермии

Микроспорогенез. В центре пыльцевых мешков имеются спорогенные клетки, из которых образуются *микроспоры* — *пыльцевые зерна*. Микроспоры возникают из материнских клеток в результате двух делений, во время которых происходит редукция числа хромосом. Клетки спорогенной ткани формируются путем мейоза, который включает два последовательных деления, следующих за одной репликацией ДНК. В результате из каждой спорогенной клетки образуются четыре гаплоидные микроспоры — *тетрада*. На первых этапах развития отдельные микроспоры, входящие в тетраду, скреплены между собой каллозой.

Следующий этап формирования мужского гаметофита связан с гидролизом каллозы, связывающей микроспоры в тетраду, и формированием оболочек пыльцевого зерна — интины и экзины (см. рис. 9.29). Внутренняя оболочка, *интина*, выглядит как тонкая пленка и состоит в основном из пектиновых веществ. Наружняя оболочка, *экзина*, представляет собой более прочную структуру, составлена из нескольких слоев и содержит специальные вещества, придающие ей устойчивость к высокой температуре и многим химическим соединениям. К наиболее характерным компо-

нентам оболочки пыльцы относятся *спорополленин* (продукт полимеризации каротиноидов), кутин и кремний. В экзине имеются небольшие утонченные участки или даже сквозные отверстия — апертуры, которые служат для выхода пыльцевой трубки.

Перед тем, как пыльца начнет высыпаться из пыльника, в ней происходит митотическое деление с образованием вегетативного и генеративного ядер, дающих начало двухклеточному гаметофиту. В результате возникают маленькая генеративная клетка и большая клетка — "клетка пыльцевой трубки". Генеративная клетка делится и образует две мужские гаметы, или спермии, либо сразу после первого митотического деления, либо после прорастания пыльцевого зерна.

9.6.6. Оплодотворение

После попадания на рыльце пестика пыльца образует пыльцевую трубку и (при наличии совместимости) начинает прорастать в направлении завязи (см. рис. 9.29, з). Средняя скорость роста пыльцевой трубки составляет несколько миллиметров в час. Ее рост сильно поляризован, будучи ограничен небольшой зоной (3—5 мкм), расположенной у кончика пыльцевой трубки, там же концентрируются вегетативное ядро и два спермия. Достигнув завязи, пыльцевая трубка через микропиле проникает в семязачаток, далее внутрь зародышевого мешка и — в одну из синергид. После этого рост пыльцевой трубки прекращается, ее кончик лопается, а содержимое (вегетативное ядро и два спермия) попадает в синергиду, которая сразу же деградирует. Вегетативное ядро и ядро синергиды превращаются в так называемые X-тельца, плазмалемма при этом разрушается. Вскоре деградирует и вторая синергида.

Далее происходит *двойное оплодотворение* — процесс, характерный для покрытосеменных и не встречающийся у голосеменных растений. Один из двух спермиев пыльцевой трубки сливается с яйцеклеткой, и образуется *зигота*, которая дает начало новому организму. Другие гаплоидные клетки зародышевого мешка после оплодотворения дегенерируют. Второй спермий сливается со вторичным (диплоидным) ядром центральной клетки зародышевого мешка, что приводит к образованию *эндосперма*. То есть эндосперм покрытосеменных растений оказывается триплоидным. Двойное оплодотворение открыл в 1898 г. русский ботаник С. Г. Навашин на двух растениях семейства лилейных — *Lilium martagon* и *Fritillaria tenella*.

9.7. Сенильный этап развития

Последний этап развития растения — *сенильный* (этап старости и отмирания) — включает период от полного прекращения плодоношения до естественного отмирания растений. Рост в этом случае обнаруживается очень редко. М. Х. Чайлахян рассматривал старение как усиливающееся с возрастом ослабление жизнедеятельности организма, приводящее, в конечном итоге, к его естественному отмиранию. *Старение* выражается в прогрессирующем нарушении синтеза макромолекул

и систем регуляции организма, накоплении токсичных и инертных в химическом отношении продуктов, постепенном угасании отдельных физиологических функций.

Сроки жизни отдельных видов растений генетически детерминированы и варьируют от нескольких недель у эфемероидов до тысячи лет и более у ряда древесных растений. Термин "старение" может быть применен не только к целому растению, но и к отдельным его органам. Пусковые механизмы старения для различных типов растений отличаются и могут вызываться как внутренними (содержание фитогормонов), так и внешними (длина дня, температурный режим) факторами. Однако, несмотря на разнообразие факторов, инициирующих старение, включение и функционирование генетических программ старения и гибели растения осуществляются о единому принципу.

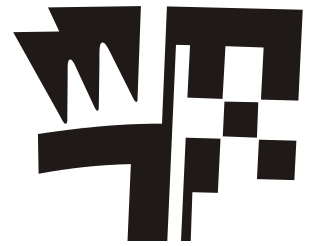
Старение представляет собой серию упорядоченных цитологических и биохимических событий. Нарушается функционирование одних органелл (хлоропласты), в то время как другие (ядро) остаются структурно и функционально активными до самых последних стадий старения. В стареющих тканях идут процессы катаболизма, которые требуют синтеза *de novo* гидролитических ферментов.

Наиболее хорошо процессы старения изучены в листьях. Программа старения листа и гибель его клеток находится под контролем генома и регулируется эндогенными и внешними сигналами. Этот процесс называют *программируемой гибелью клеток* (ПГК).

Выявлено более 800 генов, которые контролируют ПГК. Гены, экспрессия которых индуцируется при старении, называют *SAGs* (*senescence associated genes*). Продуктами этих генов являются такие гидролитические ферменты, как протеазы, рибонуклеазы, липазы. К этим генам также относятся те, которые кодируют ферменты, участвующие в синтезе этилена. Гены, экспрессия которых снижается при старении, называют *SDGs* (*senescence down-regulated genes*). К ним относятся, прежде всего, гены, которые кодируют белки, участвующие в фотосинтетических процессах.

Существование и развитие растительного организма связано с постоянной гибелью части составляющих его клеток. Программированная гибель клеток (у животных этот процесс называют *апоптозом*) играет важную роль в процессах морфогенеза и при повреждениях. За счет отмирания отдельных тканей и клеток в растении формируются сосуды флоэмы и ксилемы, защитные структуры типа корневого чехлика, некротические пятна при поражении патогеном.

В ответ на повреждение, например, патогенами в инфицированных тканях развивается *реакция сверхчувствительности* (см. раздел 14.2), которая заключается в быстрой локальной гибели клеток вместе с патогеном. То, что реакция сверхчувствительности, т. е. гибели растительных клеток генетически запрограммирована, доказывает, например, наличие мутаций типа *lls1* (*lethal leaf spot 1*) у кукурузы. Такой тип мутаций имитирует эффект инфицирования, выражающийся в реакции сверхчувствительности и появлении некротических пятен в отсутствие патогена.



Глава 10

Фотоморфогенез

Друг мой, жизнь бесконечно сложнее всего, что может вообразить человеческий ум. Мы тщетно пытаемся приблизиться к пониманию вещей, которые кажутся не более, чем житейские банальности.

А. Конан-Дойл

Растительные организмы способны использовать свет не только как источник энергии, но и как эффективный фактор, с помощью которого осуществляется регуляция процессов роста и развития растения. Наиболее существенную информационную нагрузку при этом несут красная и синяя области спектра. Характер ответных реакций зависит от длины волны света, интенсивности и направленности светового потока, продолжительности и периодичности освещения. В основе *фототропизма*, например, лежит способность растения оценивать направление светового потока (т. е. градиент освещенности) и изгибаться в направлении источника света. Процессы закладки цветочных меристем и цветения контролируются продолжительностью светового дня — *фотопериодом*. Термин "*фотоморфогенез*" объединяет процессы, которые не зависят от направления и периодичности освещения, а определяются длиной волны и интенсивностью светового потока.

Растения, выросшие в полной темноте, называются *этиолированными*. Они отличаются от растений, выращиваемых на свету, рядом морфологических и биохимических особенностей. Этиолированные растения бледно-желтого цвета (из-за отсутствия хлорофилла), отличаются сильно вытянутым побегом, недоразвитием механических тканей, листовых пластинок, устьиц и хлоропластов (рис. 10.1). Для этиолированных проростков двудольных растений характерно наличие гипокотильного (или эпикотильного) крючка, который



Рис. 10.1. Рост проростков арабидопсиса на свету (*слева*) и в темноте (*справа*) (по Nemhauser, Chory, 2002, с изменениями)

при прорастании пробивает слой почвы и предохраняет меристему побега от механических повреждений почвенными частицами. Именно благодаря процессам, происходящим при этиоляции, побег быстро выносится из почвы к свету.

Программы развития нормального зеленого растения контролируются специальными световыми реакциями, лежащими в основе *фотоморфогенеза*. Среди пигментов фотоморфогенеза особое значение имеют поглощающие красный и синий свет фоторецепторы: фитохромы, криптохромы и фототропины. Отличительной особенностью фотоморфогенетических процессов является отсутствие их прямой связи с фотосинтезом. Начальные этапы развития растения на свету не могут осуществляться за счет фотосинтеза, поскольку структурная и биохимическая основы фотосинтетического аппарата в этот период пока еще не сформированы. Для устранения эффекта этиоляции и включения процессов фотоморфогенеза достаточно ежедневного 5—10-минутного освещения растений.

10.1. Рецепция и физиологическая роль красного света

Свет является одним из наиболее важных факторов, контролирующих процессы роста и морфогенеза растений. Наиболее эффективное регуляторное действие при этом оказывает красный свет с длиной волны 650—680 нм. Свет действует как сигнал, который индуцирует переключение программы этиоляции на программу роста клеток над поверхностью почвы, на свету (рис. 10.1). Для *деэтиоляции* необходимо изменение паттерна экспрессии генов, контролирующих рост клеток в темноте, на гены, которые отвечают за развитие растения на свету. Освещение этиолированных растений приводит к снижению скорости роста стебля, распрямлению гипокотильного крючка у двудольных растений, инициации формирования хлоропластов и синтеза фотосинтетических пигментов. Для того чтобы инициировать развитие нормального зеленого полноценно развивающегося растительного организма, необходимо очень небольшое по времени и мощности световое воздействие.

Физиологические эффекты, которые вызывает облучение растений красным светом, известны достаточно давно. Помимо деэтиоляции, к процессам, которые контролируются красным светом, относятся прорастание семян некоторых видов растений, "избегание тени", закладка листовых примордиев и развитие листа, закладка цветочных почек и цветение.

Фитохром. В основе многих реакций фотоморфогенеза лежат обратимые превращения хромопротеина — фитохрома. Открытие фитохрома и создание фитохромной концепции фотоморфогенеза принадлежит американским физиологам Х. А. Бортвику и С. Б. Хендриксу (H. A. Borthwick и S. B. Hendricks) с коллегами, исследовавшими процессы прорастания семян светочувствительных сортов салата *Lactuca sativa*. Подвергая семена действию света с различными длинами волн, они обнаружили, что красный свет (КС, 660 нм) стимулирует, а дальний красный свет (ДКС, 730 нм) подавляет процесс прорастания семян салата (Borthwick et al., 1952).

При многократном чередовании КС и ДКС реакция семян салата зависела от того, какие лучи действовали последними, т. е. каждое последующее облучение снимало эффект предыдущего (рис. 10.2).

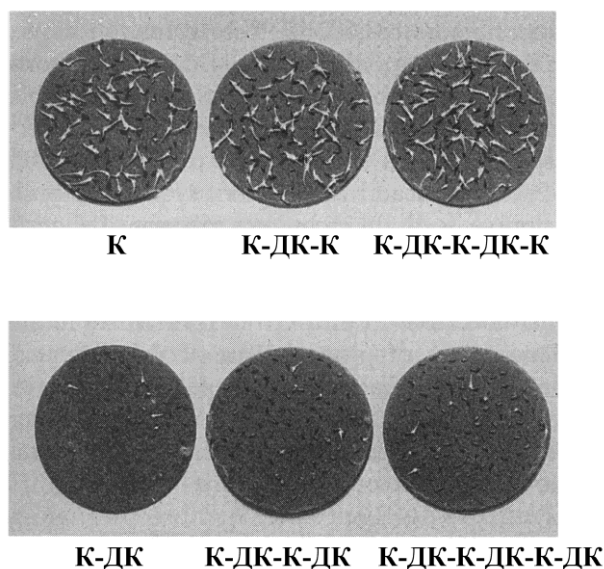
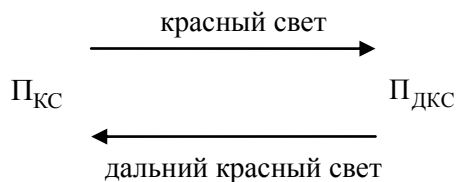


Рис. 10.2. Регуляция прорастания семян салата (*Lactuca sativa*) красным (К) и дальним красным (ДК) светом (Toole et al., 1953)

На основании этих наблюдений Х. А. Бортвик и С. Б. Хендрикс высказали предположение, что у растений существуют две формы одного и того же пигмента — $\text{П}_{\text{КС}}$ и $\text{П}_{\text{ДКС}}$, взаимное превращение которых происходит под влиянием КС и ДКС:



В 1960 г. они назвали этот пигмент *фитохромом*. В последующих исследованиях выяснилось, что фитохром играет ключевую роль во многих процессах вегетативного и репродуктивного развития, регулируемых светом. Данный белок обладает уникальным свойством: он изменяет максимум поглощения при освещении КС и ДКС за счет способности к фотопревращению. Этот хромопротеин может находиться в двух спектральных формах, имеющих разные максимумы поглощения, — $\Phi_{\text{К}}$ и $\Phi_{\text{ДК}}$ (рис. 10.3).

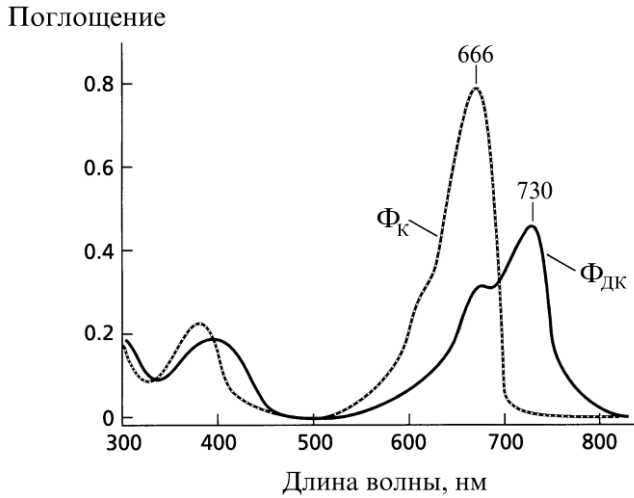


Рис. 10.3. Спектры поглощения красной (Φ_K) и дальней красной (Φ_{DK}) форм фитохрома (Vierstra, Quail, 1983)

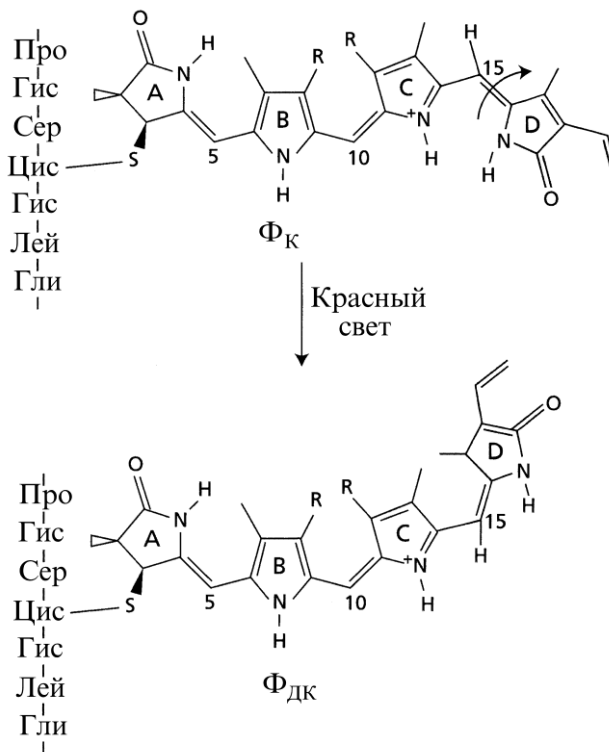
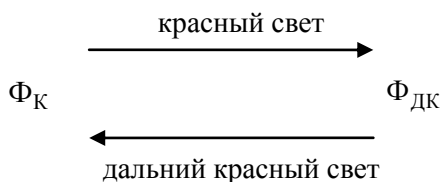


Рис. 10.4. Структурные формулы и взаимопревращения красной (Φ_K) и дальней красной (Φ_{DK}) форм фитохрома (Andel et al., 1997).

R — остаток уксусной кислоты

При освещении красным светом (650—680 нм) фитохром превращается в $\Phi_{\text{ДК}}$ -форму с максимумом поглощения 730 нм:



Облучение дальним красным светом (710—740 нм) вызывает превращение фитохрома в $\Phi_{\text{К}}$ -форму с максимумом поглощения 666 нм. В этиолированных растениях фитохром обычно присутствует в $\Phi_{\text{К}}$ -форме, имеющей синюю окраску. При облучении красным светом он превращается в $\Phi_{\text{ДК}}$ -форму сине-зеленого цвета. Физиологически активной является $\Phi_{\text{ДК}}$ -форма фитохрома. На рис. 10.4 показаны структурные формулы двух форм фитохрома и их взаимопревращения. В ответ на освещение красным или дальним красным светом происходит *цис-транс*-изомерия хромофорной группы пигмента по 15-углеродному атому.

Фитохром представляет собой растворимый белок с молекулярной массой около 250 кДа. Он состоит из двух эквивалентных субъединиц, а каждая субъединица — из двух компонентов: светопоглощающей хромофорной группы и полипептида. Апопротеин имеет молекулярную массу около 125 кДа. Хромофором фитохрома является линейная тетрапиррольная структура, называемая *фитохромобилином*. Последний присоединяется к белку тиозэфирной связью через остаток цистеина. Фитохромобилин синтезируется в пластидах, а затем транспортируется в цитоплазму, где связывается с апопротеином.

Основная роль фотопревращений фитохрома заключается в том, что растения таким образом получают информацию об изменении световых условий в окружающей среде и приспосабливаются к ним. Именно фитохром позволяет проростку, пробивающемуся из затененных условий в почве, постепенно готовиться к тем световым условиям, которые будут на поверхности. То есть фитохром является индикатором затененности и продвижения проростка из почвы на свет.

Фитохром и его фотопревращения являются основой суточных ритмов (фотопериодизма), т. е. периодических изменений интенсивности различных метаболических процессов (фотосинтез, дыхание, транспирация и др.) в ходе естественной смены световых и темновых периодов в течение суток (утро и вечер). Различная реакция светолюбивых и теневыносливых растений на условия затенения также определяется соотношением красной и дальней красной форм фитохрома в тканях растений.

Большой спектр и сложность фотоиндуцированных реакций растений, свойственных фитохромной рецепторной системе, предполагают, что должен существовать не один, а несколько фитохромов, отвечающих за различные процессы фотоморфогенеза. Фитохромы кодируются мультигенным семейством, называемым РНУ. Например, у арабидопсиса выявлено пять отдельных генов *PHYA*, *PHYB*, *PHYC*,

PHYD, *PHYE*, которые кодируют пять различных фитохромов, контролирующих процессы фотоморфогенеза. При этом функции *PhyA*, *PhyB* и *PhyC* существенно различаются.

В зависимости от интенсивности освещения различают три типа реакций, в которых участвует фитохром. Первый тип реакций наблюдается при слабом освещении, когда мощность светового потока составляет 0,1—50 нмоль $hv/(m^2 \cdot c)$. Характерная особенность этих реакций заключается в том, что ряд фитохромных эффектов может быть инициирован красным светом низкой интенсивности, однако эти эффекты не устраняются дальним красным светом. Второй тип реакций проявляется при обычном освещении (1—1000 нмоль $hv/(m^2 \cdot c)$). В таких условиях регистрируются все классические фитохромные эффекты, индуцируемые красным или дальним красным светом. Третий тип реакций вызывает красный свет высокой интенсивности, когда мощность светового потока превышает 1000 нмоль $hv/(m^2 \cdot c)$. К ним, например, относятся активация синтеза антоцианов в проростках двудольных растений, угнетение роста гипокотилия у проростков горчицы *Sinapis*, салата *Lactuca* и петунии *Petunia*, индукция цветения белены *Hyoscyamus*, распрямление гипокотильного крючка латука, активация роста семян горчицы, активация синтеза этилена у сорго *Sorghum*. Характерной чертой этих процессов является то, что их интенсивность пропорциональна мощности светового потока.

Светорегулируемые гены. Программа фотоморфогенеза включается, как только проросток выходит из почвы на свет. При освещении инициируется экспрессия светорегулируемых генов, активность которых в темноте подавлена специальными белками, являющимися ингибиторами процессов фотоморфогенеза.

Известно около 10 генов, которые кодируют белки, подавляющие полноценное развитие растения в условиях темноты. Ряд генов, кодирующих эти белки-репрессоры — *DET1*, *DET2*, *COP1*, *COP9* и *COP11*, уже секвенированы и клонированы. У мутантов по этим генам, например *cop* (*constitutive photomorphogenesis*) и *det* (*de-etiolated*), отсутствует явление этиоляции: растения имеют развернутые семядоли, не вытянутый, а короткий побег, дифференцированные, но не содержащие хлорофилла хлоропласты (синтез хлорофилла, как известно, без света невозможен). Эти эффекты объясняются тем обстоятельством, что у мутантных растений нарушен синтез белков-репрессоров светозависимых генов. У нормальных же растений эта репрессия снимается при освещении. Одним из таких белков-репрессоров является, например, *COP1*. В темноте этот белок накапливается в ядре и функционирует как репрессор транскрипции генов, участвующих в фотоморфогенезе. При освещении белок *COP1* выходит из ядра, репрессия светозависимых генов устраняется и начинают развиваться реакции фотоморфогенеза. У мутантов же по гену *COP1* реакции фотоморфогенеза развиваются и в темноте.

На рис. 10.5 приведена последовательность событий в семенах в темноте (освещение ДКС) и на свету (освещение КС), происходящих с участием фитохромов. В темноте белки PIF (phytochrome-interacting factor) активируют транскрипцию генов, кодирующих ингибиторы гиббереллинового сигнала — *GAI* (gibberellic acid insensitive), *RGA* (repressor of GA) и неизвестных факторов X, связываясь

с их промоторами через G-бокс. В темноте X-факторы подавляют синтез и активируют катаболизм гиббереллинов. При этом работа генов, контролирующих синтез АБК, активируется, а отвечающих за ее катаболизм — подавляется. Повышение уровня ингибиторов гиббереллинового сигнала (GAI, RGA) способствует подавлению гиббереллин-зависимых процессов. Увеличение содержания АБК приводит к повышению уровня АБК-зависимых факторов транскрипции ABI3 и ABI5 (ABA insensitive) и к торможению прорастания семян.

При освещении (КС) происходит связывание фитохрома ($\Phi_{ДК}$) с белками PIF, что приводит к их протеолизу (на рисунке не показано). Падение уровня белков-регуляторов фитохромного сигнала PIF вызывает падение содержания GAI, RGA и X-фактора. В результате уровень гиббереллинов повышается, а АБК снижается, что, в итоге, активирует прорастание семян.

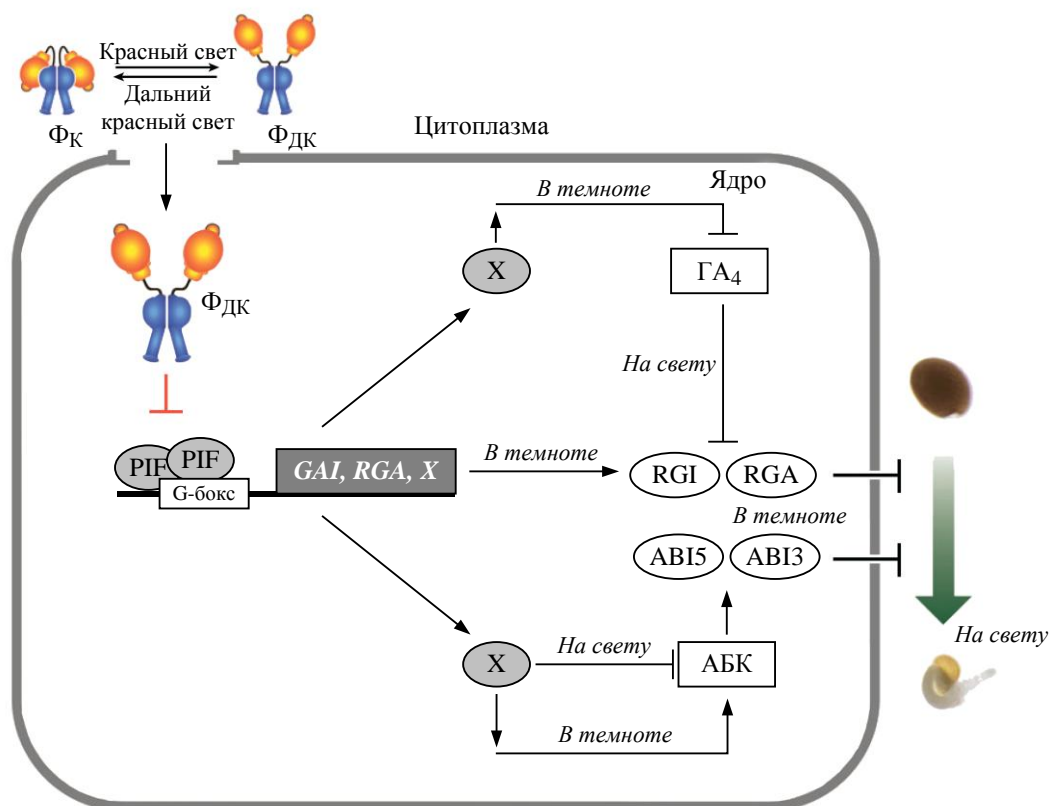


Рис. 10.5. Последовательность событий в семенах в темноте (освещение ДКС) и на свету (освещение КС), происходящих с участием фитохромов (по Oh et al., 2007; Bae, Choi, 2008, с изменениями): Φ_K — красная, $\Phi_{ДК}$ — дальняя красная формы фитохрома; PIF — белок регулятор фитохромного сигнала; GAI, RGA и X — ингибиторы гиббереллинового сигнала; ABI3 и ABI5 — АБК-зависимые факторы транскрипции; G-бокс — *цис*-элемент генов GAI, RGA и X

10.2. Рецепция и физиологическая роль синего света

Впервые ростовые реакции растений на синий свет были открыты Ч. Дарвином. В 1881 г. он в опытах по фототропизму у канареечной травы показал, что экран из раствора бихромата калия, который не пропускает синий свет, полностью подавляет фототропическую реакцию.

Через 2 года немецкий физиолог растений Ю. Сакс более подробно изучил влияние спектрального состава света на фототропизм и показал, что только синий свет вызывает фототропический изгиб. Кроме того, было показано, что от синего света зависит и ряд других процессов — движение устьиц, ранние этапы синтеза хлорофилла и каротиноидов, движение листьев за солнцем, фототаксис хлоропластов, угнетение роста гипокотилей и стеблей в длину.

К фоторецепторам, которые участвуют в восприятии синего света, относятся *криптохромы* и *фототропины* (рис. 10.6).

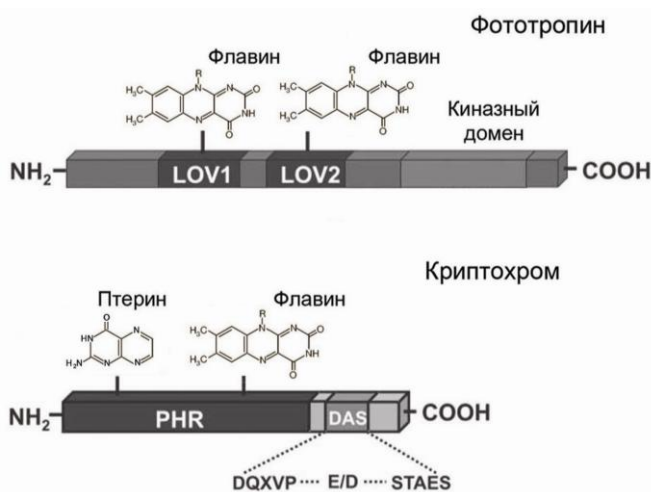


Рис. 10.6. Доменная организация рецепторов синего света (по Lin, 2002): PHR — фотолиазный и DAS — консервативный домены

Криптохромы. Несмотря на то, что исследования действия синего света на ростовые движения растения велись более ста лет, выделить рецепторы долгое время не удавалось. Поэтому, когда эти рецепторы были открыты, они получили название *криптохромов* "скрытых" или "загадочных" (*cryptic*). У арабидопсиса описаны два рецептора синего света, принадлежащих к семейству криптохромов — CRY1 и CRY2.

Криптохромы состоят из апопротеина и двух хромофоров — птерина и флавина (рис. 10.6). Апопротеин имеет массу около 75 кДа, его секвенирование показало,

что он имеет высокую степень гомологии с *фотолиазами* — ферментами, участвующими в светозависимой репарации ДНК (см. приложение 2. *Криптохром*). Спектр поглощения криптохромов лежит в ультрафиолетовой (320—390 нм) и синей (390—500 нм) части спектра и захватывает даже зеленую область. Ширина области поглощения света определяется птериновой хромофорной группировкой. По содержанию в клетке CRY1 значительно превосходит CRY2. В темноте CRY1 находится в ядре, а при освещении транспортируется в цитоплазму, а CRY2 конститутивно локализован в ядре.

Характер ответных реакций растения при освещении синим светом определяется его интенсивностью и длиной волны. На рис. 10.7 показан специфический эффект, который оказывает синий свет на рост стеблей двудольных растений. Можно видеть, что чем выше интенсивность потока синего света, тем сильнее подавляется рост в длину стеблей салата и томатов.

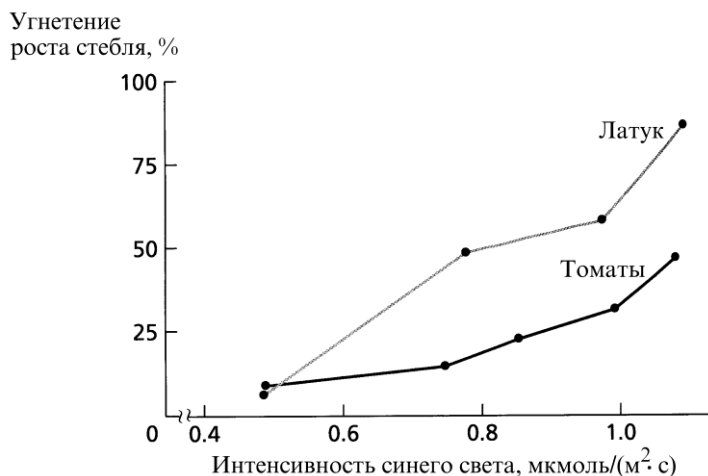


Рис. 10.7. Зависимость роста стеблей двудольных растений от интенсивности синего света (Thomas, Dickinson, 1979)

Схожая картина наблюдается при анализе фототропической реакции в зависимости от длины волны синего света (рис. 10.8). Ростовый изгиб в сторону источника света объясняется тем, что рост клеток с освещаемой стороны тормозится в большей степени, чем с затененной.

Очень важной функцией синего света является регуляция ширины устьичной щели (рис. 10.9). Освещение листьев синим светом вызывает резкое увеличение апертуры устьиц (устьичной щели).

Кроме этого синий свет вызывает распрямление апекса побега, раскрытие семядолей, рост листьев, дифференцировку хлоропластов. Показано, что криптохромы регулируют экспрессию генов синтеза антоцианов, процесс деэтиоляции, фотопе-

риодическую реакцию и, таким образом, цветение. Регуляция фотопериодической реакции требует наличия связи с циркадными часами растений. Установлено, что криптохромы необходимы для нормального протекания ритмических реакций при красном и белом свете, поэтому можно допустить, что они могут участвовать в передаче и фитохромного сигнала.

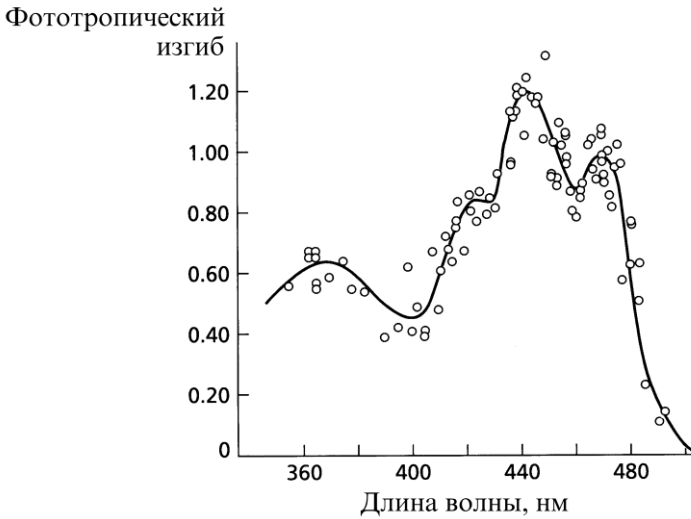


Рис. 10.8. Зависимость фототропической реакции coleoptилей овса (*Avena sativa*) от длины волны синего света (Thimann, Cury, 1960)

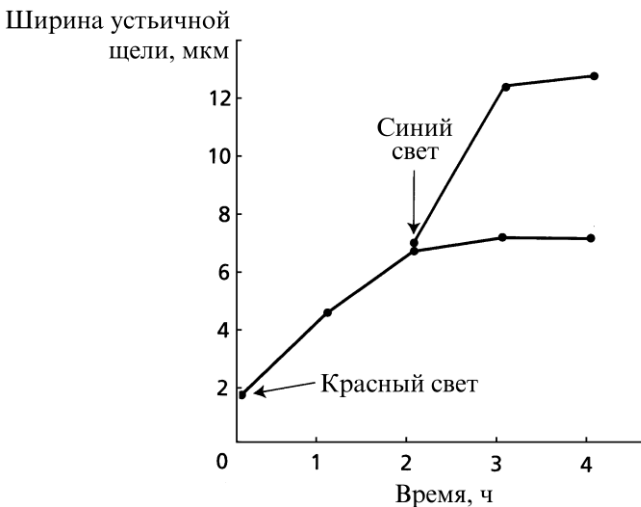


Рис. 10.9. Увеличение ширины устьиц при освещении листьев (*Commelina communis*) синим светом (Schwartz, Zeiger, 1984)

Фототропины отвечают за рецепцию синего света в фототропической реакции. У растений арабидопсиса выделены два гена — *NPH1/PHOT1 (NON PHOTOTROPIC NYROSCOTYL1/PHOTOTROPIN1)* и *NPH2/PHOT2*, которые кодируют рецепторы синего света, отвечающие за фототропизм.

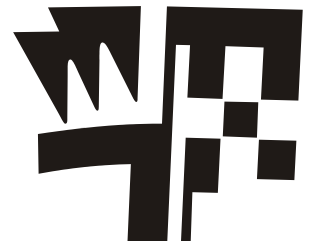
Ген *NPH1/PHOT1* кодирует белок-флавопротеин — *фототропин*, который локализован в плазмалемме и включает три домена: серин-треонинкиназный и два домена, называемых LOV (ligh, oxugen, voltage). Эти домены нековалентно связывают две флавиновые (ФМН) хромофорные группы (см. рис. 10.6). LOV-домены найдены в белках, регулируемых светом, кислородом или электрическим потенциалом.

Подобные домены найдены в рецепторах света, хемотропизма и электрического потенциала у многих организмов, от архей до человека. LOV-домены входят в группу PAS-доменов (Per, ARNT, Sim), которые служат как для связывания лигандов, так и для белок-белковых взаимодействий. Фототропины являются белками, ассоциированными с мембраной, хотя у них отсутствуют протяженные гидрофобные последовательности. Фототропин имеет два максимума поглощения при 390 и 450 нм.

Предполагается, что в процессе рецепции синего света происходит автофосфорилирование фототропина, что вызывает активацию локализованных в плазмалемме Ca-каналов, поступление ионов Ca^{2+} в цитоплазму и включение системы кальциевой сигнализации растительной клетки. Предполагается, что продукт гена *PHOT2* функционирует не только как рецептор синего света, но также красного и дальнего красного света.

Фототропические реакции при разной интенсивности освещения контролируются различными фоторецепторами. При высокой интенсивности облучения фототропическая реакция запускается *PHOT1*, а при низкой — *PHOT2*. Только у двойных мутантов *phot1phot2* фототропическая реакция отсутствует и при высокой, и при низкой интенсивности синего света.

Кроме фототропизма фототропины вовлечены в регуляцию движения хлоропластов и открывания устьиц под действием синего света. В этот процесс вовлечены оба рецептора, т. к. только у двойных мутантов наблюдается отсутствие увеличения устьичной щели в ответ на освещение синим светом. Раскрывание устьиц, по-видимому, связано с запуском протонных помп замыкающих клеток. Фототропины принимают участие в регуляции роста растяжением клеток семядолей и листьев, а также в фототаксисе хлоропластов и торможении роста стебля при освещении синим светом.



Глава 11

Клонирование растений

Говорят, что посередине между двумя противоположными мнениями лежит истина. Никким образом! Между ними лежит проблема!

В. Гёте

Практически каждая растительная клетка при определенных условиях способна реализовать имеющуюся у нее генетическую информацию и дать начало растению. Это свойство называется *тотипотентностью* (от лат. *totus* — все, *potentia* — сила). В отличие от животных организмов, соматические клетки растения, обладая тотипотентностью, сравнительно легко могут пойти по пути дедифференцировки, образованию массы делящихся клеток, называемой *каллусом*, и формированию нового организма (см. рис. 8.21). Однако растения-регенеранты, полученные из каллусной культуры, как правило, генетически неоднородны, что связано с нестабильностью генома клеток, культивируемых *in vitro*. Изменчивость растений-регенерантов, полученных *in vitro*, называют *сомаклональной*. Если же в качестве исходного материала использовать изолированные меристемы почек, то получаемые из них растения-регенеранты будут соответствовать исходному генотипу.

11.1. Вегетативное размножение растений

Вегетативное размножение — это бесполое воспроизведение растений за счет обособления частей материнского организма. Оно основано на регенерации, т. е. процессе восстановления целого организма из отдельных частей тела и даже из отдельной вегетативной клетки. В результате появляются генетически однородные группы особей — *клоны*. Например, у каланхое и бриофиллума отдельные клетки, расположенные по краю листа, способны формировать маленькие растеньица — "детки" (рис. 11.1).

Растения могут размножаться отводками, корневыми отпрысками, луковичками, клубнями, отчленением частей родительской особи. Вегетативное размножение у дикорастущих растений настолько широко распространено, что многие виды только этим путем и размножаются.



Рис. 11.1. "Детки", развившиеся из отдельных маргинальных клеток листа *Bryophyllum daigremontianum* (по: Батыгина и др., 2006)

Вегетативное размножение — одна из типичных особенностей, которые отличают растительные организмы от животных. Издавна этот способ широко применяется при разведении плодовых и ягодных культур черенками и отводками, при размножении овощей и цветов клубнями и луковицами. Новые почки, а из них побеги могут возникать на самых различных органах растения: корнях, стеблях, листьях, частях цветка и плода. Некоторые растения отчлениют от себя части, которые становятся самостоятельными организмами. *Отчленением*, например, способны размножаться растения из семейства толстянковых (*Crassulaceae*), рясковых (*Lemnaceae*) и элодея (*Elodea*).

Многие виды растений успешно размножаются *отводками*, т. е. побегами, связь которых с материнским растением поддерживается до того момента, пока они не укоренятся. В естественном состоянии низко расположенные ветви древесных растений или кустарников, соприкасаясь с почвой, часто укореняются и дают побеги. В культуре этот способ широко применяется при размножении винограда (*Vitis*), ореха (*Juglans*), смородины (*Ribes*), сливы (*Prunus*) и других лиственных, а также хвойных пород. Существует размножение растений *плетями* — у видов с ползучим стеблем, образующим корни в месте контакта с почвой, и *усами*, представляющими видоизмененные стебли, из каждой почки которых образуется новое растение. Такими способами хорошо укореняются и размножаются в естественных условиях лютик ползучий (*Ranunculus repens*), лапчатка (*Potentilla erecta*), портулак огородный (*Portulaca oleracea*), будра (*Glechoma hederacea*), а при искусственном разведении — земляника (*Fragaria vesca*), ежевика (*Rubus caesius*), батат (*Ipomoea batatas*).

При повреждении растений широко распространено образование побегов *из спящих почек* в нижней части ствола (пневая поросль) и из *адвентивных почек* на поврежденных корнях у поверхности почвы (корневые побеги). Именно за счет пневой и корневой поросли возобновляются насаждения срубленных или повреж-

денных растений. В природных условиях и в условиях агрокультуры широко используется размножение растений луковичами, клубнями, корневыми клубнями и корневищами. Лук, чеснок, тюльпаны, лилии, гиацинты эффективно размножаются луковичами, картофель и топинамбур — клубнями, батат — корневыми клубнями, мята, ландыш, пырей и бамбук — корневищами.

В процессе *клубнеобразования*, например, у картофеля вначале происходит формирование *столонов* — видоизмененных боковых побегов, которые образуются в почве из пазушных почек стебля. Образованию столонов благоприятствует окучивание, т. е. их затемнение. Столоны отличаются от обычных побегов тем, что имеют рудиментарные листья на вытянутых этиолированных междоузлиях, которые растут горизонтально. То есть у столонов нарушена (инвертирована на 90°) способность к обычной гравитропической реакции, характерной для осевых органов растений. Наиболее существенное влияние на клубнеобразование оказывает температура и длина дня. Клубни закладываются на дистальном конце столонов, при этом происходит резкое торможение их роста в длину, вероятно, связанное с повышением содержания АБК. В период формирования клубни становятся аттрагирующими центрами, в которые направляется поток питательных веществ. Высокая аттрагирующая способность развивающихся клубней определяется, в первую очередь, резким увеличением концентрации цитокининов. Состояние покоя клубней обусловлено высоким содержанием АБК.

Луковица представляет собой сильно укороченный подземный побег, на котором плотно расположены утолщенные листья (сочные чешуи). Укороченный стебель луковицы называется *донцем*. Размножение луковицами наиболее широко распространено у представителей пустынных, полупустынных и высокогорных видов растений. Эти растения переживают неблагоприятный период в виде луковиц, содержащих запасы питательных веществ. Формирование луковиц происходит в условиях длинногодневного фотопериода, а состояние покоя поддерживается высоким содержанием АБК. Луковицы тюльпанов, например, сохраняются в покое в почве до следующей весны. Выход луковиц из состояния покоя ускоряется после воздействия низких положительных температур. При этом происходит увеличение концентрации ауксина, цитокининов и гиббереллинов. У многолетних луковичных растений ежегодно около материнской луковицы образуются новые луковицы — *детки*, которые развиваются из пазушных почек. На следующий год детки дают начало новому растению. Благодаря такому размножению луковичные растения могут за небольшое время занять большие территории. В Средней Азии, например, многие полупустыни весной становятся алыми от цветущих тюльпанов.

11.2. Микрклональное размножение растений в культуре *in vitro*

Многие ценные сельскохозяйственные культуры могут стабильно воспроизводиться только при вегетативном размножении. Это связано с тем, что полевой способ воспроизведения разрушает генетическую структуру сортов ягодных культур, представленных высоко гетерозиготными генотипами. В то же время длительное

вегетативное размножение растений приводит к их инфицированию патогенными грибами, вирусами и бактериями. В результате происходит потеря генотипов, зачастую уникальных, обладающих хозяйственно ценными признаками.

Одним из очень эффективных способов для массового размножения и поддержания коллекций растений является их *микроразмножение* в культуре *in vitro* (Бутенко, 1964; Лутова, 2003). Особая компактность "пробирочных" коллекций удобна для интродукции и обмена материалом между генбанками. При этом сохраняется надежная изоляция, сохранность генотипа от возможных патогенов и действия экстремальных факторов среды.

Существует несколько основных способов клонального микроразмножения растений, характеризующихся различной степенью надежности в отношении генетической стабильности размножаемых форм, универсальностью для определенных растений, коэффициентом размножения и повторяемостью результатов.

Первый способ микроразмножения заключается в получении *растений-регенерантов из каллусной ткани* путем органогенеза или *соматического эмбриогенеза*. Эта модель несет в себе наибольшую возможность генетической изменчивости растений-регенерантов, поскольку последние образуются из меристематических новообразований, возникающих в популяции дезинтегрированных *каллусных клеток*, как правило, генетически гетерогенных.

В каллусной культуре *соматические эмбрионы* образуются из растительных клеток, которые обычно не участвуют в развитии эмбрионов, т. е. из обычной растительной ткани. Вокруг соматического эмбриона не происходит формирования эндосперма и семенной оболочки.

Генетическая изменчивость, возникающая в культуре тканей, связана с тем, что изолированные растительные ткани и клетки находятся в необычных условиях по сравнению с естественными. При этом инициация культуры *in vitro* и сам процесс культивирования связаны с разными типами стресса. Среди них могут быть и механические повреждения, повышенное осмотическое давление, нарушение аэрации, высокая относительная влажность воздуха, необычный состав питательной среды и др. Первый способ микроразмножения используется для получения генетически измененных растений-регенерантов, которые называются *соматическими клонами*.

Вторая модель микроразмножения — это *индукция развития побегов из ткани эксплантата*. Способность к индукции адвентивных почек в обычных условиях встречается у некоторых видов растений, что используется для их размножения. Условия культивирования *in vitro* могут в сильной степени стимулировать этот процесс. Так, при размножении *in vitro* наблюдалось формирование адвентивных почек и побегов на листовых пластинках и черешках земляники, листовых пластинках малины.

Наибольшее распространение получила третья модель размножения — *пролиферация пазушных побегов, основанная на снятии апикального доминирования*. Этот метод применяется для промышленного производства посадочного материала и в настоящее время является наиболее надежным в отношении размножения плодовых, ягодных культур и декоративных кустарников.

Этот метод имеет ряд чрезвычайно важных преимуществ.

- За короткий срок возможно получение большого количества однородного посадочного материала (коэффициент микроразмножения достигает более сотни растений в год).
- Ускоряется селекционный процесс (сроки получения новых сортов сокращаются в 4—5 раз).
- Удаётся размножать растения, которые в обычных условиях размножаются с трудом или совсем не размножаются вегетативно.
- Возможно получение большого количества оздоровленных растений при ограниченном количестве исходного материала.

Микроразмножение, основанное на снятии апикального доминирования, может осуществляться двумя способами. Первый способ основан на получении побегов, которые делятся на однопочковые микрочеренки и используются в качестве вторичных эксплантов. При втором способе в питательную среду добавляются вещества с цитокининовой активностью, при этом из пазушных почек формируются "щетки" из побегов с укороченными междоузлиями. Каждый из этих маленьких побегов может быть отделен и рекультивирован.

На рис. 11.2 показано микроклональное размножение ежевики, малины и земляники путем снятия апикального доминирования и активации пазушных почек при добавлении в питательную среду цитокининов. Исходным материалом служили микрочеренки, содержавшие небольшую часть стебля и пазушную почку, лист при этом удаляли. Вначале на среде с цитокининами (БАП) инициировали образование боковых побегов (1). Затем сформировавшиеся микропобеги отделяли и пересаживали на среду с ауксином (индолилмасляная кислота) для их укоренения и дальнейшего роста (2). После того как микрорастения достигали высоты 30—40 мм, их пересаживали в пробирки со средой без фитогормонов и выращивали в течение 2-х недель (3). Полученные таким образом микрорастения готовы для длительного хранения (при +5 °С) или для выращивания в промышленных условиях.

Метод микроклонального размножения с помощью пролиферации пазушных побегов имеет минимальную степень риска в отношении получения неоднородного потомства, а частота появления мутантных растений (в расчете на число новообразований) не превышает появления таковых при обычном размножении. Указанный метод микроклонального размножения широко применяется при поддержании коллекций растений *in vitro* в клональных генбанках, поскольку главной задачей при этом является сохранение генетической стабильности хранящихся образцов.

Эффективным способом поддержания *in vitro* культур являются методы хранения растений в условиях их *минимального роста*. Эта группа методов базируется на хранении культур побегов или пробирочных растений, полученных из меристем, в условиях, которые обеспечивают только минимальный рост. Преимущества этих методов заключаются в том, что материал всегда доступен для дальнейшего использования, визуальный контроль позволяет оценить его жизнеспособность, хранящиеся культуры при необходимости могут легко заменяться.

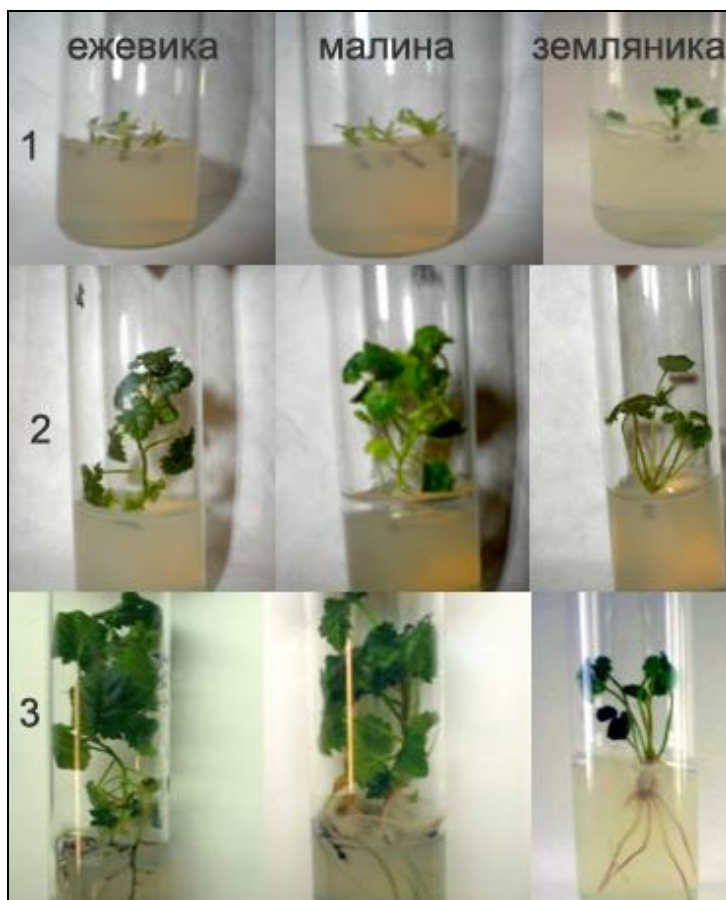


Рис. 11.2. Микроклональное размножение ежевики, малины и земляники на среде Мурасиге—Скуга (МС) (Саматова и др., 2009): 1 — образование боковых побегов на среде МС с добавлением 1 мг/л БАП (6 недель, +20 °С); 2 — рост и укоренение микрорастений на среде МС с половинным составом минеральных солей и добавлением 0,4 мг/л ИМК (3—4 недели, +20 °С); 3 — укоренение на среде МС с половинным составом минеральных солей без фитогормонов (2 недели, +20 °С)

Обеспечение минимального роста может быть достигнуто несколькими путями, прежде всего, изменением физических условий культивирования (температуры, состава газовой среды, спектрального состава света). Вторым приемом является изменение состава культуральной среды за счет удаления или снижения концентрации факторов, необходимых для нормального роста растений.

Очень эффективным способом замедления роста и, таким образом, увеличения сроков беспересадочного хранения растений умеренного климата является их выращивание при пониженной температуре (до +5 °С) в небольшом объеме питательной среды и при коротком фотопериоде. Однако хранение растений в таких условиях может оказывать неблагоприятное влияние на развитие растений-

регенерантов. Поэтому для каждой культуры приемы хранения в условиях минимального роста необходимо подбирать индивидуально.

Важным преимуществом микрклонального размножения растений *in vitro* является также возможность *оздоровления растений* от патогенов. При создании и хранении коллекций безвирусных растений *in vitro* неизбежным является их микрклональное размножение. В результате различных манипуляций, таких как отбор внешне здоровых образцов, проведение термообработки и хемообработки, культура меристем и/или изолированных апексов и иных приемов, на выходе получают единичные здоровые экземпляры.

Наибольшее распространение получил способ оздоровления посадочного материала через *культуру меристем* изолированных апексов. Этот метод основан на неодинаковой концентрации вирусных частиц в различных органах растения. Минимальная концентрация вирусов или полное их отсутствие характерно для точек роста. Причина этого явления, вероятно, связана с понижением концентрации вирусных частиц в активно делящихся меристематических клетках, что вызвано отсутствием в меристемах развитой сосудистой системы и специфичным соотношением фитогормонов.

Безвирусный посадочный материал можно также получить путем регенерации растений в *калусной культуре*. Именно таким путем удалось получить безвирусные регенеранты многих видов растений. Для тех видов растений, у которых отсутствуют вирусы, переносимые пылью, например, для земляники, получение оздоровленного посадочного материала возможно и с помощью *культуры пыльников*.



Глава 12

Ростовые движения

В науке слава достается тому, кто убедил мир,
а не тому, кто первый набрел на идею.

Фрэнсис Дарвин

Способность реагировать на изменения в среде полезными для себя действиями является древнейшим свойством всякой живой системы, ибо без этих способностей никакой организм не смог бы существовать. Это свойство — одно из отличительных свойств живой материи от неживой. Причем это действие будет в том или ином отношении полезно для организма и в конечном итоге направлено на поддержание его существования. В простейшем случае это будет уход от грозящей опасности, какая-либо защитная реакция или стремление к благоприятным условиям. У простейших эта реакция проявляется в виде *таксисов*, у животных организмов — в форме *рефлексов*, у растений — в виде *тропизмов*, *настий* и перемещения клеток с верхушечным, полярным типом роста.

12.1. Процессы раздражимости и возбудимости у растений

Живые системы способны реагировать на очень многие изменения в среде, но не на все. Эти изменения должны обладать определенной степенью интенсивности, называемой *порогом действия*. Изменения окружающей среды, оцениваемые живой системой, называются *раздражителями*. Раздражения могут исходить как из внешней среды, так и от внутренней — других клеток, тканей и органов. Однако во всех случаях раздражения будут внешними по отношению к конкретной клетке или органу. В качестве раздражителей могут выступать свет, гравитация, температура, различные химические вещества, влажность, электромагнитные поля и др. И. П. Павлов писал, что *возбуждение* представляет собой процесс преобразования внешней энергии, происходящий в клетке под влиянием внешних раздражителей. Это состояние, в которое приходит структура живого организма под влиянием раздражителей. Способность к возбуждению называется *возбудимостью*. Клетки, группы клеток или отдельные белковые структуры, обладающие повышенной чувствительностью к определенным видам раздражителей, обусловленной особенностью их строения, называются *рецепторами*.

Явление раздражимости, или возбудимости, с одной стороны, лежит в основе взаимодействия организма как целой системы с элементами его внутренней среды, а с другой — определяет реакцию организма на внешние факторы. Поэтому свойство раздражимости обеспечивает и *целостность* растительного организма, и его адекватную реакцию на изменения факторов внешней среды. Свойством возбудимости обладает цитоплазма любых клеток. В реакции организма на изменения в окружающей среде имеется три элемента: во-первых, возникновение возбуждения в месте действия раздражителя, во-вторых, передача возникшего возбуждения к месту реализации ответной реакции и, наконец, в-третьих, сама ответная реакция. У простейших организмов и растений может отсутствовать второй или третий элемент реакции организма на действие раздражителя.

В ответ на любое раздражение специализированная клетка, ткань или орган реагирует неспецифически, т. е. реакциями, являющимися основными функциями этих образований. Д. Н. Насонов отмечал, что признаками возбужденного состояния клеток являются:

- отрицательный электрический заряд, всегда появляющийся на поверхности возбужденного участка по отношению к невозбужденному;
- освобождение и выход из клеток некоторых ионов (например, калия);
- резкая активация обмена веществ, сопровождающаяся повышением температуры.

Похожие изменения происходят и при повреждении клеток. При повреждении клетки также наблюдаются помутнение и увеличение вязкости цитоплазмы, коагуляция содержащихся в ней коллоидов, возрастание способности цитоплазмы и ядра связывать различные красители, которые начинают концентрироваться в поврежденных участках клетки. Д. Н. Насонов называл эти признаки повреждения (или возбуждения) *паранекрозом*. Неповрежденные клетки слабо связывают различные красители. При повреждении способность красителей (например, метиленовой сини, нейтрального красного) проникать в ткани резко повышается. При слабых нарушениях эти изменения обратимы.

Механизм возникновения и распространения возбуждения в растениях так же, как и у животных, связан с изменениями ионной проницаемости и колебаниями мембранного потенциала клеток, по которым перемещается импульс потенциала действия. В течение последних 20 лет жизни Ч. Дарвин изучал вопросы раздражимости у насекомыхных и лазящих растений, а также в ходе грави- и фототропической реакции. Он обнаружил, что у растений имеются рецепторные органы и ткани (кончики корня и колеоптиля, усики, железистые волоски или щупальца, определенные участки листа и стебля), от которых раздражения передаются к эффекторам. Ч. Дарвин считал, что свойство раздражимости так же присуще растениям, как и животным организмам. Он писал, что у "всех растений имеется раздражимая система, которая перерабатывает и передает все внешние раздражения другим частям организма".

12.2. Тропизмы

Тропизмами называют ориентированные ростовые движения растений, определяющиеся направлением действия внешнего фактора (света, гравитации и т. д.). Тропизмы являются следствием более быстрого роста клеток на одной из сторон органа и поэтому присущи только растущим частям растительного организма. Ростовые изгибы органов растений возникают в результате различного удлинения их выпуклой и вогнутой сторон. Изучение тропизмов позволяет расшифровать всю последовательность событий, развивающихся в растительном организме в ответ на действие поляризующего фактора. Выделяют рецепцию сигнала, передачу его через систему вторичных посредников, реализацию "позиционной" информации на уровне генома и, наконец, интегральную ответную реакцию — полярный рост клеток и тканей.

12.2.1. Гравитропизм

Наиболее выраженным поляризованным внешним фактором является гравитация, поскольку направление и величина гравитационного стимула в каждой конкретной точке пространства практически не изменяются в течение всего развития растительного организма. Поэтому естественно, что растения сформировали тонкие механизмы, благодаря которым они могут контролировать и корректировать положение своего тела относительно вектора силы тяжести, создавая новые оси полярности. Растительные организмы способны реагировать на чрезвычайно слабые гравитационные воздействия. Изменение положения растения в пространстве только на один градус уже спустя 1—2 мин приводит к гравитропическому изгибу.

У большинства растений восприятие гравитропического раздражения, по-видимому, связано с перемещением *статолитов* в специализированных клетках корневого чехлика, а в надземных органах — в клетках, окружающих сосудистые пучки. В качестве статолитов могут выступать амилопласты, хлоропласты, аппарат Гольджи, а также включения типа друз щавелевокислых солей, сульфата бария, карбонатов и т. п. Клетки, реагирующие на направление вектора силы тяжести, называются *статоцитами*. Предполагается, что в корне роль статоцитов выполняют клетки центральной части корневого чехлика, а статолитами служат амилопласты. В надземных органах (колеоптили, гипокотили, междоузлия) гравитационное раздражение воспринимается по всей длине растущей зоны. У злаков в качестве важной системы обеспечения гравитропизма выступают подушечки листовых влагалищ, которые имеют специализированные гравичувствительные клетки с амилопластами.

Наиболее ранними процессами при гравистимуляции растительных тканей являются формирование латеральных (поперечных) потоков ионов Ca^{2+} и фитогормона ИУК, а также изменение мембранного потенциала клеток и поперечная электрическая поляризация осевых органов.

При гравистимуляции (отклонении от вектора силы тяжести) у корней возникают направленные к их нижней части латеральные потоки ионов Ca^{2+} и фитогормона ИУК. Одним из необходимых факторов для проявления гравичувствительности корневой системы растений является красный свет. У некоторых растений, например у кукурузы (*Zea mays*), в полной темноте корни не обладают способностью к положительному гравитропизму и растут горизонтально.

У надземных осевых органов в ходе гравитропической реакции растений также появляются латеральные потоки ИУК и ионов кальция, однако при этом происходит накопление ауксина в нижней, а ионов Ca^{2+} в верхней половине гравистимулированных тканей.

Уже в пределах 30 с гравистимуляции А. Сиверс с коллегами (A. Sievers et al., 1984) обнаружили изменение специфического рисунка электрических силовых линий на корнях кресс-салата (*Lepidium sativum*). У вертикально ориентированных корней электрический ток симметрично входит в зону апекса. Когда корни ориентируются горизонтально, электрический ток течет акропетально по верхней стороне и базипетально по нижней.

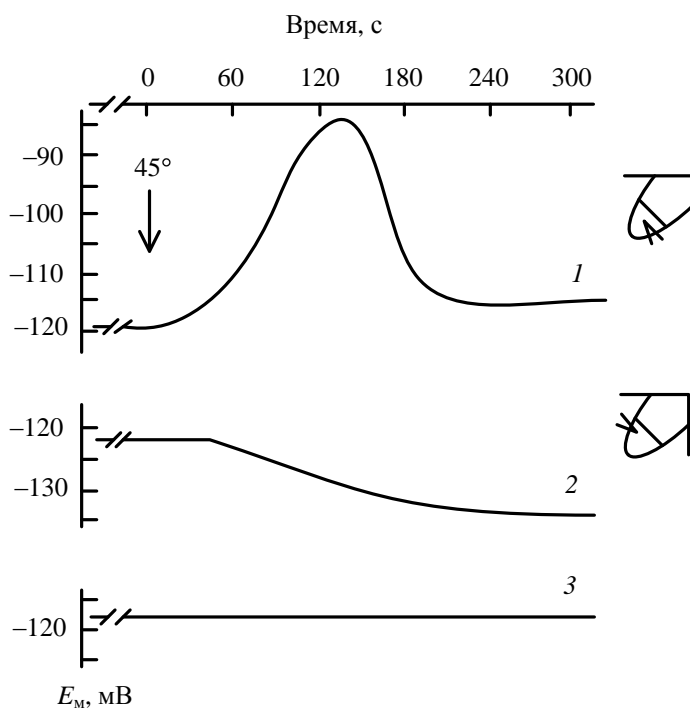


Рис. 12.1. Изменение мембранного потенциала клеток корневого чехлика кресс-салата (*Lepidium sativum*) при гравистимуляции (Sievers et al., 1984): 1, 2 — изменение мембранного потенциала клеток, оказавшихся соответственно внизу и наверху; 3 — контрольный вариант

При исследовании влияния гравистимуляции на мембранные потенциалы клеток корней кресс-салата оказалось, что потенциал покоя статоцитов вертикально ориентированных корней составлял около -118 мВ. После наклона корня на 45° уже через 8 секунд наблюдалась деполяризация мембранного потенциала клеток, оказавшихся внизу, и более медленная гиперполяризация верхних клеток. Мембранный потенциал нижних статоцитов деполяризовался до -93 мВ, а верхних — гиперполяризовался до -130 мВ (рис. 12.1).

Вторичным посредником между гравитропическим стимулом, сдвигами мембранного потенциала и ответной ростовой реакцией являются ионы Ca^{2+} , они играют центральную роль во всех трех фазах гравитропизма — перцепции, трансдукции и ответной ростовой реакции. При изменении положения осевого органа в пространстве отмечается очень быстрое повышение концентрации цитоплазматического кальция и активация Са-зависимых процессов в клетке. Увеличение концентрации цитозольного кальция происходит локально, только в тех участках клетки, где наблюдается контакт мембранных структур с седиментирующими частицами или механическое напряжение. Именно это способствует появлению полярного (латерального) потока ионов Ca^{2+} , который несет информацию о направлении вектора силы тяжести. Возникновение латеральных потоков ионов Ca^{2+} является, по-видимому, одним из наиболее ранних процессов при гравитропизме, который предшествует латеральному перераспределению ауксина. Полярный поток кальция в растущей ткани постоянно ориентируется параллельно вектору силы тяжести и корректирует направление потока ауксина, задавая таким образом направление роста растительным клеткам и тканям.

12.2.2. Фототропизм

Фототропизмом называют ростовые движения (изгибы) органов растений под влиянием одностороннего освещения. Для большинства наземных органов растений характерен положительный фототропизм, а для корней некоторых видов — отрицательный. Фототропизм является одним из немногих процессов, который специфически контролируется синим светом (см. главу 10). В главе 10 уже упоминалось, что за рецепцию синего света отвечают фототропины.

12.2.3. Гидротропизм и хемотропизм

Гидротропизм и другие типы ростовых движений методически трудно отделить от таких ярко выраженных тропизмов, как грави- и фототропическая реакции. Пожалуй, практически единственной возможностью исследовать механизм гидротропизма является использование мутантов, не обладающих гравитропической и фототропической реакцией. Такой мутант гороха (*ageotropum*) удалось получить М. Джаффе с коллегами (M. Jaffe et al., 1985). Корни полученного ими мутанта были чувствительны к градиенту влажности, но не обладали грави- и фототропической реакцией. Чувствительность к градиенту влажности наблюдалась при выращивании мутантных

растений на белом, красном и дальнем красном свете. Поскольку при удалении корневого чехлика гидротропическая реакция исчезала, они пришли к выводу, что корневой чехлик непосредственно участвует в реакции корня на изменение градиента влажности.

Ростовые движения органа растения в ответ на внешний химический раздражитель называют *хемотропизмом*. Примерами хемотропизма могут служить ориентированный (по градиенту химического раздражителя) рост корней, а также рост пыльцевой трубки в столбике по направлению к завязи. В большинстве случаев рост клетки растяжением идет равномерно всей поверхностью, однако некоторые клетки, такие как корневые волоски, пыльцевые трубки, гифы грибов, увеличивают свои размеры путем верхушечного, полярного роста. Направление роста таких клеток определяется прежде всего градиентом определенных химических веществ.

12.2.4. Тигмотропизм

Тигмотропизмом называют ростовые изгибы в ответ на механическое раздражение тканей. Знакомый вид обвивающихся вокруг опоры усиков гороха или других вьющихся растений — хороший пример ответной реакции на контакт или механический стимул. Способностью к тигмотропическим движениям обладают также кончики воздушных корней и листовых черешков ряда растений. Растущие корни в почве выбирают пути наименьшего механического сопротивления, совершая тигмотропические изгибы при столкновении с зонами повышенной плотности.

В опытах М. Госса и Р. Рассела (M. Goss, R. Russell, 1980) исследовалось действие на корневую систему ячменя *Hordeum sativum* питательного раствора, содержащего стеклянные шарики. Появление механического препятствия (в виде стеклянных шариков) замедляло удлинение корней, приводило к искривлению корневого апекса и индуцировало образование боковых корней. Там, где кончик корня искривлялся вокруг шара, активировалось формирование боковых корней, в основном на наружной (выпуклой) стороне. После выхода из механического стресса скорость удлинения корня возрастала почти втрое. Когда кончики корня контактировали с препятствием, скорость их роста в длину уменьшалась почти на 70%. Однако, если перед контактом удаляли корневой чехлик, замедления роста при механическом стрессе не происходило. Таким образом, так же, как и при гидротропизме, тигмотропический ростовой ответ, вероятно, связан с корневым чехликом.

Усики представляют собой видоизмененный лист (у гороха *Pisum sativum*) или побег (у винограда *Vitis vinifera*). Если направление закручивания усиков определяется той стороной, поверхность которой раздражается механически, они называются *тигмотропическими*. Усики, направление закручивания которых не зависит от места приложения механического стимула, а предопределено асимметрией их собственной структуры, называют *тигмонастическими*. Из фитогормонов — ИУК и этилен, несомненно, имеют отношение к регуляции движения усиков, поскольку они способны индуцировать их закручивание в отсутствие механических раздражителей.

12.3. Настии

Настической реакцией (настией) называют изменение ориентации органа с дорсовентральным строением в ответ на *диффузное* изменение параметров факторов внешней среды. То есть изгиб побега в сторону большей освещенности является *фототропизмом*, тогда как открывание и закрывание цветков при изменении интенсивности света в течение суток — *фотонастией*. Настические движения обеспечивают защиту органов от повреждающих воздействий, взаимодействие лазящих растений с опорой, захват добычи у насекомоядных растений. Направленность настий определяется прежде всего структурой органа, совершающего движение. Большинство дневных цветков закрывается с уменьшением освещенности (фотонастия), в то время как венчик ночных цветков в этих условиях раскрывается. Такие движения обусловлены неравномерным ростом сторон органов с дорсовентральным строением либо обратимыми изменениями тургора.

Хорошим примером настической ростовой реакции является открывание и закрывание цветков, таких как крокусы *Crocus vernus* и тюльпаны *Tulipa suaveolens*, при изменении температуры (*термонастия*). При повышении температуры происходит ускорение роста клеток на внутренней стороне лепестков, и цветок раскрывается, при снижении температуры ускоренный рост наблюдается на внешней стороне — цветок закрывается.

Углы, под которыми листья и боковые ветви отходят от стебля у двудольных растений, определяются относительными скоростями роста внутренней и наружной сторон органов. *Эпинастией* называют такую ситуацию, когда орган (лист, лепесток) изгибается вниз, в отличие от *гипонастии*, когда происходит изгиб органа вверх. Эпинастия листьев наблюдается, например, при попадании корней в анаэробные условия.

В большинстве своем настические движения не связаны с ростом, но вызваны обратимыми изменениями тургора в специализированных клетках. Яркими примерами настических движений, не связанных с ростом, служат *никтинастии* листьев ("ночной сон" листьев), которые можно наблюдать у растений фасоли *Phaseolus vulgaris*, клевера *Trifolium repens*, кислицы *Oxalis acetosella* и мимозы *Mimosa pudica*. Листья никтинастических растений ночью прижимаются к стеблю. При этом листочки сложных листьев могут складываться вверх (у клевера) или вниз (у кислицы). На свету листья возвращаются к нормальному горизонтальному положению. Никтинастические движения инициируются прежде всего резкими изменениями температуры и влажности.

Выделяют также быстрые тургорные движения, индуцируемые механическими стимулами, в частности сотрясением (*сейсмонастии*). При сотрясении мимозы *Mimosa pudica* происходит опускание главного черешка, сближение черешков второго порядка и попарное складывание листьев. Механизм этих сейсмонастических движений обеспечивается способностью клеток листовых подушечек, которые расположены в сочленениях черешков с листовыми пластинками, быстро терять тургор под действием механических раздражителей, что приводит к опусканию

черешков и складыванию листьев. Проведение сигнала по растению осуществляется электрически. В ответ на раздражение генерируется потенциал действия, который распространяется по черешку со скоростью 0,5—4,0 см/с, достигает клеток листовых подушечек и инициирует быструю потерю тургора в нижних клетках сочленений черешков и листьев.

12.4. Круговые нутации

Не все ростовые движения инициируются каким-либо внешним раздражителем. Существуют автономные круговые (или колебательные) движения эндогенной природы, называемые *нутациями* (от лат. *nuitatio* — колебание, качание), хотя факторы внешней среды оказывают на них определенное влияние. Одним из примеров нутационного движения является рост стебля растения, поскольку он растет не вертикально, а совершает ритмические движения (качания), в результате чего верхушка побега колеблется относительно продольной оси. Аналогичные колебательные движения совершают и корни. Этот особый тип движений, называемый круговой нутацией, направлен на корректировку роста относительно вектора силы тяжести или на поиск опоры, необходимой для движения к свету. Круговые нутации особенно хорошо выражены у усиков вьющихся и лазающих растений. Нутационные движения обеспечиваются за счет ритмичных (круговых) ускорений роста клеток на разных сторонах органа в зоне растяжения.

В 1880 г. Чарльз Дарвин вместе со своим сыном Фрэнсисом (Francis) опубликовали книгу "The Power of Movement in Plants", в которой они изложили результаты своих многолетних наблюдений ростовых движений растений. Они изучали несколько типов ростовых движений растений: тропизмы, настии, быстрые движения насекомоядных растений и круговые нутации. На рис. 12.2 показаны круговые нутации, регистрируемые ими в течение 11 часов наблюдений у верхушки побега проростков *Brassica*.

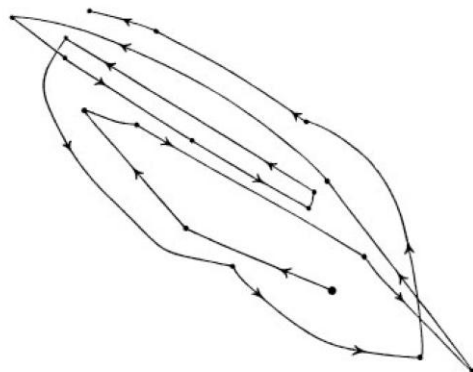


Рис. 12.2. Круговые нутации, регистрируемые в течение 11 часов наблюдений у верхушки побега проростков *Brassica* (Ch. Darwin, F. Darwin, 1880) (по Kiss, 2006)

12.5. Насекомоядные растения

В физиологии растений очень важным является ответ на вопрос, несет ли импульсная электрическая активность в растительном организме какую-либо функциональную нагрузку или нет. Если распространяющееся возбуждение играет определенную роль в процессах жизнедеятельности растения, импульсную электрическую активность следует рассматривать как один из способов регуляции обмена веществ, как физиологическую функцию, равную по значимости росту, транспорту веществ, фотосинтезу. Если же импульсная форма электрической активности не несет в растениях существенной функциональной нагрузки, то любопытно исследовать ее развитие в эволюционном плане. Однако существует большая группа растений, у которых процессы генерации и распространения импульсов потенциалов действия необходимы для отправления наиболее важных жизненных функций. Это *насекомоядные растения и растения с быстрыми локомоторными функциями*.

В настоящее время известно более 500 видов насекомоядных растений, относящихся к 7-и семействам, филогенетически довольно далеким друг от друга. Насекомоядные растения делятся на несколько групп.

В первую группу входят растения, обладающие листьями-ловушками, которые способны совершать особые глотательные движения. К ним относятся водные или земноводные виды пузырчатки (*Utricularia*). Как только рачок (дафния, циклоп и т. п.) касается клапана, он легко отходит внутрь, животное увлекается струей воды и засасывается внутрь пузырька. В ряде случаев добычей пузырчатки могут становиться мальки рыб или головастики. Разрежение внутри пузырька создается за счет работы расположенных на его задней стенке специальных желез, которые отсасывают воду из полости пузырька, и поэтому уже через 15—20 мин пузырек способен совершить новое глотательное движение.

Ко второй группе относятся растения, листья которых выделяют на своей поверхности липкую жидкость, совершают удерживающие добычу движения и подвергают ее действию протеолитических ферментов. Наиболее известным представителем этой группы растений является росянка *Drosera rotundifolia*, имеющая очень слабо развитую корневую систему и листья, на которых расположены щупальца. Насекомое, коснувшись листа, прилипает к нему, и, чем энергичнее оно бьется, тем сильнее изгибаются щупальца по направлению к добыче. Щупальца росянки обладают необычайно высокой чувствительностью к механическому и химическому раздражению. Изгиб щупалец становится заметным уже через 10—20 с после воздействия.

Третья группа насекомоядных растений имеет листья-ловушки, совершающие быстрые движения захлопывания. При попадании насекомого, например, на листья-ловушки венериной мухоловки *Dionaea muscipula* вначале наблюдается их быстрое захлопывание (как книги), после чего идет медленное и более плотное смыкание половинок листа, выделение в возникшую полость секрета и переваривание добычи. Захлопывание листьев-ловушек происходит только в том случае, когда насекомое задевает расположенные на листе три волоска-рецептора. К этой группе растений

относится также водное растение альдрованда, которое питается рачками и внешне похоже на водные виды пузырчатки, но имеет аналогичные венериной мухоловке листья-ловушки.

Питающиеся насекомыми непентесы (порядок *Nepenthes*) и саррацении (порядок *Sarraceniales*) имеют листья-ловушки в виде кувшинов с пищеварительными ферментами на дне. Привлекаемые яркой окраской этих растений насекомые скатываются по скользким стенкам листьев-кувшинов, вязнут в липком растворе протеолитических ферментов и перевариваются.

Почти все этапы пищевого поведения насекомоядных растений контролируются электрическими сигналами. У росянки практически любая клетка поверхности щупалец способна реагировать на прикосновение снижением мембранного потенциала, инициируя таким образом возникновение потенциала действия, распространяющегося к основанию волоска и далее по всей поверхности листа. Механическое раздражение является причиной изгиба не только того щупальца, которое восприняло раздражение, но и других, которые изгибаются в направлении первоначального источника распространения потенциала действия. Скорость распространения потенциала действия при этом составляет 0,5 см/с.

Для закрытия листа венериной мухоловки необходимы два стимула: насекомое должно либо дважды задеть один и тот же чувствительный волосок-рецептор, либо последовательно воздействовать на два различных волоска, при этом интервал между двумя раздражениями не может превышать 20 с. Если повторное раздражение происходит спустя 40—50 с после первого, признаков движения листьев-ловушек практически не обнаруживается. Аналогичным образом для закрытия листьев-ловушек альдрованды необходимы два последовательных раздражения чувствительной щетинки. При первом воздействии на чувствительный волосок венериной мухоловки происходит снижение мембранного потенциала клеток основания волоска, которое передается по наружной поверхности листа во всех направлениях со скоростью 2 см/с. Если вскоре раздражения повторяются, возникает распространяющийся потенциал действия, являющийся сигналом для захлопывания ловушки через $0,60 \pm 0,05$ с.

Закрытия листа венериной мухоловки можно добиться и электрической стимуляцией, при этом захлопывание листьев-ловушек наблюдается только после повторного импульса электрического тока. Венерина мухоловка, так же, как и росянка, способна реагировать хватательными движениями и на химические раздражители. При этом, например, в процессе переваривания пойманного насекомого появляются импульсы потенциалов действия, вероятно, благодаря которым лист поддерживается в закрытом состоянии до конца переваривания добычи. В случае закрытия листа-ловушки только механическим стимулом он раскроется через 10 ч, при этом не происходит генерации импульсов потенциалов действия. Если же в ловушке находится насекомое, она остается закрытой многие сутки, ее замкнутое состояние будет поддерживаться периодически возникающими импульсами потенциалов действия, генерирующихся под влиянием химических раздражителей — продуктов переваривания жертвы.



Глава 13

Физиология стресса

Основная ткань исследования — это фантазия, в которую вплетены нити рассуждения, изменения и вычисления.

А. Сент-Дьёрдьи

Способность к защите от повреждающих и неблагоприятных факторов среды — обязательное свойство любого, в том числе и растительного, организма. Ответные реакции, индуцируемые в организме внешними воздействиями, часто объединяют терминами "адаптационный синдром" (adaptive syndrome), а также не совсем точным, но широко распространившимся термином "стресс". Впервые термин "стресс" в физиологию и психологию ввел Уолтер Кэннон (Wolter Cannon, 1932).

Основные понятия и положения учения о стрессе были разработаны (в приложении к медицине) в 1936 г. канадцем Гансом Селье (H. Selye), который длительное время избегал употребления термина "стресс", поскольку он чаще использовался для обозначения "нервно-психических" ситуаций. Селье стал использовать этот термин для обозначения адаптивных процессов только с 1964 г. Он полагал, что адаптивная реакция организма на различные неблагоприятные факторы (*стрессоры*) развивается по единому сценарию. Комплекс ответных реакций организма на стрессоры Селье назвал "генерализованным адаптационным синдромом", в котором он выделил три стадии:

- *тревоги и торможения* большинства процессов;
- *адаптации*, в течение которой организм приспосабливается к стрессору;
- *истощения*, если адаптивный потенциал организма недостаточен для преодоления влияния стрессора.

По Селье, *стресс* — это совокупность всех неспецифических изменений, возникающих в организме под влиянием любых неблагоприятных и повреждающих факторов (стрессоров). Селье считал, что одной из отличительных характеристик живых организмов является способность адаптироваться к стрессорам путем "концентрирования усилий, или напряжения" (от англ. *stress* — напряжение). Предложенный термин "стресс" быстро завоевал популярность в физиологии, поскольку позволял одним словом объединить воздействие на организм разнокачественных повреждающих факторов без количественной оценки эффекта, вызываемого каждым из стрессоров в отдельности.

Стрессовыми называют внешние факторы, которые оказывают неблагоприятное воздействие на растение. В большинстве случаев стрессовое воздействие оценивают по его влиянию на выживание растительного организма, процессы роста, ассимиляции углекислоты или элементов минерального питания. Разные виды растений устойчивы (или неустойчивы) к различным стрессовым воздействиям. То есть характер стрессового воздействия зависит и от вида (сорта) растения, и от стрессового фактора. Приобретение устойчивости под воздействием одного из неблагоприятных факторов может вызывать повышение устойчивости растительного организма к другим стрессовым воздействиям. Это явление называется *кросс-устойчивостью*, или *кросс-адаптацией*.

Благодаря прикрепленному образу жизни растения часто подвергаются стрессовым воздействиям. Это требует комплексной и высокоупорядоченной системы ответных реакций на такие факторы как избыточная или недостаточная освещенность, жара, холод, гипоксия, засуха, повреждения. Растения способны очень быстро реагировать на сигналы, поступающие из окружающей среды, и, адаптируясь к ним, корректировать программу своего развития.

В ответных реакциях растений на повреждающие факторы выделяют элементы неспецифической устойчивости (включающиеся в самых различных стрессовых ситуациях) и специфические процессы, инициируемые в растении только определенным типом стрессовых воздействий. На формирование неспецифических элементов устойчивости (синтез белков теплового шока, полиаминов) требуется гораздо меньшее время, чем для прохождения специфических адаптивных реакций, например таких, как синтез белков-антифризов, фитохелатинов, участвующих в детоксикации тяжелых металлов, переключение фотосинтеза на САМ-метаболизм.

Растения очень часто подвергаются стрессовым воздействиям в естественных условиях. Некоторые стрессовые факторы, например высокая или низкая температура воздуха, могут действовать в течение нескольких часов, другие — оказывают на растение неблагоприятное влияние в течение нескольких дней, недель (затопление) или месяцев (дефицит или избыток некоторых минеральных элементов). Именно устойчивость к неблагоприятным условиям среды определяет границы ареала и характер распределения различных видов растений по климатическим зонам.

Для эффективного выращивания большинства культурных растений важна не только их потенциальная продуктивность, но также способность противостоять различным стрессовым ситуациям и адаптироваться к ним. При этом важную роль играет *акклиматизация* растений, т. е. увеличение их устойчивости к стрессовому фактору путем закаливания или серии подпороговых стрессовых воздействий. Процесс акклиматизации связан с экспрессией определенных генов и появлением таких генных продуктов, активность которых повышает устойчивость растения к стрессовому воздействию.

Акклиматизацию не следует понимать как адаптацию, которая определяется как генетически детерминированный уровень устойчивости определенных видов растений и, как правило, является результатом процесса отбора в течение многих поколений. *Адаптация* — это совокупность морфологических, физиологических

и химических приспособительных реакций, обеспечивающих возможность выживания и полноценного развития определенного вида растений при неблагоприятных воздействиях среды в условиях определенного ареала.

13.1. Водный дефицит и устойчивость к засухе

Недостаток воды в растительных тканях возникает тогда, когда расход начинает превышать поступление. Засухи бывают почвенные и атмосферные. *Атмосферная засуха* характеризуется низкой относительной влажностью воздуха, *почвенная засуха*, как правило, следует за атмосферной и возникает при длительном отсутствии дождей. *Водный дефицит* вызывает серьезные нарушения в первую очередь процессов роста и фотосинтеза. Во время засухи наряду с обезвоживанием происходит перегрев растений, поэтому засуха является наиболее жестким стрессовым воздействием.

В зонах, где среднегодовое количество осадков позволяет получать очень высокие урожаи сельскохозяйственных культур, главным фактором, лимитирующим рост растений, является дефицит воды. Более устойчивы к засухе такие виды растений, которые способны расходовать воду более экономно или запастись ее.

У растительных организмов имеется несколько адаптивных стратегий, с помощью которых удастся пережить засушливые периоды. Одни виды растений приспособились функционировать в условиях дефицита воды (ксерофиты). Другие способны накапливать и удерживать воду, поддерживая, таким образом, необходимую степень гидратации своих клеток и органов (например, суккуленты, имеющие САМ-путь углеродного метаболизма). К третьей группе относят растения, которые "избегают" засухи за счет организации своего жизненного цикла так, чтобы вегетировать в период достаточного обеспечения водой (эфемероиды). У некоторых видов растений в условиях засухи (или засоления) даже индуцируется переход фотосинтеза к САМ-пути углеродного метаболизма.

Ксерофиты — это засухоустойчивые растения, произрастающие в местах с недостаточным увлажнением и хорошо выраженным засушливым периодом. У таких растений выработались различные приспособления, позволяющие им выжить в сухом воздухе и при недостатке воды в почве. Обычно это низкорослые растения с мощно развитой корневой системой. При этом нередко масса корней в десятки раз превышает массу надземных побегов. Все защитные приспособления ксерофитов направлены на снижение транспирации.

Это достигается разными способами. У одних растений на листьях имеется серебристо-белое опушение, которое отражает солнечные лучи и защищает от перегрева и излишней транспирации. При этом в густом опушении задерживаются водяные пары и повышается влажность воздуха. У других видов поверхность листовой пластинки может быть покрыта толстым слоем воскового налета. Третьи растения имеют узкие, расположенные вертикально листья. В полуденный зной солнечные лучи проходят мимо таких листьев и не перегревают их. У ковылей при засухе лист способен сворачиваться в трубочку, создавая влажную камеру, в которую открываются устьица. И, наконец, некоторые ксерофиты, например пустынные саксаулы, вообще лишены листьев.

У ряда *суккулентов* стебли похожи на бочки, в которых накапливается влага, а затем экономно расходуется на протяжении засушливого периода. Стеблевые суккуленты, например кактусы, имеют сочный толстый стебель и превратившиеся в колючки листья. Листовые суккуленты (алоэ, агавы), напротив, обладают жестким стеблем и мясистыми листьями.

Многие однолетние виды растений резко ускоряют свой рост весной, до наступления засушливого лета, когда в почве накапливается большое количество влаги (*эфемеры*). При этом растения или запасают воду для завершения репродуктивного этапа развития, или быстро завершают свой жизненный цикл. Такой тип роста и развития растений называют *детерминированным*, поскольку он определяется периодами дождей или засухи.

Эфемероиды — это многолетние травянистые растения с непродолжительной осенне-весенней вегетацией. Например, длительность вегетации эфемероидов лесостепи (пролеска сибирская, анемона лютиковая) около 2 месяцев, преимущественно до разворачивания листьев деревьев. Засушливую часть года они находятся в покоящемся состоянии в виде семян, луковиц, клубней или корневищ.

При резком наступлении засушливого периода растения, как правило, сбрасывают часть листьев за счет формирования у черешка отделительного слоя под влиянием фитогормона этилена. Если водный дефицит развивается постепенно, то растительному организму лучше удастся приспособиться к недостатку воды, заранее замедлив темпы ростовых процессов.

Совсем другая стратегия развития у растений *мезофитов*, произрастающих в условиях нормальной обеспеченности водой, например, на Северо-Западе России. У таких растений вегетация и цветение продолжаются весь летний период. Они характеризуются сочными и достаточно крупными листьями с плоскими пластинками и большим количеством устьиц. Такой тип развития растений называют *недетерминированным*. Мезофиты не имеют особых приспособлений для снижения испарения воды, поэтому не выдерживают длительной засухи, но способны пережить кратковременный водный дефицит.

Одной из самых ранних реакций растительных организмов на водный дефицит является синтез фитогормона абсцизовой кислоты, которая вызывает закрытие устьиц и таким образом снижает потерю воды при транспирации. Активность многих генов и белков, которые экспрессируются при водном дефиците (и при низкой температуре), может быть индуцирована обработкой АБК. Белки, появляющиеся при засухе (охлаждении или засолении), имеют высокую степень гомологии с семейством белков RAB/LEA/DHN (responsive to ABA, late embryo abundant, dehydrin). LEA-белки синтезируются при созревании семян, водном дефиците и обработке растений АБК. Они очень гидрофильны, сохраняют свою структуру при резких колебаниях температуры и способны очень прочно удерживать воду, поскольку содержат много повторов таких полярных аминокислот, как глицин, аланин и пролин.

Недостаток воды инициирует рост корней в направлении более влажных участков почвы при условии, что в растущие кончики корней поступает необходимое коли-

чество фотоассимилятов. В этом случае возникает конкуренция за ассимиляты между растущими корнями и формирующимися плодами. В условиях водного дефицита активируется синтез низкомолекулярных осмотически активных веществ (моно- и олигосахаридов, аминокислот, в первую очередь пролина, бетаинов, многоатомных спиртов) и различных стрессовых белков, таких как осмоин, дегидрины. Особое значение в осморегуляции имеет пролин, содержание которого резко возрастает при засухе.

13.2. Устойчивость растений к низким температурам

Под устойчивостью к низким температурам подразумевают *холодостойкость* и *морозостойкость*, т. е. способность растений выживать в условиях низких положительных температур и при заморозках. В листьях растений, повреждающихся при охлаждении, нарушаются процессы фотосинтеза, транспорта ассимилятов, дыхания, синтеза белков. Диапазон повреждающих температур сильно варьирует в зависимости от вида растения. Особенно устойчивы к низким температурам древесные виды в состоянии покоя. Семена, другие обезвоженные ткани растений и споры грибов способны переживать температуры около абсолютного нуля. Тургесцентные вегетирующие клетки также могут выдерживать замораживание, если их охлаждать очень быстро, поскольку формирующиеся в таких условиях кристаллы льда очень малы и не вызывают механических повреждений.

13.2.1. Холодостойкость

Большинство видов тропических и субтропических растений не выдерживают не только заморозков, но даже низких положительных температур. Такие растения, как кукуруза, фасоль, рис, томаты, огурцы и хлопок, останавливаются в росте при температуре 10—15 °С и повреждаются, если температура падает ниже 10 °С. Однако повреждающий эффект низких температур будет гораздо меньше, если теплолюбивые растения находятся в условиях высокогорья.

Холодостойкость теплолюбивых растений можно также повысить *предпосевным закаливанием*. Для этого наклюнувшиеся семена (например, огурцов, томатов) в течение нескольких суток выдерживают в чередующихся (через 12 ч) условиях низких положительных (около 5 °С) и более высоких (10—20 °С) температур. Таким же образом можно закалять и рассаду. Обычное время для закаливания, например, картофеля составляет 15 дней обработки низкими положительными температурами. После такой закалки растения картофеля хорошо переносят даже слабые заморозки. В процессе закаливания изменяется гормональный баланс растения, происходит торможение ростовых процессов, возрастает количество ненасыщенных жирных кислот, включаются механизмы защиты клеток от обезвоживания и замерзания.

Главной причиной повреждающего действия низких положительных температур является нарушение функционирования клеточных мембран из-за их "затвердевания", свя-

занного с фазовыми переходами жирных кислот (при низких температурах липидные бислои ведут себя, как твердые тела). При температуре выше фазового перехода структура бислоя сохраняется, однако при этом жирные кислоты "плавятся", в результате чего подвижность мембранных молекул выше, чем при низких температурах.

Затвердевание или "плавление" мембранных липидов определяется *жирными кислотами*, которые входят в состав мембранных фосфолипидов. Для насыщенных жирных кислот с длинной цепью характерны более высокие температуры фазовых переходов. Однако фазовые переходы в мембране индуцируются не только изменениями температуры. Они могут быть вызваны сдвигами pH и мембранного потенциала, двухвалентными катионами и гормонами.

У *холодостойких растений* содержание ненасыщенных жирных кислот (линоленовой и линолевой) выше, чем у растений, чувствительных к холоду. Увеличение количества ненасыщенных жирных кислот приводит к снижению температуры фазового перехода мембранных липидов.

У растений, *чувствительных к холоду*, в составе мембранных липидов велико содержание насыщенных жирных кислот (пальмитиновой, стеариновой). Мембраны такого типа стремятся к затвердеванию до квазикристаллического состояния уже при низких положительных температурах. При этом они становятся менее текучими, что нарушает функционирование многих белков — каналов, переносчиков, рецепторов, ферментов.

13.2.2. Морозоустойчивость

Заморозки вызывают повреждение клеток кристаллами льда, образующимися при температуре ниже 0 °С. Повреждающий эффект усугубляется также обезвоживанием тканей, которое при этом происходит. На первых этапах замерзания сильных повреждений растительных клеток не наблюдается, т. к. вначале кристаллы льда формируются в межклетниках и сосудах ксилемы. Если же заморозки длятся долго, вода переходит из цитоплазмы в апопласт, клетки обезвоживаются, кристаллы льда растут и повреждают их.

Для предотвращения замерзания в растительных клетках и тканях функционирует система *антифризов*, представленная различными белками, углеводами и гликопротеинами. *Криопротекторы*, синтезирующиеся в растительных клетках при понижении температуры, могут предотвратить или резко замедлить рост кристаллов льда. Гидрофильные белки, моно- и олигосахариды, обладающие криопротекторным эффектом, способны связывать значительные количества воды. Связанная таким образом вода уже не замерзает и не транспортируется. Криопротекторы начинают синтезироваться прежде всего в эпидермисе и клетках, окружающих межклеточные полости, где происходит наиболее интенсивное образование кристаллов льда при замерзании тканей. Криопротекторы способны стабилизировать другие белки и клеточные мембраны при дегидратации клеток, инициированной низкими температурами.

Важная роль в адаптации растений к низким температурам принадлежит фитогормону АБК. Устойчивость многих растений к заморозкам может быть повышена не только закаливанием, но также обработкой их АБК. При воздействии низких положительных температур и (или) при уменьшении светового периода концентрация этого гормона в растительных тканях резко возрастает. Мутанты арабидопсиса, нечувствительные к АБК (*abi1*) или с нарушенным синтезом АБК (*aba-1*), не могут приспособиться к заморозкам и не закаливаются.

Активность многих генов и белков, которые экспрессируются при низкой температуре или водном дефиците, может быть индуцирована обработкой АБК. К таким белкам, как уже упоминалось в *разд. 13.1*, относится семейство RAB/LEA/DHN. Эти белки синтезируются при созревании семян, водном дефиците и обработке растений АБК. Считается, что именно эта группа белков обеспечивает защиту клетки при обезвоживании и заморозках, стабилизируя другие белки и клеточные мембраны. LEA-белки очень гидрофильны, способны прочно удерживать воду и сохраняют свою структуру при резких колебаниях температуры.

У морозостойких растений при действии низких температур усиливается гидролиз крахмала и накопление в цитоплазме растворимых сахаров. У озимых форм пшеницы и многих других видов растений функцию криопротектора выполняет сахароза, накапливающаяся в больших концентрациях. В качестве антифризов могут также выступать и другие растворимые сахара — рафиноза, фруктозиды, сорбит или маннит, которые накапливаются в клеточных стенках растений и предотвращают образование кристаллов льда.

Наиболее чувствительны к морозу корни, корневища, клубни и луковицы большинства растений, которые повреждаются при температуре ниже $-10...-15$ °С. Покоящиеся почки древесных растений способны выдерживать морозы до $-25...-30$ °С. У многолетних растений, устойчивых к заморозкам, в период подготовки к зиме в клубнях, луковицах и корневищах накапливаются запасные вещества, которые начинают использоваться с началом вегетационного периода.

13.3. Тепловой стресс

Только несколько видов высших растений могут постоянно существовать при температуре выше 45 °С. При высоких температурах способны выживать лишь нерастущие и обезвоженные клетки или ткани, например семена и пыльца. Активно вегетирующие ткани редко выживают при температурах более 45 °С, в то время как сухие семена и пыльца некоторых видов могут выдерживать температуру 120 и 70 °С соответственно.

К высоким температурам хорошо приспособились некоторые суккуленты, для которых характерен САМ-тип углеродного метаболизма. Поскольку у этих растений устьица днем закрыты, они не могут регулировать температуру за счет транспирации, но способны выдерживать перегрев до 60—65 °С. Тепловой стресс представ-

ляет потенциальную угрозу при выращивании растений в теплице, где в условиях высокой влажности и неподвижного воздуха плохо функционирует система естественного охлаждения растений путем транспирации.

Одной из основных причин *теплового шока*, вызываемого высокими температурами, является потеря воды растительными тканями. Вероятно, поэтому продуктивность различных сортов сельскохозяйственных культур (например, хлопка и пшеницы) тем выше, чем больше устьичное сопротивление и соответственно меньше потери воды при транспирации.

При перегреве растительных тканей в первую очередь повреждаются белки и мембраны. Повышается степень ненасыщенности жирных кислот, входящих в состав мембранных липидов, и их текучесть. Снижается способность к образованию водородных и ионных связей между полярными группами биополимеров. Происходит нарушение системы слабых взаимодействий, обеспечивающих поддержание пространственной структуры в белковых молекулах и мембранных липидах. Интегральные мембранные белки стремятся целиком перейти в гидрофобную фазу мембраны, что сказывается на процессах мембранного транспорта, рецепции, энергетике. В результате нарушения структуры электрон-транспортной цепи хлоропластов и митохондрий угнетаются процессы фотосинтеза и дыхания.

Наиболее чувствителен к высоким температурам процесс фотосинтеза. Температуру, при которой количество CO_2 , фиксированного при фотосинтезе, равно количеству CO_2 , выделяемого при дыхании, называют *температурным компенсационным пунктом*. Выше этой температуры процесс фотосинтеза уже не способен обеспечивать потребности растения в ассимилятах на дыхание. Количество углеводов начинает снижаться, а формирующиеся при этом плоды теряют сладость.

Белки теплового шока. Одним из основных элементов адаптации растительных организмов к перегреву являются *белки теплового шока*, которые синтезируются при повышении температуры и помогают растениям выдерживать этот тип стрессового воздействия. Впервые они были выявлены у дрозофилы, позже идентифицированы у животных (включая человека), микроорганизмов и растений.

Если клетки или проростки растений быстро нагреть до температуры 40 °С, синтез большинства мРНК и белков будет подавлен. Именно в этих условиях происходит активация синтеза около 30—50 белков, называемых белками теплового шока (БТШ). Новые транскрипты БТШ, т. е. соответствующие мРНК, обнаруживаются уже через 3—5 мин после воздействия высоких температур. Их образование наблюдается также и в естественных условиях при постепенном повышении температуры.

Для растительных организмов характерно накопление низкомолекулярных БТШ (от 15 до 31 кДа) (рис. 13.1). После их синтеза отдельные клетки и целый растительный организм приобретают устойчивость к повышенным температурам и даже к таким, которые ранее были летальными. Нарушения в синтезе БТШ, как правило, лишают растения устойчивости к тепловому шоку. В экспериментах *in vitro* выяв-

лено, что белковые фракции, обогащенные БТШ с молекулярной массой 15 и 18 кДа, обладают высокой устойчивостью к повышенной температуре и предотвращают денатурацию других белков при нагревании.

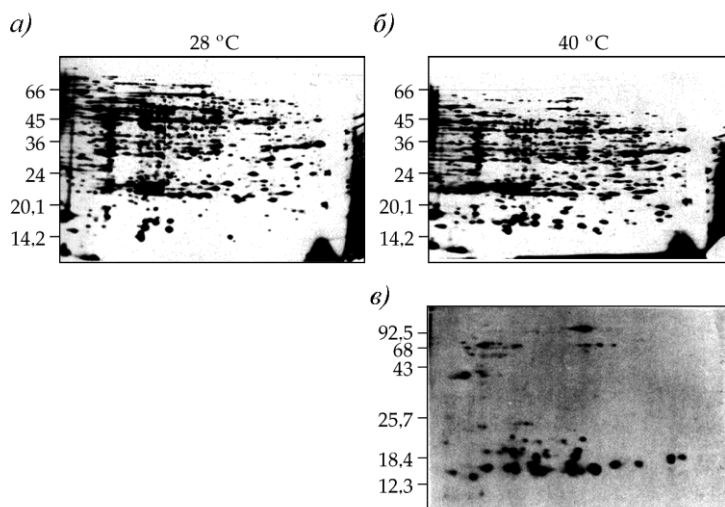


Рис. 13.1. Синтез низкомолекулярных белков теплового шока в растениях сои (Mansfield, Key, 1987): *а* и *б* — хроматограммы белков, которые синтезируются при 28 и 40 °C соответственно; *в* — хроматограмма, на которой показаны только те белки, которые синтезируются при 40 °C. Цифры на оси ординат — молекулярные массы белков

Некоторые БТШ не имеют отношения к тепловому шоку, а инициируются другими типами стрессовых воздействий (засухой, низкими температурами, механическими повреждениями, засолением) и обработкой АБК. Таким образом, клетки, подвергшиеся воздействию одного вида стресса, приобретают устойчивость (через образование БТШ) к другим повреждающим факторам, т. е. происходит *кросс-адаптация*. Например, тепловой шок (48 ч при 38 °C) стимулирует образование ряда БТШ у томатов, что позволяет им без заметных повреждений выдерживать почти 3-недельное пребывание при температуре 2 °C.

Многие БТШ обнаруживаются и в нестрессированных клетках. Различные виды БТШ и их гомологи обнаружены в ядре, митохондриях, хлоропластах, эндоплазматическом ретикулуме, цитоплазме. Выявлено, что БТШ с молекулярной массой 60, 70, 90 кДа и другие работают как *молекулярные шапероны*, обеспечивая посттрансляционное хранение, созревание (*процессинг*) и пространственную укладку (*фолдинг*) единичных белков, а также сборку олигомеров белковых молекул. Некоторые БТШ обеспечивают мембранный транспорт полипептидов в клеточные компартменты и защиту от протеазной активности. Ряд БТШ обладает способностью временно связываться с некоторыми ферментами и высвобождать их только на определенной стадии развития клетки, когда необходимо проявление энзиматической активности.

13.4. Адаптация растений к засолению

В зависимости от типа анионов выделяют хлоридный, сульфатный, хлоридно-сульфатный и карбонатный типы засоления почв. Растения, приспособленные к существованию в условиях избыточного засоления, называют *галофитами* (от греч. *galos* — соль). Галофиты (в отличие от *гликофитов* — растений незасоленных почв и водоемов) способны противостоять засолению путем концентрирования избытка солей в вакуоли или выведения их наружу с помощью солевых железок (см. разд. 7.2.3). Галофиты способны нормально развиваться на растворах с содержанием хлорида натрия от 100 до 500 ммоль/л (рис. 13.2).

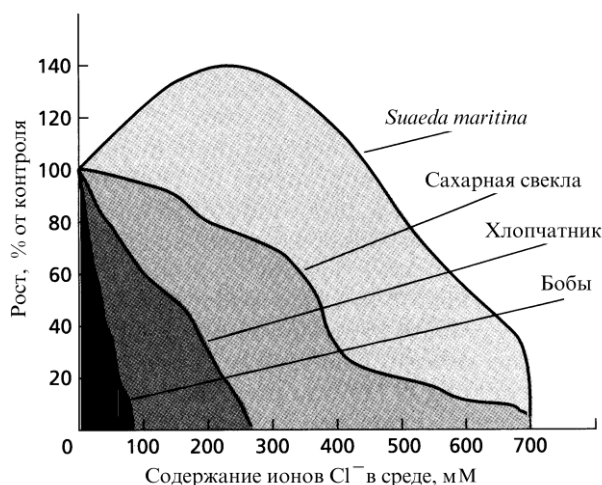


Рис. 13.2. Зависимость роста различных видов растений от концентрации хлорида натрия в среде (Greenway, Munns, 1980)

Высокие концентрации ионов Na^+ могут не только повреждать растения, но и нарушать структуру почвы. При засолении у гликофитов в первую очередь подавляются ростовые процессы и фотосинтез. К весьма чувствительным к засолению сельскохозяйственным видам растений относятся кукуруза, фасоль, бобы, салат, цитрусовые. Эти растения повреждаются при незначительном превышении (от нормы) содержания солей в среде выращивания (например, при концентрации хлорида натрия в питательном растворе 50 мМ наблюдается почти 50%-е угнетение скорости ростовых процессов). Однако ряд растений-галофитов обладают повышенной устойчивостью к избытку солей. Относительно солеустойчивыми являются, например, сахарная свекла, хлопчатник, ячмень, томаты.

Повреждающий эффект избыточной концентрации солей объясняется как осмотическими эффектами, так и специфическим влиянием отдельных ионов. Засоление вызывает прежде всего нарушение водного и минерального обмена растения.

Повреждения, вызываемые засолением, сходны с теми, что наблюдаются при засухе. Цитоплазма клеток высших растений обычно содержит 100—200 мМ ионов K^+ и 1—10 мМ ионов Na^+ . При засолении происходит повышение концентрации натрия и других ионов в цитоплазме, что приводит к инаktivации многих ферментов и подавлению синтеза белков.

Растения используют различные способы выживания в условиях засоления. Основной стратегией снижения повреждающего эффекта является изолирование меристем (особенно побеговых) и листьев от воздействия солей в высоких концентрациях. Транспорт солей в растение целиком определяется способностью клеток коры корня противостоять засолению. Плазмалемма клеток корней имеет низкую проницаемость для ионов Cl^- . Натрий же поступает в клетки корней пассивно по градиенту электрохимического потенциала (в отличие от ионов Cl^-). Процесс активного выведения ионов Na^+ из корня обеспечивают мембранные переносчики, функционирующие с затратой энергии (рис. 13.3).

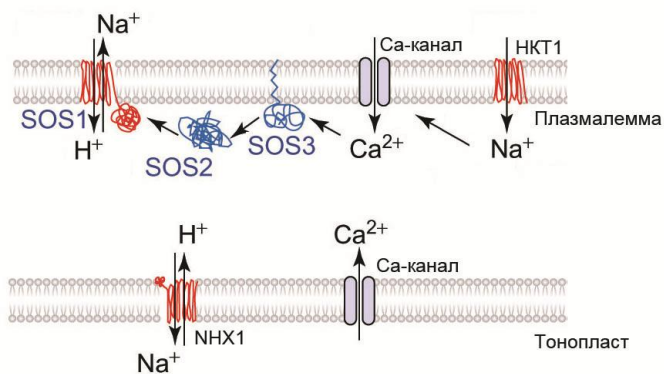


Рис. 13.3. Схема передачи сигналов при засолении у арабидопсиса (по Ward et al., 2003, с изменениями): SOS3 — Ca-сенсор; SOS2 — Ca-зависимая протеинкиназа; SOS1 — H^+/Na^+ -антипортер плазмалеммы; NHX1 — вакуолярный H^+/Na^+ -обменник; HKT1 — Na-транспортер (канал) плазмалеммы

В работе Лиу и Жу (Liu, Zhu, 1998) удалось выявить три белка, которые принимают участие в адаптации растений арабидопсиса к солевому стрессу, которые они назвали SOS3, SOS2 и SOS1. Белок SOS3 (salt-overly-sensitive) является Ca-сенсором и содержит три домена (EF-руки) для связывания ионов Ca^{2+} (рис. 13.3). Белок SOS2 является Ca-зависимой протеинкиназой, а белок-переносчик SOS1 выполняет функции H^+/Na^+ -антипортера плазмалеммы.

На рис. 13.3 показана схема передачи сигналов при засолении у арабидопсиса. Повышение уровня ионов Na^+ индуцирует поток кальция через Ca^{2+} -каналы

плазмалеммы, связывание ионов Ca^{2+} с кальциевым сенсором SOS3, активацию Са-зависимой протеинкиназы SOS2, которая фосфорилирует и активирует работу H^+/Na^+ -антипортера (SOS1), выкачивающего натрий в апопласт. Помимо системы из трех SOS-белков, на тонопласте функционирует H^+/Na^+ -антипортер (NHX1), который закачивает натрий в вакуоль.

Транспорт солей в сосуды ксилемы и далее в надземную часть растения ограничивают *пояски Каспари*. Поглощаемые соли могут концентрироваться в вакуолях клеток. Растительные организмы способны корректировать (снижать) водный потенциал клеток при осмотическом стрессе путем дополнительного синтеза таких веществ, как глицинбетаин, пролин, сорбит, сахароза. Количество этих веществ может достигать 10% веса растения. При засолении начинают экспрессироваться гены, кодирующие ферменты синтеза пролина и бетаина. Осмотический шок может активировать гены, кодирующие ферменты САМ-пути углеродного метаболизма и аквапорины.

Одновременное участие нескольких генов в адаптации к стрессовым воздействиям свидетельствует о том, что различные гены, отвечающие за устойчивость растений, должны иметь общие регуляторные элементы. Изучение промотора стресс-индуцированных генов, экспрессирующихся в ответ на различные стрессовые сигналы, позволило выявить такие нуклеотидные последовательности. Наиболее хорошо изучен ген *RD29*, который активируется при осмотическом шоке, охлаждении, водном дефиците и обработке АБК (Nakashima, Yamaguchi-Shinozaki, 2006). В промоторной области этого гена выявлены нуклеотидные последовательности (response elements), которые позволяют отвечать на АБК (ABRE) и осмотический шок (DRE).

13.5. Адаптация растений к недостатку кислорода

Корневая система растений обычно получает кислород прямо из почвы. В хорошо дренированных почвах O_2 способен диффундировать на глубину до нескольких метров, поэтому содержание кислорода в газовой фазе почвы практически такое же, как во влажном воздухе. Однако при затоплении и заболачивании корни испытывают недостаток кислорода, тем более что скорость его диффузии в водной среде невелика. При этом кислород также необходим для дыхания различным другим почвенным организмам. Гипоксия резко угнетает рост и развитие многих видов растений, однако некоторые из них (например, рис и ива) очень устойчивы к дефициту кислорода.

Различают условия *гипоксии*, т. е. частичного дефицита кислорода, и *аноксии* — полного отсутствия O_2 в среде. Большинство растительных клеток и тканей не могут выживать в условиях длительного анаэробнозиса. В отсутствие O_2 перестают функционировать цикл Кребса и окислительное фосфорилирование. Единственным

способом получения АТФ в условиях аноксии является гликолиз. В анаэробных условиях для активного функционирования гликолиза наиболее важен процесс окисления НАДН, который образуется при брожении. При молочнокислом брожении в тканях накапливается молочная кислота (лактат), вызывающая повышение кислотности цитоплазмы (*ацидоз*). При снижении рН процесс брожения переключается на образование этилового спирта (в кислой среде подавляется активность лактатдегидрогеназы, но возрастает активность лактатдекарбоксилазы). У неповрежденных клеток кислотность вакуолярного содержимого (рН 5,8) гораздо выше, чем цитоплазмы (рН 7,4). При анаэробнозе протоны выходят из вакуоли в цитоплазму и повышают ее кислотность. Именно ацидоз является начальным этапом необратимых нарушений клеточного метаболизма и гибели клетки.

Несмотря на низкую энергетическую эффективность гликолиза, его роль для временного переживания анаэробных условий чрезвычайно велика, особенно, если имеется система детоксикации образующихся при этом продуктов — молочной кислоты и этилового спирта (Чиркова, 2002). Детоксикация состоит как в удалении, так и во включении их в обмен веществ. Поэтому способность получать АТФ путем гликолиза и брожения будет зависеть от способности клеток выделять образующийся лактат во внешнюю среду, что позволяет снижать подкисление цитоплазмы. У устойчивых к анаэробнозу растений окисление НАДН, возможно, происходит также за счет обращения дикарбоновой части цикла Кребса в малатдегидрогеназной реакции.

Корни, находящиеся в условиях аноксии или гипоксии, утрачивают способность к эффективному поглощению элементов минерального питания и воды и снабжению ими надземных органов растения. При этом может наблюдаться временное снижение водного потенциала и завядание, которое быстро прекращается, т. к. вскоре происходит закрывание устьиц, что предотвращает потерю воды за счет транспирации. Однако у некоторых видов растений (горох, томаты) аноксия вызывает закрывание устьиц сразу же, без снижения водного потенциала тканей. Это объясняется тем, что при затоплении, как и при дефиците воды, активируется синтез фитогормона АБК и транспорт его в молодые листья, как из корневой системы, так и из старых подвядших листьев.

Гипоксия индуцирует синтез в корнях предшественника этилена — аминоклопропанкарбоновой кислоты, которая по ксилеме передвигается в надземную часть, где с участием кислорода превращается в этилен (*см. разд. 8.6*). Именно повышение концентрации этилена является причиной *эпинастии* — опускания листовых пластинок вниз. Эпинастия наблюдается при попадании корневой системы растения в анаэробные условия.

Водные растения очень хорошо приспособились к постоянному дефициту кислорода в корневой системе. Даже если в воду немного погружены и побеги, они не испытывают видимых признаков стресса. У некоторых видов водных растений, например у водной лилии *Nymphoides peltata*, при погружении в воду начинает выделяться этилен, который стимулирует интенсивный рост клеток молодых черешков. В результате листья очень быстро оказываются на поверхности воды

в воздухе. Сходным путем осуществляется регуляция роста междоузлий растений риса при их затоплении.

В стеблях и корнях водных растений, а также растений, приспособленных к условиям затопления, за счет ткани, которая называется *аэренхимой*, формируется система межклеточных воздушных полостей, пронизывающая практически все растение (рис. 13.4). По этим воздушным ходам обеспечивается передвижение воздуха от устьиц до клеток корней. Благодаря такому строению стебли водных растений значительно легче, чем наземных. Такая же система воздушных полостей образуется (независимо от внешних воздействий) в растениях риса, что позволяет его корням функционировать в анаэробных условиях на глубине 50 см и более. В корнях риса и других растений, хорошо выдерживающих условия затопления, имеются также структурные барьеры, представленные суберинизированными и лигнифицированными клетками, которые препятствуют диффузии кислорода из тканей корня в почву.

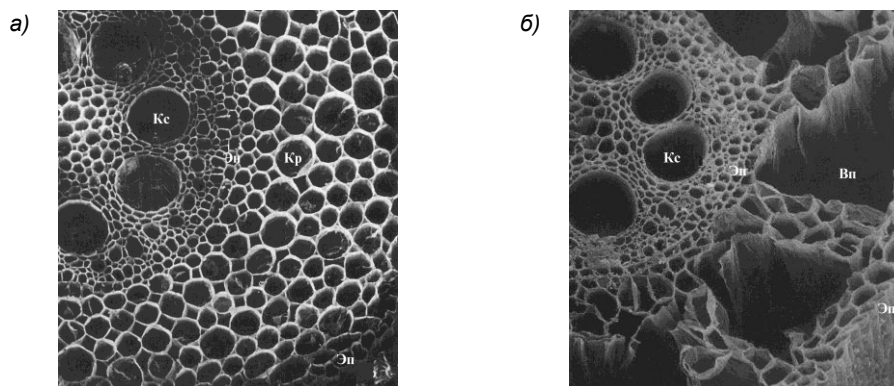


Рис. 13.4. Влияние гипоксии на формирование аэренхимы в корне кукурузы (Drew et al., 2000): *а* — нормальная аэрация раствора; *б* — неаэрируемый питательный раствор. Кс — сосуды ксилемы; Эн — эндодерма; Кр — клетки коры; Вп — воздушные полости (аэренхима); Эп — эпидерма

Когда корневая система растений попадает в условия аноксии, синтез большинства белков прекращается, за исключением около 20 полипептидов. К этим полипептидам, называемым *белками анаэробного стресса*, относятся главным образом ферменты гликолиза и брожения. Важным элементом в системе активации генов, продукты которых позволяют растениям адаптироваться к дефициту кислорода, являются колебания концентрации ионизированного кальция в цитоплазме. Одна из наиболее ранних реакций в ответ на аноксию — поступление ионов Ca^{2+} по Са-каналам из митохондрий и некоторых других органелл в цитоплазму. Уже через несколько минут после воздействия аноксией в цитоплазме клеток кукурузы в культуре регистрируется увеличение содержания ионов Ca^{2+} и количества мРНК одного из основных ферментов брожения — алкогольдегидрогеназы.

13.6. Окислительный стресс

Окислительный стресс возникает в условиях, способствующих образованию активных форм кислорода (АФК), которые постоянно возникают в ходе окислительно-восстановительных процессов. Повышение уровня АФК приводит к *оксидативному (окислительному) стрессу*. У растительных организмов образование АФК возрастает при старении тканей, а также при стрессовых ситуациях — засухе, низких температурах, засолении, механических повреждениях, атаке патогенов, воздействии ксенобиотиками, облучении ультрафиолетом.

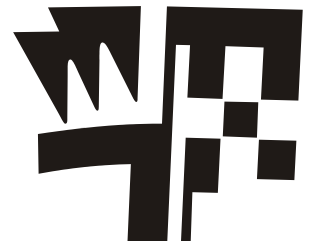
Ранее (см. разд. 3.13) уже упоминалось, что в большинстве случаев продуцируется супероксидрадикал ($O_2^{\cdot-}$), который быстро превращается в другие АФК — пероксид водорода (H_2O_2) и гидроксилрадикал ($\cdot OH$). К АФК относят также другие химически активные кислородсодержащие соединения, в частности — перекиси и синглетный кислород (1O_2).

Высокое содержание АФК приводит к повреждению липидов, белков, нуклеиновых кислот и других органических соединений. Процесс образования большого количества АФК называют *окислительным взрывом*. АФК способны индуцировать цепные реакции, приводящие к образованию большого количества свободных радикалов, вызывающих гибель клеток.

Самой "опасной" формой АФК является гидроксилрадикал, который способен окислять практически любые соединения. Поскольку время жизни $\cdot OH$ чрезвычайно мало, он не может диффундировать на большие расстояния и проявляет свою активность только в местах своего образования. Поскольку гидроксилрадикал чрезвычайно активен, "бороться" с ним невозможно. Поэтому работа антиоксидантной системы направлена на нейтрализацию таких АФК, как $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 и 1O_2 .

Система антиоксидантной защиты клетки состоит из ферментов (супероксиддисмутазы, каталаза, различные формы пероксидаз), а также низкомолекулярных гидрофильных (аскорбат, глутатион) и гидрофобных (токоферолы, каротиноиды) соединений.

Следует отметить, что АФК являются продуктами нормальной жизнедеятельности клетки, а в ряде сигнальных путей они могут даже выполнять функции вторичных посредников. АФК образуются в электрон-транспортных цепях митохондрий и хлоропластов, в пероксисомах и глиоксисомах, при взаимодействии озона с кислородом в клетках растений, а также в реакции сверхчувствительности.



Глава 14

Защита растений от патогенов и фитофагов

Очевидное — это то, чего никогда не видишь, пока кто-нибудь не сформулирует это достаточно просто.

К. Гибран

Растительные организмы в естественных условиях постоянно сталкиваются с многочисленными врагами. На ранних этапах развития растения сразу же подвергаются нападению со стороны вирусов, бактерий, паразитических грибов, насекомых, клещей, нематод и других патогенов и вредителей. Позже к этим врагам присоединяются еще и травоядные животные. Чтобы выжить и завершить свой жизненный цикл, растения в процессе эволюции должны были вооружиться различными защитными механизмами, которые позволяли бы им либо избегать паразитов и вредителей, либо отпугивать их.

Для защиты от потенциальных вредителей и болезней у растений имеется большой арсенал приспособлений. Хорошим барьером для некоторых бактерий и грибов являются кутикула и перидерма. Шипы и жгучие волоски надежно защищают растения от крупных животных, однако они имеются не у всех видов растений и бесполезны против мелких вредителей и патогенов. Главным же оружием у всех растений служит химическая система защиты, которая насчитывает тысячи разнообразных соединений вторичного происхождения (см. главу 15). Именно вторичные соединения обеспечивают основную защиту растения от поедания животными и инфицирования патогенами. Селекция же большинства культурных растений велась по пути снижения содержания веществ вторичного происхождения, что, естественно, сказывалось на их устойчивости к насекомым и болезням.

Механизмы, лежащие в основе устойчивости или восприимчивости растений к болезням, являются предметом изучения *фитопатологии* — науки о взаимоотношениях в системе "растение—патоген". Качественный прорыв в этих исследованиях был сделан Г. Флором (H. Flor), который изучал взаимоотношения между различными сортами льна и разными расами гриба возбудителя ржавчины льна *Melampsora lini*. В 1956 г. он выдвинул концепцию, согласно которой взаимодействие между растением и патогеном осуществляется по принципу "ген-на-ген". У растений такие гены получили название *генов устойчивости*, а у патогенов — *генов вирулентности* или *авирулентности*.

Патогены растений, как правило, делятся на нектотрофы и биотрофы. *Нектотрофы* сначала уничтожают клетки растений фитотоксинами, а уже после этого питаются их содержимым. *Биотрофы* извлекают питательные вещества из клеток растения-хозяина через специализированные структуры, внедряющиеся в живые ткани, но не повреждающие их. Существует также большая группа растительных патогенов, называемых *хемибиотрофами*, которые (в зависимости от стадии их жизненного цикла) могут быть как биотрофами, так и нектотрофами.

Исход взаимодействия в системе "растение—патоген" определяется главным образом двумя обстоятельствами: во-первых, способностью патогена синтезировать специфические токсины и, во-вторых, способностью растения узнавать специфические и нетоксичные для него метаболиты патогена. Исходя из этого, в процессе инфицирования события развиваются по двум сценариям. В том случае, когда патоген синтезирует специфичные для некоторых растений токсины (этот процесс контролируют гены вирулентности), наблюдается гибель клеток и всего растения. При втором варианте взаимодействия растительные клетки распознают патоген (по продуктам генов авирулентности) и гибнут вместе с ним раньше, чем патоген успевает распространиться по ткани. Такой способ защиты растений (контролируемый их генами устойчивости) называют *реакцией сверхчувствительности*, и он характерен для устойчивых видов и сортов растений.

14.1. Видовой иммунитет

Впервые понятие "*видовой иммунитет*" было предложено Н. И. Вавиловым. Видовой иммунитет выражается в том, что каждый вид растений обладает устойчивостью к подавляющему большинству потенциально опасных патогенов. Однако некоторые виды паразитов длительным эволюционным путем приспособились обходить видовой иммунитет растения и стали патогенными (вирулентными) для него. Такие виды патогенов обладают способностью поражать только определенные виды растений. Наиболее важным фактором для проявления патогенности является соответствие между пищевыми потребностями патогена и составом питательных веществ в растении-хозяине.

К подавляющему большинству патогенов у растений имеется *врожденный иммунитет*. Почти непреодолимым барьером для многих патогенов, не обладающих специальными приспособлениями для активного проникновения, служат покровы и клеточная стенка растений. И только их повреждение может открыть паразиту доступ к внутренним тканям.

Причиной видовой иммунитетта растения часто является его пищевая непригодность для патогена. Это может определяться наличием токсических соединений, отсутствием или низким содержанием в тканях растения веществ, например стериннов, необходимых для нормального развития паразита или фитофага.

Растения обладают большим спектром токсических соединений, которые все время присутствуют в тканях независимо от того, подвергались они инфицированию или нет.

Некоторые из них (например, сапонины) постоянно находятся в активной форме, другие же хранятся в виде неактивных предшественников в вакуоли (цианогенные гликозиды, глюкозинолаты) и активируются только при повреждении клеток (см. разд. 15.4). Синтез таких прототоксинов, которые было предложено называть *фитоантисипинами*, осуществляется цитоплазматическими ферментами, которые активируются при повреждении тканей патогеном. Именно фитоантисипины часто выступают в качестве первого химического барьера на пути проникновения патогена.

14.2. Реакция сверхчувствительности

Одним из самых эффективных способов защиты растительных организмов от повреждения является *реакция сверхчувствительности* (СВЧ), т. е. быстрая локальная гибель инфицированных растительных клеток вместе с патогеном, что, в конечном счете, обеспечивает устойчивость всего растения (рис. 14.1).

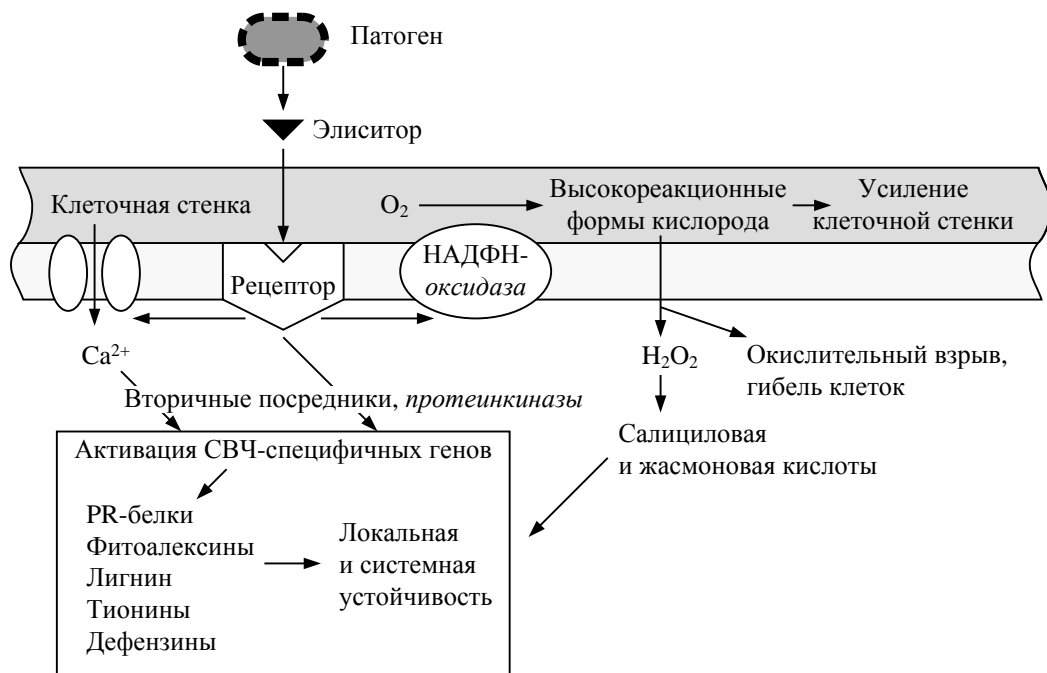


Рис. 14.1. Последовательность событий в ходе реакции сверхчувствительности (Bradley et al., 1992, с изменениями)

Реакция СВЧ запускается путем контакта растения с патогеном. В том случае, когда несколько растительных клеток быстро распознают патоген и погибают вместе с ним, выживает целый организм. Если же клеткам долгое время не удастся идентифицировать природу патогена и выработать адекватные меры защиты, растение

погибает. Поэтому самым важным этапом во взаимодействии растения с патогеном является процесс распознавания паразита, поскольку растения обычно чувствительны к атаке только определенных видов патогенов, но устойчивы к другим. Специфичность взаимодействия определяется белковыми продуктами *генов устойчивости* (R-генов) растения-хозяина и *генов авирулентности* (*avr*-генов) патогена. Каждому гену авирулентности патогена соответствует свой ген устойчивости растения.

Успех в выживании зависит прежде всего от того, насколько быстро растение распознает продукты *avr*-генов патогена. Продуктами *avr*-генов являются вещества, называемые *элиситорами* (elicitate — вызывать) и способные индуцировать реакцию СВЧ. К ним относятся белки, пептиды, липиды и полисахаридные фрагменты клеточных стенок патогена. Различают специфические и неспецифические элиситоры: специфические контролируются *avr*-генами и характерны только для определенных патогенов, неспецифические имеются у различных типов патогенов. Функции элиситоров могут выполнять, например, *остатки галактуроновой кислоты*, которые образуются при расщеплении клеточной стенки растений под действием пектиназы, выделяемой грибами, а также олигомеры хитина — *хитозаны*, которые образуются под действием ферментов (хитиназа, глюканаза), выделяемых клетками растений (рис. 14.2).

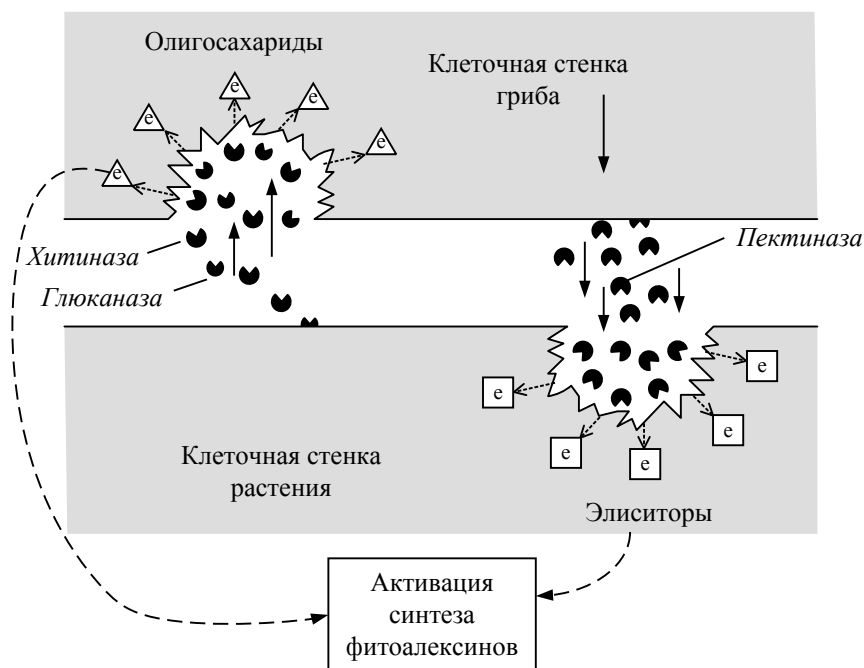


Рис. 14.2. Механизм образования элиситоров (e) в ходе грибной инфекции (Brett, Waldron, 1996). В квадратиках — остатки галактуроновой кислоты, в треугольниках — хитозаны

Гены устойчивости (R-гены) отвечают за рецепцию элиситоров или передачу сигнала об инфицировании на системы, обеспечивающие специфическую защиту растения от конкретного патогена. Выделено большое количество R-генов, которые защищают растения от грибов, бактерий, нематод. Белки, являющиеся продуктами R-генов и называемые R-белками, могут быть локализованы по всей цепи рецепции и передачи сигнала — в мембране, цитоплазме и ядре клетки. Поскольку для растительных R-генов характерна высокая степень гомологии, кодируемые ими белки обладают сходной структурой и свойствами.

Элиситоры, как правило, способны индуцировать реакцию СВЧ без непосредственного контакта растительных клеток с патогеном. После взаимодействия элиситоров с рецепторами растительной клетки запускается каскад процессов, результатом которого является синтез соединений, токсичных и для патогена, и для растительной клетки (рис. 14.1).

Одной из таких мишеней является мультиферментный комплекс *НАДФН-оксидазы* в плазмалемме, который активируется за счет Ca^{2+} -зависимого фосфорилирования и катализирует образование супероксидного анион-радикала — $\text{O}_2^{\cdot-}$ на поверхности клетки. Затем $\text{O}_2^{\cdot-}$ энзиматически и неэнзиматически быстро превращается в другие активные формы кислорода: пероксид водорода (H_2O_2), гидропероксильный радикал (HO_2^{\cdot}), гидроксильный радикал ($\cdot\text{OH}$) (см. разд. 3.13).

Наиболее активные формы кислорода (HO_2^{\cdot} и $\cdot\text{OH}$) способны индуцировать цепные реакции, приводящие к образованию большого количества свободных радикалов, вызывающих переокисление липидов, нарушение целостности мембран, инактивацию ферментов и разрушение нуклеиновых кислот. В ходе реакции СВЧ все эти процессы завершаются появлением некротических пятен, гибелью части клеток растения-хозяина и патогена.

Окислительный взрыв. *Окислительным взрывом* называют процесс образования большого количества активных форм кислорода (АФК) и свободных радикалов на поверхности клетки. Этот процесс является одной из наиболее ранних реакций практически на любые стрессовые воздействия (как биотической, так и абиотической природы). Окислительный стресс представляет собой изменение баланса в организме между образованием активных форм кислорода и активностью антиоксидантной защиты в пользу резкого усиления процесса генерации АФК. Очень часто именно окислительный взрыв служит центральным звеном в системе защитных реакций растительного организма на стрессовые воздействия. В реакции СВЧ окислительный взрыв завершается появлением некротических пятен и гибелью части клеток растения-хозяина, а также патогена.

При этом в некротических участках формируются механические барьеры, препятствующие распространению патогена по тканям. Некротические зоны окружаются слоем *перидермы*, в самой зоне накапливаются токсические соединения, а живые клетки усиливают прочность своих клеточных стенок. Многие виды растений реагируют на грибную или бактериальную инфекцию активацией синтеза лигнина

или каллозы, которые обеспечивают дополнительную прочность и как бы "цементируют" клеточную стенку, препятствуя проникновению патогена. Возрастает также количество гидроксипролин-богатых белков клеточной стенки — *экстенсинов*. Выявлено, что индукция экспрессии некоторых генов, кодирующих экстенсины, осуществляется поранением и/или обработкой элиситорами. При этом под действием пероксида водорода, образующегося в СВЧ-реакции, происходит межмолекулярная "сшивка" полипептидных цепей этих структурных белков в прочную трехмерную сеть, укрепляющую клеточную стенку.

Синтез фитогормонов. Образование при окислительном взрыве больших количеств пероксида водорода также является причиной активации синтеза фитогормонов — салициловой и жасмоновой кислот (см. рис. 14.1).

Повышение содержания *салициловой кислоты* (СК) усиливает реакцию СВЧ, поскольку салицилат является ингибитором каталазы — фермента, расщепляющего пероксид водорода. То есть пероксид водорода, активируя синтез салициловой кислоты, способствует еще большему накоплению активных форм кислорода и таким образом вызывает усиление СВЧ-реакции. По мере затухания реакции СВЧ салициловая кислота переводится в связанную форму, взаимодействуя с глюкозой и образуя гликозиды. Следует отметить, что синтез салициловой кислоты и образование ее конъюгатов — ключевые элементы не только в СВЧ-реакции, но и в формировании системного приобретенного иммунитета растения. Таким образом, в ходе СВЧ-реакции в растении происходит также формирование иммунитета к повторным заражениям (см. разд. 14.3).

Участие салициловой кислоты в СВЧ-реакции также подтверждают эксперименты, показывающие, что при экзогенной обработке СК и ее аналогами — 2,6-дихлороизоникотиновой кислотой или бензотиадиазолом повышается устойчивость растений к патогенам и активируется синтез специфичных для СВЧ-реакции PR-белков, к которым относятся хитиназы, β -1,3-глюканызы, цистеин-богатые белки и ряд других.

При повреждении растений патогенами (или при воздействии элиситоров) в тканях резко возрастает концентрация *жасмоновой кислоты* (ЖсК). Синтез жасмонатов запускается также при поранении растения, например в процессе поедания растений фитофагами (см. разд. 14.4). Поврежденные ткани отличаются очень высокой концентрацией этого фитогормона, что резко повышает устойчивость растений к вредителям.

Синтез ЖсК и метилжасмоната (МеЖсК) может индуцировать большая группа соединений и стимулов: препараты из клеточных стенок дрожжей и *Lactobacillus*, производные клеточной стенки грибов хитозаны, циклические пептиды-антибиотики (полимиксин В, бацитрацин, колистин), полипептид системин, механические повреждения и стимулы, засуха, а также обработка АБК и тяжелыми металлами. При всех вышеперечисленных воздействиях наблюдается очень быстрое (5—45 мин) многократное возрастание уровня ЖсК. При повышении содержания

ЖсК резко активируется синтез вторичных метаболитов, обеспечивающих растениям защиту от патогенов.

Жасмоновая кислота активирует экспрессию ряда генов, продукты которых позволяют растениям адаптироваться к патогенам и механическим повреждениям. К их числу относятся токсичные для патогенов низкомолекулярные цистеин-богатые белки *тионины* и полипептиды *дефензины*, ферменты, участвующие в синтезе фитоалексинов (большой группы метаболитов вторичного происхождения, которые подавляют развитие патогена), гидроксипролин-богатые белки клеточной стенки *экстенсины*. Поэтому обработка растений жасмоновой кислотой резко повышает их устойчивость к повреждениям. Жасмоновая кислота, как и салицилат, является также одним из факторов индукции иммунитета растений к повторным заражениям.

PR-белки. Несмотря на то, что у растений в процессе рецепции патогенов функционирует большое число систем распознавания и передачи сигнала, терминальные этапы трансдукции для различных патогенов во многом одинаковы. На это указывают сходный набор соединений, синтезируемых при СВЧ-реакции, а также универсальность транскрипционных факторов и *цис*-регуляторных элементов, обеспечивающих экспрессию *PR*-генов. В промоторе *PR1*-гена петрушки (гомологичного семейству *PR10*-генов табака) содержится элистор-чувствительный элемент TТGACC. У гена *RD-2d* в промоторной области обнаружен салицилат-чувствительный элемент, содержащий схожую последовательность TCGACC.

Завершающий этап ответных реакций растения на заражение патогенами связан с синтезом большого количества белков и веществ вторичного метаболизма, подавляющих развитие инфекции. Начинают синтезироваться СВЧ-специфичные белки, называемые *PR-белками* (pathogenesis related proteins). Образование именно этой группы белков часто используется как доказательство включения в растении реакции СВЧ. Ряд *PR*-белков являются гидролитическими ферментами, расщепляющими некоторые полимеры клеточных стенок паразитов. Например, β -1,3-хитиназа разрушает хитин грибных патогенов, а β -1,3-глюканаза — глюконовые полисахариды клеточной стенки (см. рис. 14.2). Образующиеся при этом олигосахариды способны индуцировать образование в растениях мощного барьера на пути бактерий и грибов — фитоалексинов. Усиление экспрессии генов, кодирующих ряд *PR*-белков, например хитиназу, β -1,3-глюканазу, индуцируется фитогормоном этиленом.

Фитоалексины представляют собой большую группу метаболитов вторичного происхождения, которые быстро синтезируются в месте инфицирования и подавляют развитие патогена. Синтез фитоалексинов является обязательным критерием наличия реакции СВЧ в ходе патогенеза. В отличие от фитоантисипинов, фитоалексины появляются в растительных тканях только при их повреждении. До инфицирования их в тканях растения нет, но они быстро образуются *de novo* сразу же после воздействия патогена. При этом индуцируется экспрессия генов, кодирующих ферменты, необходимые для синтеза фитоалексинов. Синтез последних — наиболее хорошо изученная ответная реакция растений на заражение грибами

и бактериями. Разные растения используют различные виды вторичных соединений в качестве фитоалексинов. У бобовых это чаще всего *изофлавоноиды*, у пасленовых — *сесквитерпены* (рис. 14.3).

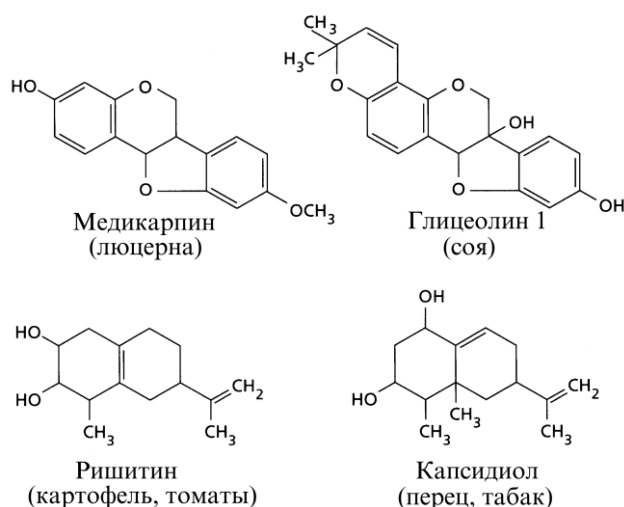


Рис. 14.3. Фитоалексины

Защитные пептиды. Помимо фитоалексинов и PR-белков к химической системе защиты растений относят также токсичные для патогенов пептиды — тионины и дефензины. Низкомолекулярные цистеин-богатые белки *тионины*, обладающие высоким сродством к фосфолипидам, способны вызывать серьезные нарушения в структуре и, как следствие, в проницаемости клеточных мембран. Именно поэтому тионины токсичны не только для бактерий и грибов, но также и для любых других клеток. Небольшие полипептиды *дефензины* синтезируются в растениях в ответ на заражение бактериями или патогенными грибами. Их токсичность объясняют способностью изменять мембранный потенциал клетки. При этом, в отличие от тионинов, не наблюдается нарушения структуры мембран.

14.3. Системный приобретенный иммунитет растений

При инфицировании растения в каком-либо одном месте очень часто происходит формирование устойчивости к последующему нападению во всех тканях и органах организма. Это явление было названо *системной приобретенной устойчивостью* (СПУ или SAR — systemic acquired resistance), или *системным приобретенным иммунитетом*. Важным свойством системного иммунитета является быстрота его появления. При повторном заражении некротические пятна появляются гораздо быстрее, чем при первичном.

Иммунитет развивается в течение нескольких дней и проявляется в повышенной устойчивости всего растения к повторному заражению широким набором видов патогенов (грибы, бактерии, вирусы) и насекомых-фитофагов. Таким образом, особенностью приобретенного иммунитета (в отличие от реакции СВЧ) является его неспецифичность в отношении патогена. Длительность такого иммунитета — от нескольких недель после первичного заражения до нескольких месяцев.

Системная приобретенная устойчивость (СПУ) является результатом повышения содержания определенных защитных соединений, таких как фитоалексины, лигнин, хитиназа и ряд других гидролитических ферментов. Внешне процесс формирования приобретенного иммунитета проявляется в возникновении *некروزов* и выглядит, как реакция сверхчувствительности, только скорость его гораздо выше.

В регуляции процессов системной устойчивости среди фитогормонов наиболее важное значение имеют салициловая и жасмоновая кислоты, а также их метиловые эфиры, которые, являясь летучими соединениями, способны передавать информацию о заражении по воздуху не только к другим органам, но и к соседним неповрежденным растениям.

Ключевая роль в формировании СПУ растений принадлежит салициловой кислоте (рис. 14.4). Образование салицилата предшествует системной иммунизации растения. Экзогенная обработка салициловой кислотой и ее аналогами вызывает формирование системной устойчивости растения, а мутантные растения, не накапливающие салицилат, не способны к иммунизации. Заражение растений несовместимыми патогенами индуцирует накопление салициловой кислоты как в инфицированных, так и в неинфицированных тканях. Избыток салицилата, образовавшийся при заражении, переводится в форму конъюгатов с глюкозой, которые при вторичном поражении гидролизуются до свободной салициловой кислоты.

Наиболее высокий уровень СК обнаруживается внутри и вокруг некротических пятен, которые формируются, например, на листьях табака при повреждении вирусом табачной мозаики (ВТМ). После инфицирования растений табака ВТМ вначале происходит резкое повышение содержания свободной СК, а через 10—15 ч от начала инфицирования свободная СК переходит в связанное состояние. То есть по мере затухания реакции СВЧ салициловая кислота переводится в связанную форму, взаимодействуя с глюкозой и образуя гликозиды. Параллельно с увеличением уровня СК происходит возрастание содержания метилового эфира СК, как в инокулированных, так и в неинокулированных ВТМ листьях табака.

При повышении концентрации салициловой кислоты в растительной ткани индуцируется локальный синтез фитоалексинов, подавляющих развитие патогена, и стимулируются процессы, способствующие укреплению клеточных стенок. Салициловая кислота активирует экспрессию специфичных для системной приобретенной устойчивости *SAR*-генов. Продуктами многих *SAR*-генов являются вышеупомянутые *PR*-белки, образующиеся в реакции сверхчувствительности.

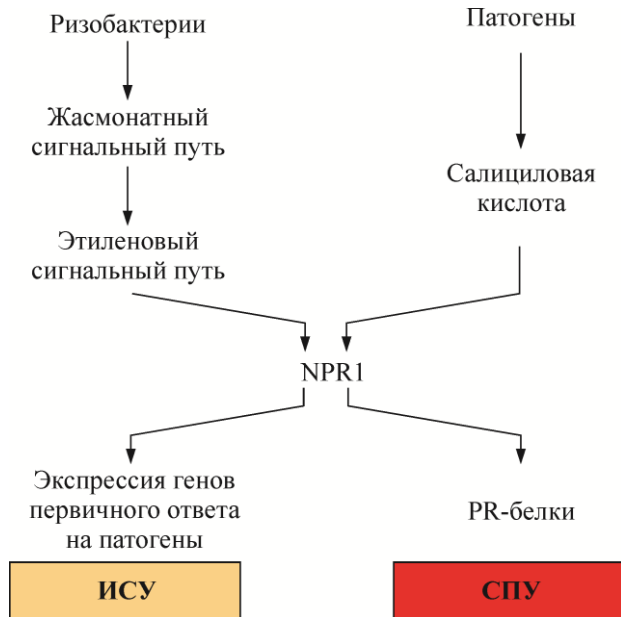


Рис. 14.4. Роль фитогормонов в формировании системной приобретенной устойчивости (СПУ) и индуцируемой системной устойчивости (ИСУ) (по Van Loon et al., 2006, с изменениями): PR (pathogen related) — белки, участвующие в защите от патогенов; NPR1 (non-expressor of PR)

Помимо PR-белков при системной иммунизации растения также синтезируются белки, не связанные с СВЧ-реакцией, например, такие как сериновые протеазы, которые являются ингибиторами протеаз насекомых-фитофагов. Таким образом, происходит формирование устойчивости не только к повторному заражению патогенами, но также и к фитофагам.

14.4. Индуцируемая системная устойчивость растений

Выше уже упоминалось, что в ответ на инфицирование патогенами (как авирулентными, так и ограниченным кругом вирулентных) в растениях может развиваться иммунная реакция, называемая системной приобретенной устойчивостью (СПУ). Специфической характеристикой этого типа устойчивости является синтез салициловой кислоты, индуцированный патогенами. Однако следует иметь в виду, что СПУ развивается при инфицировании только теми патогенами, которые индуцируют основные салицилат-зависимые защитные реакции. К таким патогенам относится, например вирус табачной мозаики (ВТМ). Такой тип индуцируемой устойчивости сопровождается локальным и системным накоплением PR-белков. Однако вновь синтезируемые PR-белки могут быть эффективны и неэффективны против индуцирующих их патогенов.

У растений встречается еще один тип защитных реакций, индуцируемых патогенами, который называют *индуцируемой системной устойчивостью* (ИСУ или ISR — induced systemic resistance). Этот тип защиты растительных организмов наблюдается, в частности, при инокуляции отдельными штаммами ризобактерий (см. рис. 14.4). ИСУ не требует для своей реализации салициловой кислоты, а регулируется такими фитогормонами, как жасмоновая кислота и этилен. ИСУ эффективна против тех патогенов, которые индуцируют жасмонат- и этилен-зависимые защитные механизмы. К таким патогенам относится, например, гриб *Alternaria brassicicola*, растением-хозяином которого является арабидопсис. Этот тип индуцированной устойчивости не связан с индукцией PR-белков.

Некоторые патогены, например *Pseudomonas syringae pv tomato*, способны индуцировать в растениях арабидопсиса комбинацию защитных реакций, в которых участвуют и салицилат-, и жасмонат-, и этилен-зависимые защитные механизмы. Против таких патогенов одновременно включаются механизмы и СПУ, и ИСУ. В результате индукции обоих типов защитных реакций в одном и том же растении резко повышается его способность противостоять патогенезу.

14.5. Устойчивость растений к фитофагам

Несмотря на то, что в ходе биологической эволюции цветковые растения и насекомые появились независимо, они во многом взаимодействовали друг с другом и поэтому эволюционировали совместно. Привлекая ряд насекомых-опылителей, растения в то же время страдают от того, что многие насекомые на них кормятся. Для защиты от насекомых растения располагают широким набором веществ вторичного происхождения, которые делают их для насекомых несъедобными.

Вещества, служащие растениям для защиты от насекомых, очень разнообразны. Среди них имеются яды, способные убить любое животное. Поэтому животные обычно избегают ядовитых растений. Другие вторичные соединения придают растениям неприятный вкус, что также отпугивает травоядных животных. Для животных, как правило, также токсичны присутствующие в растениях многие терпеноиды и эфирные масла, цианогенные гликозиды и некоторые непротеиногенные аминокислоты. Цианогенные гликозиды при повреждении тканей разлагаются с выделением цианистой кислоты, а токсичность непротеиногенных аминокислот связана с тем, что они могут включаться в белки вместо обычных аминокислот и, таким образом, повреждать их.

Важным компонентом защитных реакций растений являются также *ингибиторы ферментов*, участвующих в процессах переваривания пищи насекомыми. У большинства бобовых, например, имеется *ингибитор α -амилазы* — фермента, расщепляющего крахмал. Некоторые другие виды растений синтезируют защитные белки — *лектины*, которые, связываясь с углеводами и гликопротеидами, делают образовавшиеся комплексы неперевариваемыми.

Наиболее изученными факторами растений, которые вызывают несварение у насекомых-фитофагов, являются *ингибиторы протеолитических ферментов (протеаз)*, расщепляющих белки в процессе пищеварения. У насекомых, которые питаются растениями, содержащими ингибиторы протеаз, резко падают темпы роста и развития. В то же время в их пищеварительном тракте происходит накопление непереваренной пищи, что активирует чувствительные к растяжению механорецепторы и вызывает у насекомого чувство насыщения. Ингибиторы протеаз обычно не присутствуют в растениях, а появляются в ответ на повреждение.

Экспрессия генов, что кодирующих ингибиторы протеаз, индуцируется механическим повреждением растений и непосредственно контролируется конъюгатом жасмоновой кислоты с аминокислотой лейцином — *жасмонилизололейцином* (см. разд. 8.8.1). Считается, что активация синтеза ЖсК является ключевым событием, которое позволяет растениям быстро сформировать систему защитных реакций от поедания насекомыми.

Установлено, что жасмоновая кислота (ЖсК) и ее метиловый эфир (МеЖсК) могут синтезироваться при механическом повреждении клеток из линоленовой кислоты, образующейся при распаде фосфолипидов клеточных мембран. Следует отметить, что на синтез ЖсК могут оказывать влияние также другие гормоны и факторы. АБК, этилен, H_2O_2 , ультрафиолет, олигогалактурониды и конъюгаты жирных кислот активируют синтез ЖсК и экспрессию ЖсК-индуцируемых генов, в то время как салициловая кислота и NO подавляют образование ЖсК.

Образование ЖсК в ответ на поранение фитофагами происходит главным образом в сосудистых тканях листа, где локализовано большинство ферментов, принимающих участие в синтезе жасмонатов. Жасмонат транспортируется в неповрежденные участки по флоэме, а метилжасмонат как летучее соединение — по воздуху. Следует отметить, что экзогенный МеЖсК очень быстро связывается растительными клетками и расщепляется эстеразами до свободной жасмоновой кислоты.

В дальнейших исследованиях выяснилось, что экспрессия генов, кодирующих ингибиторы протеаз, контролируется двумя фитогормонами: пептидом *системином* и жасмоновой кислотой. Показано, что у пасленовых системин включается в системную регуляцию более 20 генов, контролирующих устойчивость к повреждению фитофагами, патогенами, поранению, а также к ряду абиотических стрессовых воздействий. Регуляция экспрессии некоторых "защитных" генов системином может осуществляться не только вместе с жасмоновой кислотой, но также и совместно с АБК и этиленом. Образование пептидного гормона системина из его предшественника просистемина является самой ранней реакцией растений на механические повреждения (в том числе и фитофагами).

Экспрессия генов, кодирующих ингибиторы протеаз является результатом целого каскада событий (рис. 14.5). На первом этапе повреждения растений насекомыми синтезируется гормон пептидной природы — *системин*, который транспортируется по флоэме в неповрежденные участки растения, где взаимодействует со своим рецептором. В результате рецепции инициируется процесс расщепления мембранных

липидов и образование линолевой кислоты. Линолевая кислота высвобождается из мембран, превращается в жасмоновую кислоту, а затем в ее конъюгат — изолейцин-жасмонат, который взаимодействует со своим рецептором белком COI1 и запускает экспрессию генов, кодирующих ингибиторы протеаз.

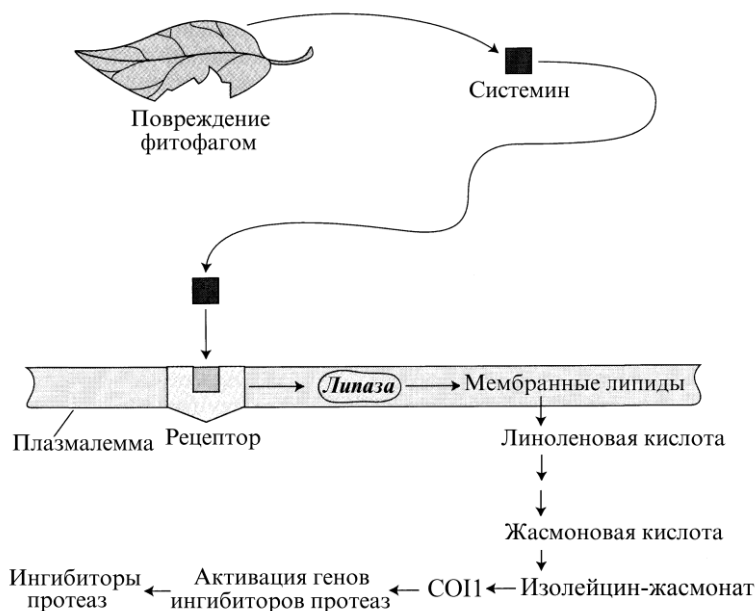


Рис. 14.5. Предполагаемый механизм синтеза ингибиторов протеаз у поврежденных томатов (Pearce et al., 1991, с изменениями): COI1 — рецептор жасмоната; белок F-бокса убиквитин-лигазного комплекса



Глава 15

Вторичный метаболизм растений

Если вы биолог, постарайтесь как можно лучше изучить химию, иначе химики вам не поверят. Если же вы сильны в химии, они вам поверят, даже если вы не правы.

Э. Рэкер

Под *вторичными метаболитами* понимают различные вещества, не участвующие в первичном метаболизме, т. е. в таких процессах, как дыхание, фотосинтез, синтез белков, нуклеиновых кислот и липидов и т. д. Вторичные соединения свойственны не всем растениям или большинству их видов. Очень часто конкретный вторичный метаболит встречается только у растений какого-либо одного семейства или даже одного вида. Синтезируются они, как правило, в меньших количествах, чем вещества основного метаболизма, и необходимы не столько для клеток, в которых синтезируются, сколько для всего организма.

Критерии, по которым какой-либо процесс может быть отнесен к вторичному метаболизму, весьма условны. Ряд веществ вторичного происхождения (фитол, каротиноиды, ароматические аминокислоты, фитогормоны, стероиды и др.) принимают непосредственное участие в основном обмене веществ растительного организма.

Несмотря на то, что были выявлены тысячи веществ вторичного происхождения, долгое время их значение для физиологии растительного организма оставалось непонятным. Выявлено, что 15—25% генов растительных организмов отвечают за вторичный метаболизм растения. Вторичные метаболиты рассматриваются как один из основных элементов взаимодействия растения со средой.

Наиболее важной функцией веществ вторичного происхождения является защита растения от травоядных животных и фитопатогенов. Каким образом растения сформировали такую систему защиты? Предполагается, что при некоторых мутациях могли возникать вещества, токсичные для травоядных животных и патогенов. Если эти мутации передавались по наследству и не наносили вреда основному метаболизму растительного организма, их появление давало преимущество в выживании (по сравнению с другими растениями) и закреплялось в последующих поколениях.

Следует отметить, что появление токсичных соединений и репеллентов (отпугивающих веществ) для травоядных животных и насекомых, грибов и бактерий дела-

ло такие растения несъедобными и для человека. У большинства же культурных видов растений способность к образованию ряда вторичных соединений утрачена в процессе селекции, что лишает их естественной системы защиты от травоядных и патогенов. Поэтому для защиты культурных растений используется обработка химическими препаратами, токсичными, как правило, только для определенной группы вредителей или патогенов. Очень часто основой таких препаратов служат вторичные соединения естественного происхождения.

Вторичный метаболизм растений включает, в основном, синтез трех групп вторичных метаболитов — терпенов, фенолов и алкалоидов (рис. 15.1). Терпены являются производными изопрена и образуются или из ацетил-СоА и мевалоновой кислоты, или из основных продуктов гликолиза — 3-Ф-глицериновой кислоты и/или пирувата. Фенольные соединения являются ароматическими веществами и образуются через шикимовую кислоту и фенилаланин. Азотсодержащие вторичные вещества, такие как алкалоиды, синтезируются в основном из некоторых аминокислот. Известно также несколько минорных групп вторичных метаболитов.

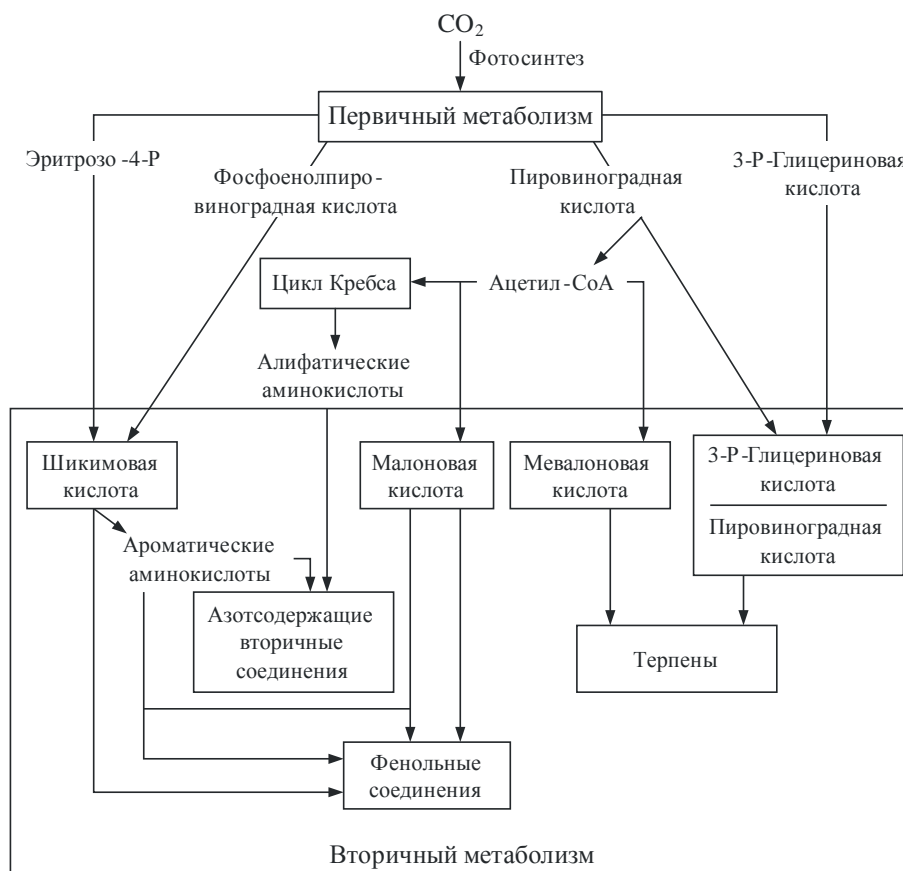


Рис. 15.1. Основные пути синтеза вторичных метаболитов и их связь с первичным обменом веществ

Изопреноиды насчитывают около 35 000 соединений, алкалоиды — около 12 000 структур, в группу фенольных соединений входит около 8000 веществ, количество минорных вторичных метаболитов, найденных в растениях, около 10 000. Вторичные метаболиты синтезируются из немногих первичных метаболитов и в большинстве случаев являются биологически активными соединениями.

В растительных тканях вторичные метаболиты, как правило, не присутствуют в виде отдельных соединений, а входят в состав сложных смесей. *Эфирные масла* состоят, в основном, из летучих моно- и сесквитерпенов. *Смолы* чаще всего являются смесью дитерпенов. *Камеди* преимущественно состоят из полисахаридов, но в них могут присутствовать алкалоиды и фенольные соединения. *Слизи* представляют собой смесь водорастворимых олиго- и полисахаридов, а также небольших количеств вторичных веществ (фенольных соединений, алкалоидов, изопреноидов). *Латекс* (млечный сок) состоит из сложной смеси продуктов первичного (сахара, белки, воска) и вторичного метаболизма (каучук, эфирные масла, алкалоиды, танины).

15.1. Терпены

Терпены, или *терпеноиды*, составляют наибольший класс вторичных соединений, обычно нерастворимых в воде. Основным структурным элементом всех терпенов является 5-углеродное соединение — *изопрен*, поэтому их называют также *изопреноидами*. Свое название терпеноиды берут от немецкого слова *Terpentin*, т. е. скипидар, который является смесью легких изопреноидов.

Терпены классифицируются в зависимости от количества остатков изопрена в молекуле (рис. 15.2). Различают монотерпены (построены на основе двух молекул изопрена и содержат 10 углеродных атомов), сесквитерпены (C_{15} -соединения), дитерпены (состоят из 20 атомов углерода), тритерпены и стероиды (C_{30} -соединения), тетратерпены (состоят из 8 молекул изопрена) и политерпены (количество атомов углерода более 40).

У некоторых терпенов функции в растениях хорошо изучены, и они могут быть отнесены скорее к соединениям первичного метаболизма, чем к веществам вторичного происхождения. Например, фитогормоны абсцизовая кислота и гиббереллины являются соответственно сескви- и дитерпенами, важный компонент растительных мембран ситостерол относится к тритерпенам (C_{30} -соединения), а каротиноиды являются производными тетратерпенов. Большинство же терпенов растений являются вторичными метаболитами и участвуют в защите растений. Терпены токсичны и служат репеллентами для большого числа насекомых и животных-фитофагов. Моно- и дитерпены, а также их производные образуют эфирные масла, обладающие бактерицидным действием.

Однако некоторые фитофаги приспособились питаться растениями с высоким содержанием ряда вторичных соединений. В ходе эволюции эти животные выработали механизмы детоксикации некоторых веществ вторичного обмена, что позволяет им питаться определенными растениями без вреда для себя и дает преимущество

по сравнению с другими видами. Некоторые насекомые, питаясь растениями, содержащими токсичные вещества, становятся несъедобными, например, для птиц. Так, бабочка Монарх, имеющая своеобразную окраску, без вреда для себя способна накапливать токсичные для птиц стероиды — *карденолиды*, содержащиеся в растениях семейства *Euphorbiaceae* (молочайные).

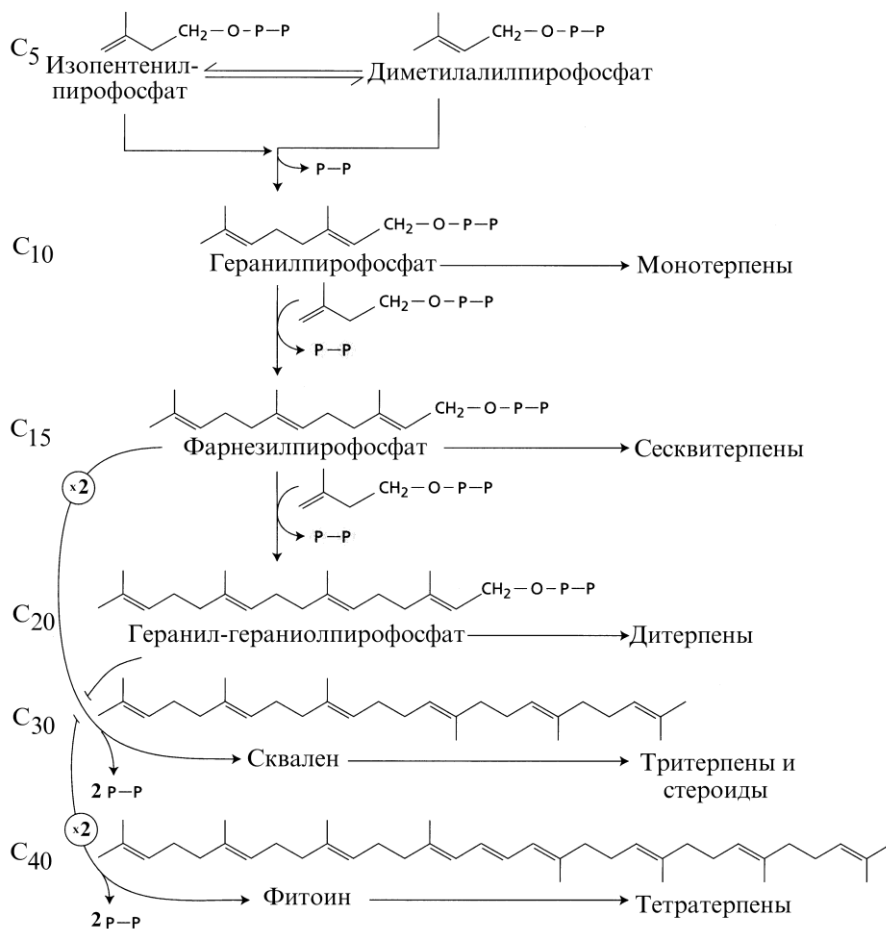


Рис. 15.2. Синтез терпеноидов

15.1.1. Моно-, сескви- и дитерпены

Вторичные соединения являются хорошей защитой для растений от большинства фитофагов. *Монотерпены* и их дериваты токсичны для насекомых. У таких хвойных растений, как сосна *Pinus silvestris* и пихта *Abies*, *монотерпены* аккумулируются в смоляных ходах. Основными монотерпенами смолы хвойных являются α -пинен, β -пинен, лимонен и мирцен (рис. 15.3).

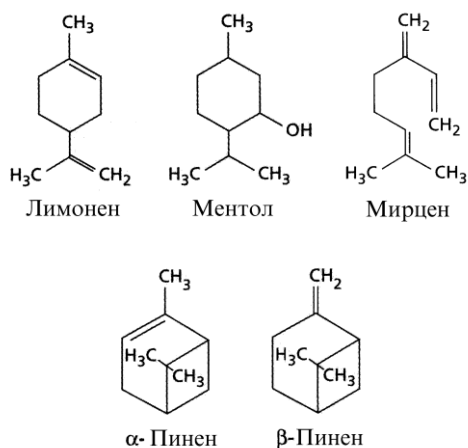


Рис. 15.3. Монотерпены

Эти вещества токсичны для большинства насекомых, включая короедов. Многие хвойные растения отвечают дополнительным синтезом монотерпенов на внедрение жуков-короедов. Очень сильным инсектицидным эффектом обладают *пиретроиды* — эфиры монотерпенов, содержащиеся в листьях и лепестках растений видов *Chrysanthemum*. Препараты пиретроидов являются составной частью многих коммерческих инсектицидов из-за их слабой токсичности для млекопитающих.

Многие растения производят *эфирные масла*, придающие из-за их летучести специфический запах листьям и плодам различных видов растительного царства. Основу эфирных масел составляют моно- и *сесквитерпены*. Главные компоненты эфирных масел перечной мяты *Mentha piperita* — *ментол* и лимона *Citrus limon* — *лимонен* являются очень эффективными репеллентами для насекомых. Монотерпены часто находятся в железистых волосках на поверхности листа и служат своеобразной вывеской токсичности растения, отпугивая фитофагов.

Летучие терпены могут выполнять еще одну важную защитную функцию. В тканях кукурузы, хлопка и некоторых других видов растений при нападении насекомых начинают вырабатываться моно- и сесквитерпены, служащие аттрактантами для хищных видов насекомых, питающихся насекомыми-фитофагами. Таким образом, летучие формы терпенов защищают растение не только сами по себе, но также могут привлекать на помощь растению другие организмы.

Мощным репеллентом (для насекомых и млекопитающих) является лактон сесквитерпена *костунолид*, содержащийся в железистых волосках подсолнечника *Helianthus annuus* и полыни *Artemisia*. Лактоны сесквитерпенов представляют собой очень горькие на вкус вещества, что делает растения, их содержащие, совершенно несъедобными для большинства фитофагов. У хлопчатника *Gossypium* устойчивость к повреждению насекомыми, а также к грибной и бактериальной инфекции связана с присутствием сесквитерпенового димера *госсипола* (рис. 15.4).

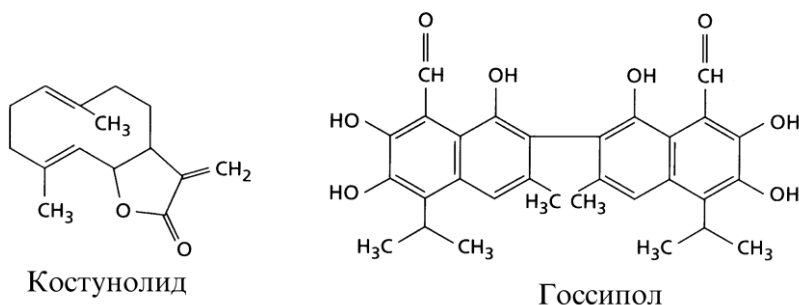


Рис. 15.4. Сесквитерпены

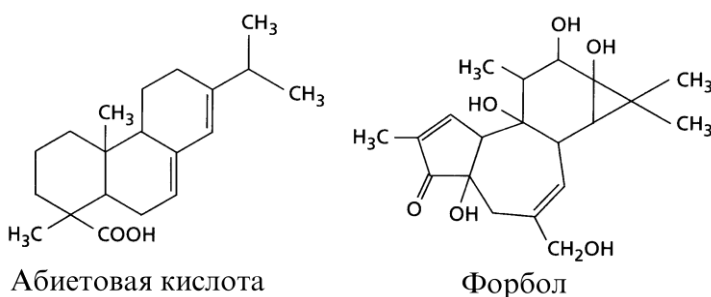


Рис. 15.5. Дитерпены

Многие *дитерпены* также являются токсинами и репеллентами для животных-фитофагов. В смоле сосны и некоторых видов тропических бобовых растений содержится большое количество дитерпенового репеллента — *абиетовой кислоты* (рис. 15.5).

Растения из семейства молочайных (*Euphorbiaceae*) синтезируют дитерпен *форболовый эфир*, который раздражает кожу при попадании на поверхность тела и очень токсичен, когда оказывается внутри организма млекопитающих. Форболовые дитерпены вызывают большой интерес в онкологии как вещества, приводящие к образованию опухолей у млекопитающих.

15.1.2. Стероиды и политерпены

К *тритерпенам* относится большая группа соединений, включая стероиды (рис. 15.6). Число углеродных атомов у тритерпенов может быть меньше или превышать 30. *Стероиды* (например, *ситостерол*) являются важными компонентами мембран растительных клеток. Некоторые виды растительных стероидов способны выполнять защитные функции. *Фитоэкдизоны*, например α -*экдизон*, имеют сходное строение с гормоном линьки насекомых *экдизоном* (рис. 15.6). При поедании растений, содержащих фитоэкдизон, происходит нарушение процесса линьки и развития насекомых нередко с летальным исходом. Еще одна группа тритерпенов, с которыми связана горечь цитрусовых, *лимоноиды* являются наиболее мощны-

ми репеллентами. В частности лимонноид *азадирахтин*, получаемый из древесного растения *Azadirachta indica*, проявляет инсектицидную активность в концентрации 50 частей на миллиард, при этом он оказался слабо токсичен для млекопитающих.

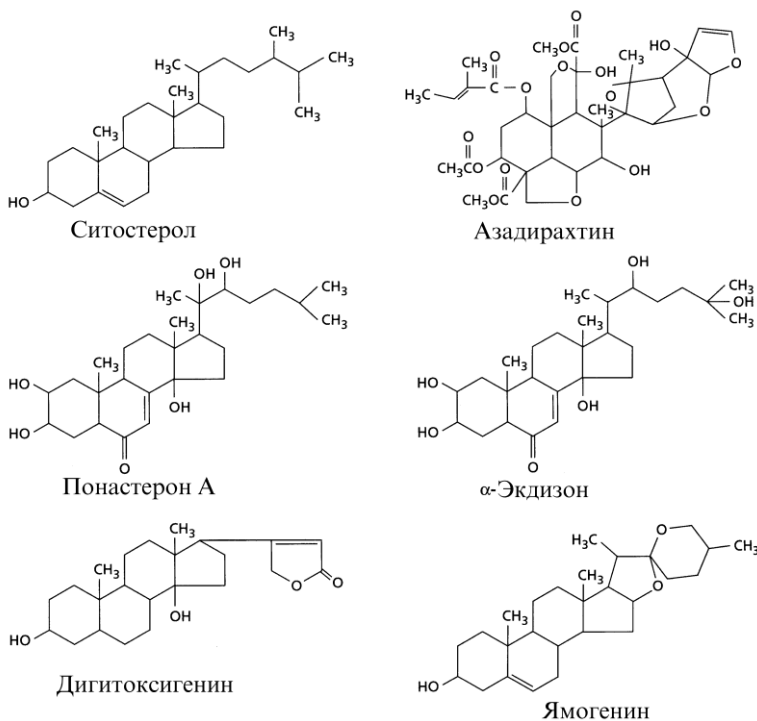


Рис. 15.6. Тритерпены — стероиды

Однако у растений имеются тритерпены, которые могут быть очень токсичными и для позвоночных животных. К их числу относятся прежде всего карденолиды и сапонины. *Карденолиды* представляют собой очень горькие на вкус гликозиды, т. е. стероиды, которые содержат моносахарид (моносахариды). Эти вторичные соединения способны нарушать работу сердечной мышцы млекопитающих и человека за счет изменений в функционировании Na/K-АТФазы. В небольших же дозах карденолиды, получаемые из наперстянки *Digitalis*, прописывают миллионам пациентов с больным сердцем. На рис. 15.6 приведено строение *дигитоксигенина* — агликона, т. е. неуглеводной части дигитанидов.

Сапонины включают стероидные и тритерпеновые гликозиды, называемые так из-за схожести по своим свойствам с мылом (soap). Токсичность сапонинов объясняется наличием в их молекуле липидорастворимого (тритерпен) и водорастворимого (сахар) элементов, что придает им свойства детергентов и способность разрушать клеточные мембраны. Растения батата *Dioscorea* содержат сапонин *ямогенин*, который является основой для синтеза прогестерон-подобных соединений, используемых при контрацепции.

К наиболее хорошо известным *политерпенам* $(C_5H_8)_n$ относится *каучук* — полимер, содержащий 1500—15 000 остатков изопентенила (рис. 15.7). Каучук найден во многих растениях, однако в наибольшем количестве он содержится в таких каучуконосных растениях, как бразильская гевея *Hevea brasiliensis*, манихот *Manihot*, фикус *Ficus elastica*. Эти каучуконосы служат источником для получения натурального каучука, используемого в технических целях. Частицы каучука суспендированы в латексе (млечном соке), находящемся в особых, связанных между собой клетках — *млечниках* (см. разд. 7.3). В млечниках содержится большой набор вторичных соединений, которые выполняют в основном защитные функции — три-терпены, воска, танины и алкалоиды.

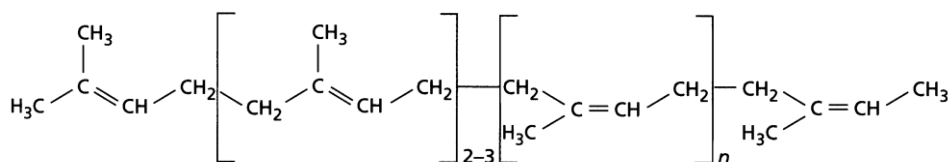


Рис. 15.7. Строение каучука

15.2. Фенольные соединения

Фенольными соединениями называют вещества, содержащие ароматические кольца с гидроксильной группой, а также их различные производные, включая гликозиды. Если в ароматическом кольце фенольных соединений содержится более одной гидроксильной группы, они называются *полифенолами*. В группу фенольных веществ входят разные по растворимости соединения: часть из них растворима в органических растворителях, другие водорастворимы, третьи являются нерастворимыми полимерами.

Фенольные соединения играют активную роль в самых различных физиологических процессах — фотосинтезе, дыхании, росте, защитных реакциях растительного организма. Они выполняют механические и структурные функции (лигнин), а также являются аттрактантами (антоцианы) для насекомых-опылителей и животных-распространителей семян. Наибольшее количество фенольных соединений образуется в листьях и молодых побегах чайного растения.

Подавляющее большинство фенольных соединений образуется из эритрозо-4-фосфата с использованием в качестве ключевого предшественника шикимовой кислоты. *Шикиматный путь* объединяет в себе не только образование фенольных соединений, но и синтез ароматических аминокислот — фенилаланина, тирозина и триптофана. Шикиматный путь имеется в растениях, грибах и микроорганизмах, но отсутствует у животных организмов. Поэтому ароматические аминокислоты не синтезируются и являются незаменимыми для животных организмов.

15.2.1. Синтез фенольных соединений

В растениях фенольные соединения синтезируются из фенилаланина за счет отщепления аммония с образованием *транс*-коричной кислоты (рис. 15.8).

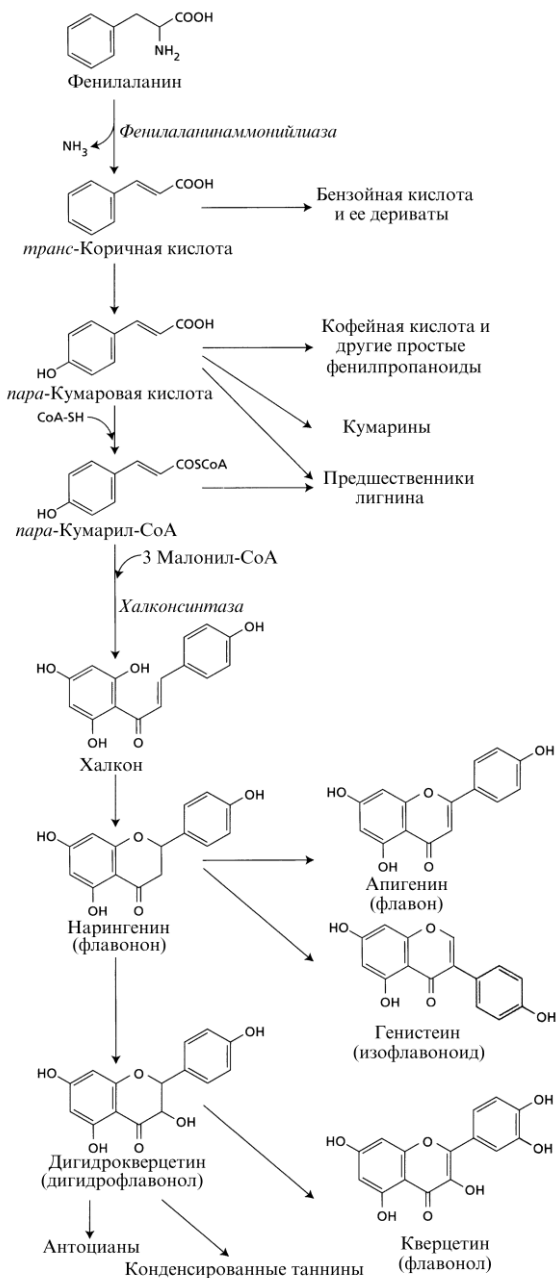


Рис. 15.8. Синтез фенольных соединений из фенилаланина

Этот процесс катализируется ключевым ферментом вторичного метаболизма — *фенилаланинаммонийлиазой* (ФАЛ). Именно ФАЛ является развилкой между первичным и вторичным метаболизмами. Одной из первых реакций, индуцируемых при грибной инфекции, является синтез ФАЛ и различных фенольных соединений. Из *транс*-коричной кислоты могут образовываться бензойная кислота и ее дериваты. Последующие превращения *транс*-коричной кислоты приводят к появлению других фенилпропаноидных соединений: кофейной и оксикоричной (*пара*-кумаровой) кислот, кумаринов, предшественников лигнина (рис. 15.8). На завершающем этапе фенольного обмена происходит образование *халконов*, являющихся основой для синтеза различных флавоноидов.

Выделяют пять групп фенольных соединений (см. рис. 15.9, 15.12):

- простые фенилпропаноиды;
- фенилпропаноидные лактоны, называемые кумаринами;
- бензойная кислота и ее дериваты;
- флавоноиды;
- фенилпропаноидные спирты, являющиеся предшественниками лигнина.

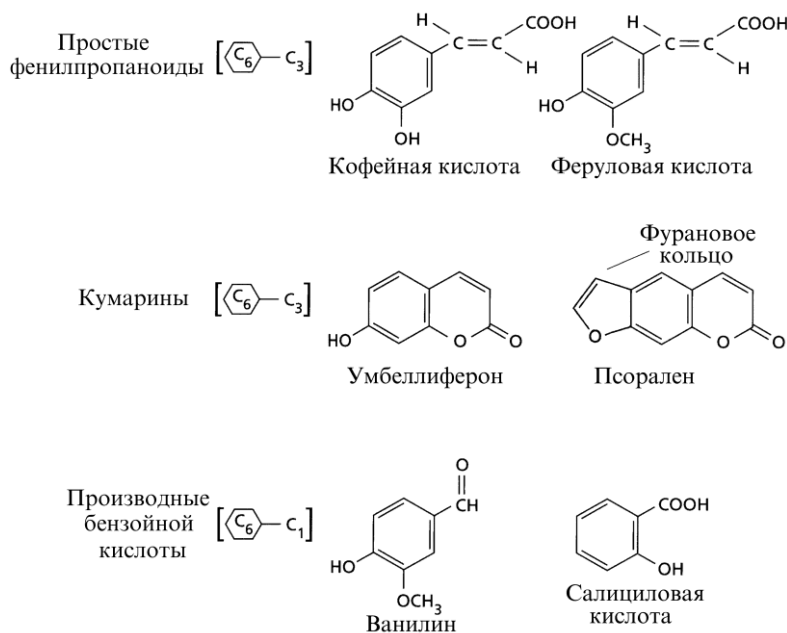


Рис. 15.9. Простые фенилпропаноиды, кумарины и производные бензойной кислоты

15.2.2. Кумарины

(вещество, которое обуславливает запах свежескошенного сена) представляет собой лактон (циклический эфир) оксикоричной (пара-кумаровой) кислоты. В виде гликозидов кумарины содержатся во многих растениях. Наибольший интерес в защите растений от насекомых и грибов представляют *фуранокумарины*, которые в отличие от обычных кумаринов содержат фурановое кольцо (рис. 15.9). Под воздействием света с длиной волны 320—400 нм фуранокумарины приобретают способность связываться с пиримидиновыми основаниями (цитозином и тиминном), встраиваться в спираль молекулы ДНК, блокировать процесс транскрипции и приводить клетку к гибели. Особенно много токсичных форм фуранокумаринов в растениях семейства *Umbelliferae* (зонтичные), которое включает такие виды, как петрушка *Petroselinum sativum*, сельдеley *Apium graveolens*, пастернак *Pastinaca sativa*. В сельдерее содержание фуранокумаринов возрастает в сотни раз в стрессовых ситуациях, в том числе при поражении патогенами. У сборщиков и продавцов сельдерея на коже нередко развивается сыпь при соприкосновении с поврежденными растениями.

15.2.3. Флавоноиды

Флавоноиды являются одним из самых больших классов фенольных соединений. Их основной углеродный скелет содержит 15 атомов углерода. При этом два ароматических кольца связаны тремя углеродными атомами ($C_6 - C_3 - C_6$). Молекула флавоноида содержит два бензольных ядра и одно гетероциклическое кислородсодержащее (пирановое) кольцо.

В зависимости от степени окисления трехуглеродного участка флавоноиды разделяют на *антоцианы* (дигидрофлавонолы), *флавононы*, *флавоны*, *флавонолы* и *изофлавонолы* (см. рис. 15.8). Из флавоноидов также синтезируются танины. Разнообразие природных флавоноидов достигается за счет различного замещения в бензольных кольцах (к которым в различных положениях могут присоединяться группы $-OH$, $-OCH_3$, $-CH_3$), способности образовывать гликозиды с широким набором моно- и дисахаридов, а также наличия асимметричных атомов углерода.

Антоцианы являются основными красящими веществами растений, что позволяет им служить аттрактантами при опылении цветков и распространении плодов. Именно антоцианы обеспечивают растительным организмам многообразие окраски цветков, плодов и листьев. В отличие от каротиноидов, они способны придавать растительным тканям более широкий спектр оттенков — от розового до черно-фиолетового. Строение антоцианов было установлено еще в 1916 г. немецким биохимиком Р. Вильштеттером (R. Willstätter). Все антоцианы содержат в гетероциклическом кольце четырехвалентный кислород (оксоний) и благодаря этому легко образуют различные соли. На окраску оказывает влияние характер групп-заместителей и pH. В отличие от фотосинтетических пигментов, антоцианы находятся, как правило, в виде гликозидов и локализованы в вакуолях. Агликоны антоцианов называют *антоцианидинами* (рис. 15.10, табл. 15.1).

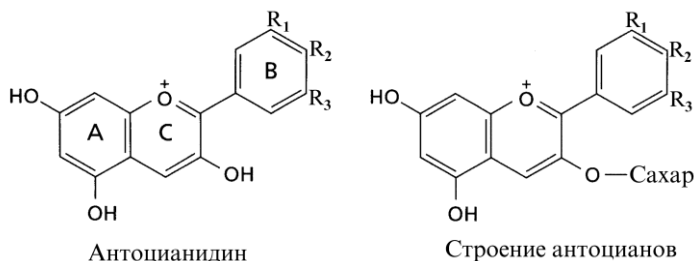


Рис. 15.10. Антоцианы и антоцианидины

Таблица 15.1. Антоцианидины

Антоцианидины	Группы-заместители (R)	Цвет
Пеларгонидин	R ₂ – OH	Оранжевый
Цианидин	R ₁ – OH, R ₂ – OH	Фиолетовый
Дельфинидин	R ₁ – OH, R ₂ – OH, R ₃ – OH	Сиреневый
Пеонидин	R ₁ – OCH ₃ , R ₂ – OH	Розовый
Петунидин	R ₁ – OCH ₃ , R ₂ – OH, R ₃ – OCH ₃	Пурпурный

Из антоцианидинов в растениях наиболее широко распространен *цианидин*, который является основным красящим веществом лепестков василька, плодов вишни, сливы, земляники, винограда и брусники. В растениях чаще всего встречается несколько антоцианов, определенная комбинация которых обеспечивает им характерную окраску.

Флавононы особенно часто встречаются в плодах различных видов цитрусовых (в кожуре грейпфрута *нарингенин*, в кожуре апельсина и мандарина *гесперидин*). Нарингенин имеет горький вкус, а гесперидин — нет.

Флавоны и флавонолы, имеющие желтый цвет, обычно встречаются в виде гликозидов. Наиболее распространенными агликонами флавонов являются *апигенин*, содержащийся в петрушке и цветках хризантемы, а также *трицин*, найденный в пшенице, рисе и люцерне. Агликонами флавонолов чаще всего служат *кемпферол*, *кверцетин* и *мирицетин*. Особенно часто в растениях встречается рамногликозид кверцитина — *рутин*, широко используемый в медицине как капилляроукрепляющее средство. Флавоны и флавонолы поглощают свет в более коротковолновой части спектра (280—320 нм), чем антоцианы. Поэтому одной из главных функций флавонов и флавонолов является защита растительных тканей (в первую очередь эпидермальных) от ультрафиолетовой радиации. Благодаря этому клетки эпидермиса листьев, пропуская 70—80% видимого света, способны задерживать до 95% ультрафиолетового излучения.

Основная масса фенольных соединений чайного листа приходится на долю флавоноидов, представленных главным образом катехинами и проантоцианидинами. *Катехины* — это наиболее восстановленная группа флавоноидных соединений. Характерная их особенность — образование эфиров с галловой кислотой, которая является мономером гидролизуемых танинов. Катехины содержатся во многих плодах (яблоки, груши, вишня, айва, персики, абрикосы) и ягодах (ежевика, земляника, брусника, смородина, малина, виноград). Молодые побеги чайного растения содержат до 30% катехинов (на сухой вес). Катехины играют важную роль в производстве какао, виноделии и особенно в чайной промышленности. Это связано с тем, что продукты окисления катехинов обладают характерной окраской и приятным слабоявляющим вкусом.

15.2.4. Лигнин

Помимо перечисленных ранее мономерных фенольных соединений в растениях содержатся полимеры фенольной природы — лигнин и танины. Наиболее распространенным фенольным соединением в растениях является *лигнин*. Он представляет собой сильно разветвленный полимер (рис. 15.11), состоящий из трех фенолпропаноидных спиртов: кониферилового, *para*-кумарового и синапового (рис. 15.12).

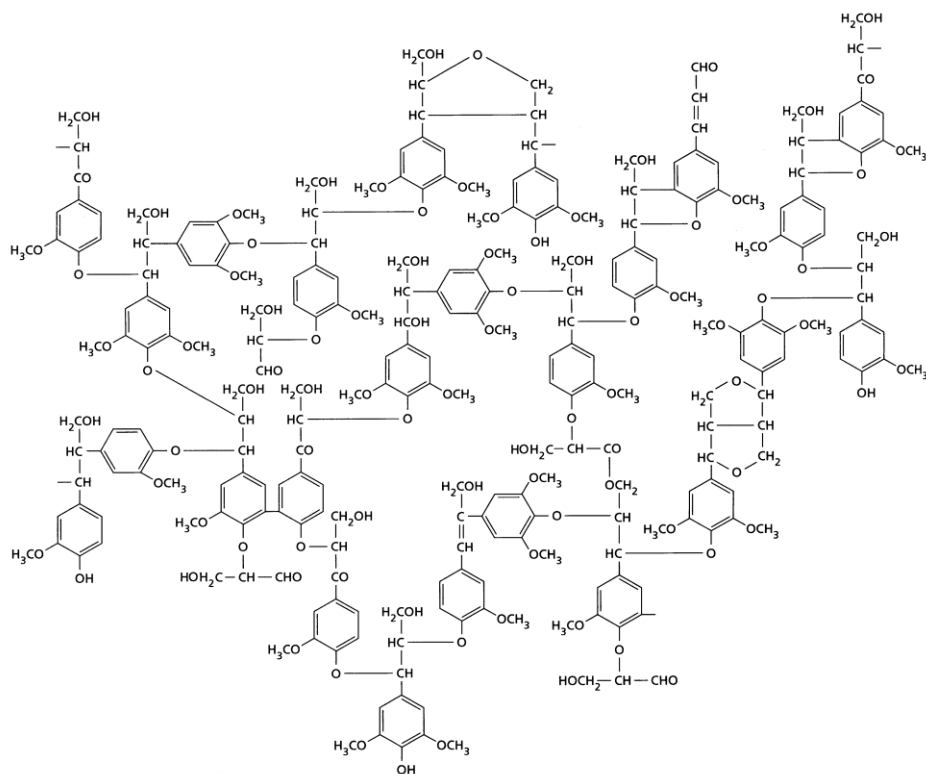


Рис. 15.11. Частичная структура молекулы лигнина бука *Fagus sylvatica* (Nimz, 1974)

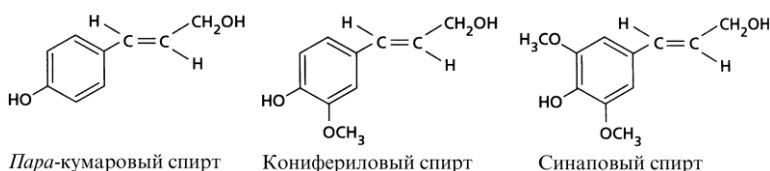


Рис. 15.12. Фенилпропаноидные спирты — предшественники лигнина

Состав лигнина сильно варьирует не только у различных видов растений, но даже у одного и того же растительного организма в различных органах или слоях клеточной стенки. Лигнин откладывается, главным образом, во вторичной клеточной стенке, особенно много его в трахеидах и сосудах ксилемы, по которым идет поток воды и растворенных минеральных солей. Лигнин придает механическую прочность клеточной стенке, растительным клеткам и тканям, "цементируя" их. У древесных растений содержание лигнина достигает 25—30% от сухой массы. Так же, как и другие продукты вторичного обмена, он выполняет и защитные функции: лигнификация тканей, с одной стороны, делает их несъедобными для большинства вредителей, а с другой — блокирует дальнейшее распространение патогенов.

15.2.5. Таннины

Термин "таннины" был впервые использован для описания веществ, которые превращали сырые животные шкуры в кожу в процессе дубления (tannin). Связываясь с белками коллагена шкуры животных, таннины повышают устойчивость получаемой кожи к жаре, воде и микроорганизмам.

Есть два типа таннинов: конденсированные и гидролизуемые. *Конденсированные таннины* являются полимерами катехинов или проантоцианидинов и образуются только из фенолов флавонового типа (рис. 15.13).

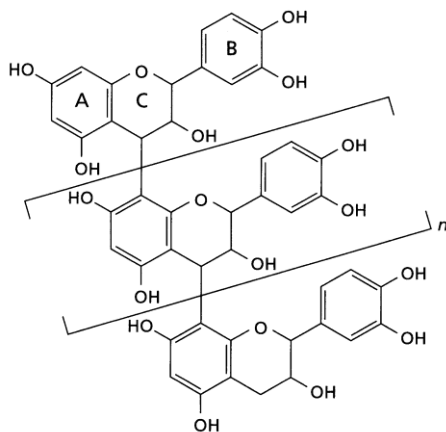


Рис. 15.13. Структура конденсированных таннинов

Гидролизуемые танины — это гетерогенные полимеры, состоящие из фенольных кислот (обычно галловой кислоты, $n = 8$) и моносахарида (чаще всего глюкозы, которая находится в центре молекулы). Они могут легко гидролизоваться в разбавленных кислотах.

Молекулярная масса большинства танинов составляет 600—3000 Да. Особенно много их в поверхностных слоях незрелых фруктов. Животные обычно избегают растений с высоким содержанием танинов, поскольку они токсичны и являются репеллентами для большинства травоядных. Защитные свойства танинов связаны с их способностью образовывать водородные и ковалентные связи с белками кишечника у травоядных животных. Помимо этого фенольные соединения могут окисляться (некоторыми растительными ферментами) в токсичные *хиноны*, которые способны активно реагировать с SH- и NH₂-группами белков.

У человека танины также вызывают вяжущее ощущение во рту из-за их связывания с белками слюны. Тем не менее некоторым людям иногда нравится использовать терпкие и вяжущие продукты, содержащие танины, такие, как чай, красное вино, яблоки, смородина.

15.2.6. Сигнальные функции ряда фенольных соединений


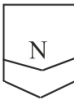

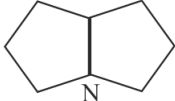
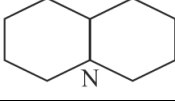
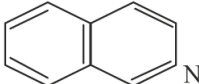
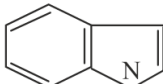
Фенольные соединения могут функционировать как сигнальные вещества при взаимодействии с микроорганизмами. Активаторами комплекса *nod*-генов клубеньковых бактерий *Rhizobium* являются флавоны (лютеолин, хризоэриол), флавононы (нарингенин, гесперидин, эриодиктиол) и изофлавоноиды (генистеин, даидзеин), выделяемые корнями бобовых растений. Ярким примером важной роли вторичных соединений в иммунитете растений являются фитоалексины — специфические и токсичные для патогенов вещества, которые образуются в тканях растений при инфицировании. В здоровых тканях они либо совсем отсутствуют, либо содержатся в ничтожных количествах. Фитоалексины представлены в основном фенольными соединениями — изофлавоноидами (до 80%), а также терпеноидами.

15.3. Алкалоиды

Алкалоиды представляют собой чрезвычайно активные вещества, оказывающие сильное фармакологическое воздействие на животный организм; многие из них являются ядами. Алкалоиды — большая группа азотсодержащих вторичных веществ, найденных у 20% видов сосудистых растений. Термин "алкалоид" был использован в 1819 г. немецким фармакологом Майсснером (С. F. Meissner). Чтобы особая группа азотсодержащих веществ со щелочными свойствами не была классифицирована как щелочи (alkali), он предложил назвать ее *алкалоидами*. Чаще

всего алкалоиды содержат азот в составе гетероциклического кольца (табл. 15.2); большинство из них обладает основными свойствами, как это следует из их общего названия.

Таблица 15.2. Основные типы алкалоидов

Тип алкалоида	Структура	Предшественник	Примеры
Пирролидины		Орнитин	Никотин
Производные тропана		Орнитин	Антропин, кокаин
Группа пиперидина		Лизин или ацетат	Кониин
Группа пирролизидина		Орнитин	Ретросин
Группа хинолизидина		Лизин	Лупинин
Изохинолины		Тирозин	Кодеин, морфин
Производные индола		Триптофан	Резерпин, стрихнин

Алкалоиды делят на три большие группы: *истинные алкалоиды* содержат азот в гетероцикле, *протоалкалоиды* — у них азот находится не в гетероцикле и *псевдоалкалоиды* — синтезируются не из аминокислот. К протоалкалоидами относятся, например, *колхицин*, *эфедрин*, *капсаицин* (входит в состав перца стручкового *Capsicum annuum*). Из псевдоалкалоидов наиболее хорошо известны стероидные гликоалкалоиды пасленовых, в частности *соланин*.

Большая часть алкалоидов образуется из аминокислот (аспарагина, орнитина, лизина, тирозина, триптофана и т. д.). Поэтому их классификацию часто ведут по типу аминокислот-предшественников (см. табл. 15.2). Алкалоиды отличаются от других вторичных метаболитов наибольшим разнообразием химического строения и путей биосинтеза.

15.4. Минорные группы вторичных метаболитов

Помимо алкалоидов в растениях также найдены и другие азотсодержащие вещества, принимающие непосредственное участие в защите от травоядных животных, которые относят к группе *минорных вторичных метаболитов*. К ним относятся небелковые аминокислоты, амины, цианогенные гликозиды и гликозиды горчичных масел. В группу минорных вторичных метаболитов также входит ряд других соединений.

Небелковые аминокислоты включают природные аминокислоты, их амиды и иминокислоты, которые не входят в состав белков. Многие из них являются модификацией аминокислот, входящих в состав белков. Они присутствуют либо в свободном виде, либо в виде конъюгатов. Известно более 500 небелковых аминокислот. Как правило, они очень токсичны, поскольку могут включаться в белки вместо "нормальных" аминокислот и нарушать их функции.

Амины, как правило, представляют собой декарбоксилированные белковые и небелковые аминокислоты. В растениях имеется большое количество аминов, которые подразделяют на моноамины (одна аминогруппа), диамины (две аминогруппы) и полиамины.

К *необычным жирным кислотам* относятся те, которые отличаются длиной углеродной цепи, иным расположением двойных связей, а также наличием в молекуле дополнительных функциональных групп. Известно несколько сотен таких соединений.

Прототоксинами или *фитоантисипинами* называют соединения, которые сами по себе не обладают токсичным эффектом и находятся в латентном состоянии. В нормальных условиях такие прототоксины и гидролизующие их ферменты локализованы или в различных клеточных компартментах (соответственно в вакуоли и цитоплазме), или даже в различных тканях. При механическом повреждении фитофагами растительных тканей фитоантисипины начинают взаимодействовать с соответствующими ферментами, в результате чего происходит образование токсичных соединений, участвующих в защитных реакциях растительного организма. К прототоксинам *относят цианогенные гликозиды и глюкозинолаты*.

15.4.1. Цианогенные гликозиды

Известно более 2000 видов растений, выделяющих при повреждении (или заражении) цианид водорода. У этих растений при повреждении тканей происходит перемешивание цианогенных гликозидов и гидролизующих их ферментов с образованием высокотоксичного газа HCN. Этот процесс идет в два этапа с участием ферментов гликозидазы и гидроксинитриллиазы (рис. 15.15).

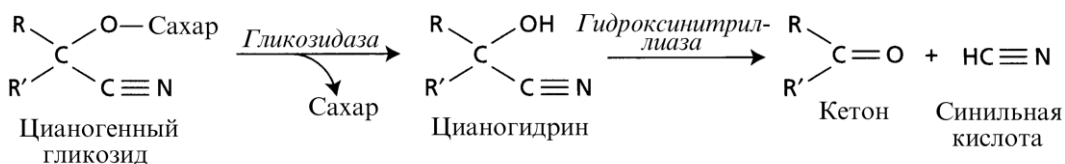


Рис. 15.15. Синтез цианида водорода из цианогенных гликозидов

Цианогенные гликозиды широко распространены в растительном царстве и часто встречаются у представителей бобовых, розоцветных и некоторых злаков. Их содержание высоко также в клубнях маниока *Manihot esculenta*, которые содержат много крахмала и являются важным пищевым продуктом в ряде тропических стран. Клубни и мука маниока являются обычной пищей для аборигенов, которые научились в процессе приготовления избавляться от токсичных соединений.

15.4.2. Глюкозинолаты

Вторая важная группа растительных прототоксинов — *глюкозинолаты* — впервые была выявлена у растений семейства крестоцветных *Cruciferae*. В растении глюкозинолаты так же, как и цианогенные гликозиды, пространственно отделены от гидролизующих их ферментов. При повреждении растительных тканей происходит смешивание глюкозинолатов с соответствующими ферментами и превращение их в летучие токсичные вещества с горчичным запахом — изотиоцианаты и нитрилы (рис. 15.16).

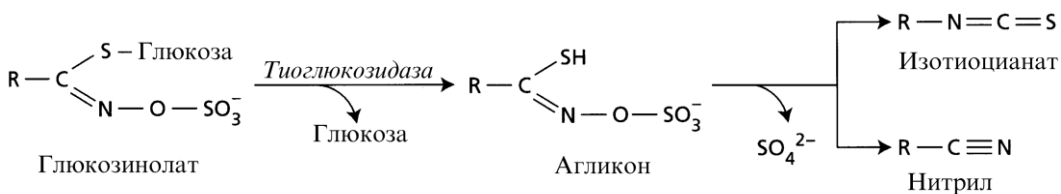


Рис. 15.16. Превращение глюкозинолатов при повреждении растительных тканей

Образующиеся вещества функционируют как токсины и репелленты для травоядных животных. Большинство исследований, посвященных глюкозинолатам, выполнено на рапсе *Brassica napus*, который является важным источником для получения пищевого растительного масла в Северной Америке и Европе. Одна из основных задач селекционеров при этом состоит в получении семян рапса с резко сниженным содержанием глюкозинолатов.

Заключение

Наука не в состоянии решить ни одного вопроса, не поставив при этом десятка новых.

Д. Б. Шоу

За последние 20—30 лет произошло значительное изменение методического и методологического инструментария, применяемого в биологических исследованиях. Стало возможным регистрировать электрические (ионные) токи в мембране через одиночные белковые молекулы, проводить микроколичественный анализ веществ в клетках и тканях, осуществлять прижизненную регистрацию внутриклеточных процессов и в том числе таких, как экспрессия отдельных генов, сборку и разборку элементов цитоскелета, транспорт белков и ионов. Получение новых знаний в биологических исследованиях идет главным образом за счет использования методов молекулярной и *системной биологии*.

В 2000 г. в биологии растений произошло ключевое событие: был полностью расшифрован геном резуховидки (резушки) Таля (*Arabidopsis thaliana* L.). За прошедшие годы сиквенированы геномы риса и люцерны, тополя и сорго, винограда и кукурузы, апельсина и мандарина, какао и земляники, яблони и конопли. Завершается расшифровка геномов пшеницы, картофеля, ячменя, лотоса, томатов, маниока и папайи. Биология переходит в так называемый *пост-геномный период развития* (post-genomics world of science). В этот период доминируют исследования, которые начинаются с сиквенирования генома и белков, а завершаются выявлением функций отдельных генов, белков и метаболитов, а также их эволюционного происхождения. Центром всех этих исследований служит *информация о сиквенсе генома*. Именно она дает основу для анализа происходящих в организме процессов на самых разных уровнях: биохимическом, генетическом, регуляторном, клеточном, организменном и эволюционном.

Как только стала появляться информация о полных сиквенсах геномов, возникла новая наука — *геномика*, которая изучает нуклеотидный состав генома, принципы функционирования отдельных генов и их комплексов, а также эволюцию генома. Задачи геномики заключаются в выявлении того, как клетки в многоклеточном организме, имея идентичный набор генов, образуют такое разнообразие тканей и органов, обладая при этом узкой функциональной и структурной специализацией.

Появляется возможность одновременно анализировать совокупность всех мРНК (*транскриптом*) и белков (*протеом*), которые определяют функциональную специфику клетки и свойственны ткани или органу на определенном этапе онтогенеза в зависимости от условий среды. Стремительно совершенствуются методы анализа *метаболома* — совокупности всех метаболитов, свойственных клетке, ткани или органу на определенном этапе онтогенеза в зависимости от условий среды. В настоящее время появляются сотни статей в области протеомики и метаболомики растений. После получения информации об отдельных молекулах, составляющих протеом и метаболом клетки, следующим шагом будет составление целостной структурной и функциональной картины клеточных процессов. В этом случае обязательно возникнет проблемы понимания принципов управления физиологией клетки, расшифровки механизмов ее ответных реакций на внешние и внутренние раздражители, а также создания "технологий" обработки и хранения получаемой информации.

Индустриально развитые страны расходуют десятки миллиардов долларов на фундаментальные и прикладные исследования в области высоких технологий современной биологии и значительно большие средства на их практическое использование. О значимости и масштабах исследований в области биологии свидетельствует тот факт, что только в ближайшие 4 года в индустриально развитых странах мира (США, Англия, Япония, Германия, Франция) в информационные технологии, ориентированные на молекулярную биологию, генетику, биотехнологию, медицину, сельскохозяйственную биологию, будет инвестировано более 30 миллиардов долларов. В США расходы на биологические исследования составляют в настоящее время до 50% всех инвестиций в науку.

Их мотивация — национальная безопасность любой страны зависит от владения высокими технологиями современной биологии и их практического использования в промышленности, здравоохранении, социальной и демографической сферах, охране окружающей среды, производстве продуктов питания. При этом критически важную роль в современной биологии играют *системная и информационная биология*.

Информационная биология относится к числу высоких технологий современной биологии и обеспечивает информационно-компьютерные и теоретические основы генетики и селекции, молекулярной генетики и биологии, генетической и белковой инженерии, биотехнологии, медицинской генетики, генодиагностики, генотерапии, экологии.

В завершение хотелось бы процитировать известного специалиста в области системной и информационной биологии, профессора Массачусетского технологического института Эрика Ландера (Eric S. Lander, 2003): *"Биология подвергается одной из наиболее фундаментальных революций, которой пока не наблюдалось ни в одной из наук. Она трансформируется от чисто лабораторной науки в науку, основанную на информационных технологиях. Все XX столетие можно рассматривать как некую прелюдию к этой информационной биологии. И то, что еще осталось сделать — это передать последующим поколениям биологов ключи от самой замечательной библиотеки информации на этой планете"*.

П Р И Л О Ж Е Н И Я

Приложение 1



Список литературных источников, использованных при подготовке иллюстраций

Глава 1

- Рис. 1.1, 1.4, 1.6 Васильев А. Е., Воронин Н. С., Еленевский А. Г., Серебрякова Т. И. Ботаника. Анатомия и морфология растений. — М.: Просвещение, 1978. — 480 с.
- Рис. 1.3 Xu X. M., Meier I. The nuclear pore comes to the pore // *TRENDS in Plant Science*. — 2007. — V. 13. — P. 20—27.
- Рис. 1.5 Douce R. *Mitochondria in Higher Plants: Structure, Function, and Biogenesis*. — Academic Press, Orlando, FL, USA, 1985. — 327 p.
- Рис. 1.7 Fahh A. *Plant Anatomy*. 4th ed. — Pergamon Press., 1990. — 588 p.
- Рис. 1.8, 1.12 Brett C., Waldron K. *Physiology and biochemistry of plant cell walls*. — London: Chapman and Hall, 1996. — 255 p.
- Рис. 1.9 Taiz L., Zeiger E. (Eds) *Plant Physiology*. 2-nd edition. — Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc. Publishers, 1998. — 792 p.
- Рис. 1.10 Delmer D. P., Amor Y. Cellulose biosynthesis // *Plant Cell*. — 1995. — V. 7. — P. 987—1000.
- Рис. 1.11 Gunning B. S., Steer M. W. *Plant Cell Biology*. Jones and Bartlett, Boston. — 1996.

Глава 2

- Рис. 2.1 Zelitch I. 1979. Photorespiration: Studies with whole tissues. In: *Encyclopedia of Plant Physiology*. — Berlin. Springer-Verlag, 1979. — V. 6. — P. 353—367.
- Рис. 2.4 Холл Д., Пао К. Фотосинтез. — М.: Мир, 1983. — 312 с.
- Рис. 2.12 Leister D. Chloroplast research in the genomic age // *TRENDS in Genetics*. — 2003. — V. 19. — P. 47—56.

- Рис. 2.13, 2.17, 2.31, 2.33 Nelson D. L., Cox M. M. Lehninger Principles of Biochemistry. Fourth Edition. — 2004. — 1119 p.
- Рис. 2.15 Barber J., Nield J., Morris E. P., Zheleva D., Hankamer B. The structure, function and dynamics of photosystem two. *Physiologia plantarum*. — 1997. — V. 100. — P. 817—827.
- Рис. 2.16 He, W. Z. and Malkin, R. Photosystems I and II. In: *Photosynthesis: a comprehensive treatise*. — New York and Cambridge. Cambridge University Press, 1998. — P. 29—43.
- Рис. 2.18 Jansson S. The light harvesting chlorophyll *a/b* binding proteins // *Biochim. Biophys. Acta*. — 1994. — V. 1184. — P. 1—19.
- Рис. 2.19 Tommos C. Babcock G. T. Proton and hydrogen currents in photosynthetic water oxidation // *Biochim. Biophys. Acta*. — 2000. — V. 1458. — P. 199—219.
- Рис. 2.20 Allen J. F. Cytochrome *b₆f*: structure for signalling and vectorial metabolism // *TRENDS in Plant Science*. — 2004. — V. 9. — P. 130—137.
- Рис. 2.22, 2.27, 2.30 Taiz L., Zeiger E. (Eds) *Plant Physiology*. 2-nd edition. — Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc. Publishers, 1998. — 792 p.
- Рис. 2.23 Ort D. R., Baker N. R. A photoprotective role for O₂ as an alternative electron sink in photosynthesis? // *Current Opinion in Plant Biology*. — 2002. — V. 5. — P. 193—198.
- Рис. 2.24 Jagendorf A. T. Acid-based transitions and phosphorylation by chloroplasts // *Fed. Proc. Am. Soc. Exp. Biol.* — 1967. — V. 26. — P. 1361—1369.
- Рис. 2.25 Boyer P. D. The ATP synthase — a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem.* — 1997. — V. 66. — P. 717—749.
- Рис. 2.28 Taiz, L., Zeiger, E. CO₂ concentrating mechanisms II: The C₄ photosynthetic carbon assimilation (PCA) cycle // *Plant Physiology*. — Benjamin/Cummings, Redwood City, CA, 1991.
- Рис. 2.34, 2.35 Dunford, S. Translocation in the Phloem // *Plant Physiology*. Taiz, L. and Zeiger, E. Eds. Sinauer Associates Inc Publishers, 1998. — P. 251—285.
- Рис. 2.36 Nobel P. S. *Physicochemical and Environmental Plant Physiology*. — San Diego: Academic Press, 1991. — 635 p.
- Рис. 2.37 Harvey G. W. Photosynthetic performance of isolated leaf cells from sun and shade plants. — *Carnegie Institute Washington Yearbook*, 1979. — V. 79. — P. 161—164.
- Рис. 2.38 Björkman, O. Responses to different quantum flux densities. In *Encyclopedia of Plant Physiology*. New Series. V. 12A. — Berlin: Springer, 1981. — P. 57—107.

- Рис. 2.39 Vogelmann T. C., Martin G. The functional significance of palisade tissue: penetration of directional vs diffuse light // *Plant Cell Environ.* — 1993. — V. 16. — P. 65—72.
- Рис. 2.40 Cerling T. E., Harris J. M., MacFadden B. J., Leakey M. G., Quad, J., Eisenmann V., Ehleringer J. R. Global vegetation change through the Miocene/Pliocene boundary // *Nature.* — 1997. — V. 389. — P. 153—158.
- Рис. 2.41 Keeling C. D., Whorf T. P. Atmospheric CO₂ records from sites in the SIO air sampling network. In *Trends '93: A Compendium of Data on Global Change.* — ORNL/CDIAC-65, Carbon Dioxide Information Center, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, TN, 1994. — P. 16—26.
- Neftel A., Friedle H., Moor E., Lötscher H., Oeschger H., Siegenthaler U., Stauffer B. Historical CO₂ record from the Siple Station ice core. In *Trends '93: A Compendium of Data on Global Change, 1994.*
- Keeling C. D., Whorf T. P., Wahlen M., Van der Plicht J. Interannual extremes in the rate of rise of atmospheric carbon dioxide since 1980 // *Nature.* — 1995. — V. 375. — P. 666—670.
- Рис. 2.42 Berry J., Björkman O. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants // *Annu. Rev. Plant Physiol.* — 1980. — V. 31. — P. 491—543.
- Рис. 2.43 Ehleringer J. A., Björkman O. Quantum yields for CO₂ uptake in C₃ and C₄ plants // *Plant Physiol.* — 1977. — V. 59. — P. 86—90.

Глава 3

- Рис. 3.7, 3.8, 3.15 Taiz L., Zeiger E. (Eds) *Plant Physiology.* 2-nd edition. — Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc. Publishers, 1998. — 792 p.
- Рис. 3.10 Siedlow J. N., Umbach A. L. Plant mitochondrial electron transfer and molecular biology // *The Plant Cell.* — 1995. — V. 7. — P. 821—831.
- Рис. 3.11, 3.12 *Biochemistry and Molecular Biology of Plants / Eds. B. B. Buchanan, W. Gruissem & R. L. Jones.* — American Society of Plant Physiologists, 2000. — 1408 p.
- Рис. 3.13 Cape J. L., Michael K., Bowman M. K., Kramer D. K. Understanding the cytochrome *bc* complexes by what they don't do. The Q-cycle at 30 // *TRENDS in Plant Science.* — 2006. — V. 11. — P. 46—55.
- Рис. 3.14, 3.18 Nelson D. L., Cox M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry.* Fourth Edition. — 2004. — 1119 p.

- Рис. 3.16 Namslauer A., Brzezinski P. Structural elements involved in electron-coupled proton transfer in cytochrome *c* oxidase // FEBS Letters. — 2004. — V. 567. — P. 103—110.
- Рис. 3.17 Junge W., Lill H., Engelbrecht S. ATP synthase: an electrochemical transducer with rotary mechanics // TRENDS Biochem. Sci. — 1997. — V. 22. — P. 420—423.
- Рис. 3.19 Noji H., Yasuda R., Yoshida M., Kinosita K., Jr. Direct observation of the rotation of F₁-ATPase // Nature. — 1997. — V. 386. — P. 299—302.

Глава 4

- Рис. 4.6 Jung J. S., Preston G. M., Smith B. L., Guggino W. B., Agre P. Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP: The tetrameric-hourglass model // J. Biol. Chem. — 1994. — V. 269. — P. 14648—14654.
- Рис. 4.7 Taiz L., Zeiger E. (Eds) Plant Physiology. 2-nd edition. — Sunderland. Massachusetts: Sinauer Associates Inc. Publishers, 1998. — 792 p.
- Рис. 4.10 Meidner H., Mansfield D. Stomatal Physiology. Physiology of Stomata. — London: McGraw-Hill, 1968.
- Рис. 4.11 Jeffree C. E. Structure and ontogeny of plant cuticles. En: Plant cuticles: An Integrated Functional Approach. G. BIOS Scientific Publishers. — Oxford. UK, 1996. — P. 33—85.
- Рис. 4.13 Zimmerman M. H. Xylem structure and the ascent of sap. — Springer. Berlin Heidelberg New York, 1983. — 325 p.
- Рис. 4.14 Эзау К. Анатомия семенных растений: Т. 1. — М.: Мир, 1980. — 218 с.
- Рис. 4.15 Nobel P. S. Physicochemical and Environmental Plant Physiology. — San Diego: Academic Press, 1991. — 635 p.
- Рис. 4.16 Hsiao T. C. Plant responses to water, efficiency and drought resistance // Agricult. Meteorol. — 1979. — V. 14. — P. 59—84.

Глава 5

- Рис. 5.1 Taiz L., Zeiger E. (Eds) Plant Physiology. 2-nd edition. — Sunderland. Massachusetts: Sinauer Associates Inc. Publishers, 1998. — 792 p.
- Рис. 5.2, 5.3 Duby G., Boutry M. The plant plasma membrane proton pump ATPase: a highly regulated P-type ATPase with multiple physiological roles // Eur J Physiol. — 2009. — V. 457. — P. 645—655.

- Рис. 5.4, 5.5 Sze H., Liang F., Hwang I., Curran A.C., Harper J.F. Diversity and regulation of plant Ca^{2+} pumps: insights from expression in yeast // *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* — 2000. — V. 51. — P. 433—462.
- Рис. 5.6 Williams L. E., Mills R. F. $\text{P}_{1\text{B}}$ -ATPases — an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants // *TRENDS in Plant Science.* — 2005. — V. 10. — P. 491—502.
- Рис. 5.7 Schumacher K., Krebs M. The V-ATPase: small cargo, large effects // *Current Opinion in Plant Biology.* — 2010. — V. 13. — P. 724—730.
- Рис. 5.8 Boekema E. J., Ubbink-Kok T., Lolkema J. S., Brisson A., Konings W. N. Visualization of a peripheral stalk in V-type ATPase: evidence for the stator structure essential to rotational catalysis // *Proc Natl Acad Sci USA.* — 1997. — V. 94. — P. 14291—14293.
- Рис. 5.9 Maeshima M. Vacuolar H-pyrophosphatase // *Biochimica et Biophysica Acta.* — 2000. — V. 1465. — P. 37—51.
- Рис. 5.10 Wanke D., Kolukisaoglu H. U. An update on the ABCC transporter family in plants: many genes, many proteins, but how many functions? // *Plant Biology (Stuttg.)*. — 2010. — V. 12 (Suppl 1). — P. 15—25.
- Рис. 5.12 Kim E. J., Kwak J. M., Uozumi N., Schroeder J. I. *AtKUP1*: an Arabidopsis gene encoding high-affinity potassium transport activity // *Plant Cell.* — 1998. — V. 10. — P. 51—62.
- Рис. 5.13 Ludewig U., Neuhäuser B., Dynowski M. Molecular mechanisms of ammonium transport and accumulation in plants // *FEBS Letters.* — 2007. — V. 581. — P. 2301—2308.
- Рис. 5.14 Kronzucker H. J., Britto D. T. Sodium transport in plants: a critical review // *New Phytologist.* — 2011. — V. 189. — P. 54—81.
- Рис. 5.15 Hirschi K. Vacuolar $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ transport: who's directing the traffic? // *TRENDS in Plant Science.* — 2001. — V. 6. — P. 100—104.
- Рис. 5.16 Karandashov V., Bucher M. Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas // *TRENDS in Plant Science.* — 2005. — V. 10. — P. 22—29.
- Рис. 5.17 Barbier-Brygoo H., De Angeli A., Filleur S., Frachisse J.-M., Gambale F., Thomine S., Wege S. Anion Channels/Transporters in Plants: From Molecular Bases to Regulatory Networks // *Annual Review of Plant Biology.* — 2011. — V. 62. — P. 25—51.
- Рис. 5.18 Satter R.L., Moran N. Ionic channels in plant cell membranes // *Physiol. Plant.* — 1988. — V. 72. — P. 816—820.
- Рис. 5.19 Lebaudy A., Very A.-A., Sentenac H. K^+ channel activity in plants: Genes, regulations and functions // *FEBS Letters.* — 2007. — V. 581. — P. 2357—2366.

- Рис. 5.20 Dreyer I., Blatt M. R. What makes a gate? The ins and outs of Kv-like K^+ channels in plants // Trends in Plant Science. — 2009. — V. 14. — P. 283—390.
- Рис. 5.21 Wheeler G. L., Brownlee C. Ca^{2+} signalling in plants and green algae — changing channels // TRENDS in Plant Science. — 2008. — V. 13. — P. 506—514.
- Рис. 5.22 Dietrich P., Anschütz U., Kugler A., Becker D. Physiology and biophysics of plant ligand-gated ion channels // Plant Biology (Stuttg.). — 2010. — V. 12 (Suppl. 1). — P. 80—93.
- Рис. 5.24 Марти А., Неер Э. Методы регистрации мембранного потенциала и ионных токов. // Регистрация одиночных каналов: Пер. с англ. / Под ред. Б. Сакмана и Э. Неера. — М.: Мир, 1987. — 448 с.

Глава 6

- Рис. 6.1 Rudd J., Frankling-Tong V. Unravelling response-specificity in Ca^{2+} signalling pathways in plant cells // New Phytologist. — 2001. — V. 151. — P. 7—33.
- Рис. 6.2 Schmidt W. Iron solutions: acquisition strategies and signaling pathways in plants // TRENDS in Plant Science. — 2003. — V. 8. — P. 188—193.
- Рис. 6.5 Vessey J. K., Pawlowski K., Bergman B. Root-based N_2 -fixing symbioses: Legumes, actinorhizal plants, *Parasponia* sp. and cycads // Plant and Soil. — 2005. — V. 274. — P. 51—78.
- Рис. 6.7 Taiz L., Zeiger E. (Eds) Plant Physiology. 2-nd edition. — Sunderland. Massachusetts: Sinauer Associates Inc. Publishers, 1998. — 792 p.
- Рис. 6.14 Rovira A. D., Bowen G. D., Foster R. C. The significance of rhizosphere microflora and mycorrhizal in plant nutrition // Encyclopedia of plant physiology. — Berlin: Springer Verlag, 1983. — V. 15A. — P. 61—93.
- Рис. 6.15 Mauseth J. D. Plant Anatomy. — Menlo Park, California: Benjamin/Cummings Publishing Company, 1988. — 560 p.

Глава 7

- Рис. 7.1, 7.4, 7.5 Эзау К. Анатомия семенных растений: В 2 т. — М.: Мир, 1980. — 2 т. — 218 с.
- Рис. 7.2, 7.6 Васильев А. Е. Функциональная морфология секреторных клеток. — Л.: Наука, 1977. — 208 с.

Рис. 7.3 Thomson W. W., Berry W. L., Liu L. L. Localisation and secretion of salt by the salt glands *Tamarix aphylla* // PNAS. — 1969. — V. 63. — P. 310—317.

Рис. 7.8 Васильев А. Е., Воронин Н. С., Еленевский А. Г., Серебрякова Т. И. Ботаника. Анатомия и морфология растений. — М.: Просвещение, 1978. — 480 с.

Глава 8

Рис. 8.3 Jones A. M. Auxin transport: down and out and up again // Science. — 1998. — V. 282. — P. 2201—2203.

Рис. 8.6 Leyser O. Molecular genetics of auxin signaling // Annu. Rev. Plant Biol. — 2002. — V. 53. — P. 377—398.

Рис. 8.7 Berleth Th., Naden T. Krogan N. T., Scarpell E. Auxin signals — turning genes on and turning cells around // Current Opinion in Plant Biology. — 2004. — V. 7. — P. 553—563.

Рис. 8.12 Jones R. L., MacMillan J. Gibberellins. In: Advanced Plant Physiology. — London: The Bath Press, 1984. — P. 21—52.

Рис. 8.13 Jacobsen J. V., Gubler F., Chandler P. M. Gibberellin and abscisic acid action in germinating cereal grains // Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. — Boston: Kluwer, 1995. — P. 246—271.

Рис. 8.14 Jiang C., Fu X. GA action: turning on de-DELTA repressing signaling // Current Opinion in Plant Biology. — 2007. — V. 10. — P. 461—465.

Рис. 8.15 Phinney B. O. Gibberellin A₁, dwarfism and shoot elongation in higher plants // Biol. Plant. — 1985. — V. 27. — P. 172—179.

Рис. 8.16 Wittwer S. H., Bukovac M. J. Gibberellin effects on temperature and photoperiod requirement for flowering of some plants // Science. — 1957. — V. 126. — P. 30—31.

Рис. 8.18 Gan S., Amasino R. M. Cytokinins in plant senescence: from spray and pray to clone and play // BioEssays. — 1996. — V. 18. — P. 557—565.

Рис. 8.19, 8.20 Heyl A., Schmülling Th. Cytokinin signal perception and transduction // Current Opinion in Plant Biology. — 2003. — V. 6. — P. 480—488.

Рис. 8.21 Skoog F., Miller C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro* // Symp. Soc. Exp. Biol., II. — 1957. — P. 118—131.

- Рис. 8.23 Taiz L., Zeiger E. (Eds) *Plant Physiology*. 2-nd edition. — Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc. Publishers, 1998. — 792 p.
- Рис. 8.24 Nambara E., Marion-Poll A. ABA action and interactions in seeds // *TRENDS in Plant Science*. — 2003. — V. 8. — P. 213—217.
- Рис. 8.25 Miyazono K., Miyakawa T., Sawano Y., Kubota K., Kang H.-J., Asano A., Miyauchi Y., Takahashi M., Zhi Y., Fujita Y., Yoshida T., Koudaira K.-S., Yamaguchi-Shinozaki K., Tanokura M. Structural basis of abscisic acid signaling // *Nature*. — 2009. — V. 462. — P. 609—614.
- Рис. 8.26 Raghavendra A. S., Gonugunta V. K., Christmann A., Grill E. ABA perception and signaling // *TRENDS in Plant Science*. — 2010. — V. 15. — P. 395—401.
- Рис. 8.27 Beardsell M. F., Cohen D. Relationships between leaf water status, abscisic acid levels and stomatal resistance in maize and sorghum // *Plant Physiol.* — 1975. — V. 56. — P. 207—212.
- Рис. 8.28 Нелюбов Д. Н. Качественные изменения гравитропизма. / В 2-х частях. — СПб.: Записки императорской Академии наук, 1913—1914.
- Рис. 8.29 McKeon T. A., Fernández-Maculet J. C., Yang, S. F. Biosynthesis and metabolism of ethylene // *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. — Dordrecht, Netherlands. Kluwer, 1995. — P. 118—139.
- Рис. 8.30 Schaller G. E., Kieber J. J. Ethylene // *The Arabidopsis Book*. — American Society of Plant Biologists. Rockville, MD. — 2002. — Vol DOI/10.1199/tab.0071.
- Рис. 8.31 Chang C. Ethylene signaling: the MAPK module has finally landed // *TRENDS in Plant Science*. — 2003. — V. 8. — P. 227—254, 365—368.
- Рис. 8.32 Johnson P. R., Ecker J. R. The ethylene gas signal transduction pathway: a molecular perspective // *Ann. Rev. Genet.* — 1998. — P. 32, 227—254.
- Рис. 8.34 Li J. Brassinosteroids signal through two receptor-like kinases // *Current Opinion in Plant Biology*. — 2003. — V. 6. — P. 494—499.
- Рис. 8.35 Johnson K. L., Ingram G. C. Sending the right signals: regulating receptor kinase activity // *Current Opinion in Plant Biology*. — 2005. — V. 8. — P. 648—656.
- Рис. 8.37 Acosta I. F., Farmer E. E. Jasmonates // *The Arabidopsis Book*. — Rockville, MD: American Society of Plant Biologists. — 2010. URL: <http://dx.doi.org/10.1199/tab.0129>.
- Рис. 8.38 Hayat S., Ali B., Ahmad A. Salicylic acid: biosynthesis, metabolism and physiological role in plants // *Salicylic Acid: A Plant Hormone*. Dordrecht. — The Netherlands. Springer, 2007. — P. 1—14.

- Рис. 8.39 Pieterse C. M. J., Van Loon L. C. NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways // *Current Opinion in Plant Biology*. — 2004. — V. 7. — P. 456—464.
- Рис. 8.40 Ryan C. A., Pearce G., Scheer J., Moura D. S. Polypeptide hormones // *The Plant Cell*. — 2002. — Supplement. — S.251—S264.
- Рис. 8.41 Lindsey K., Casson S., Chilley P. Peptides: new signalling molecules in plants // *TRENDS in Plant Science*. — 2002. — V. 7. — P. 78—83.

Глава 9

- Рис. 9.1 Хржановский В. Г. Курс общей ботаники (цитология, гистология, органография, размножение). — М.: Высшая школа, 1982.
- Рис. 9.2 Pfeffer W. *Physiology of Plants*. — Oxford: Clarendon Press, 1903.
- Рис. 9.3 Bentrup F. W. *Cellular Polarity // Cellular Interactions*. — Berlin: Springer-Verlag, 1984. — P. 473—490.
- Рис. 9.4 Nakajima K., Benfey P. N. Signaling in and out: control of cell division and differentiation in the shoot and root // *Plant Cell*. — 2002. — V. 14. — Supplement. — S265—S276.
- Рис. 9.5 Dodel-Port A., Dodel-Port C. *Erlautender Text zum Anatomisch-physiologischen Atlas der Botanik*. — Esslingen, 1883.
- Рис. 9.7 West M. A. L., Harada J. J. Embryogenesis in higher plants: an overview // *The Plant Cell*. — 1993. — V. 5. — P. 1361—1369.
- Рис. 9.8 Torres-Ruiz R. A., Lohner A., Jürgens G. The *GURKE* gene is required for normal organisation of the apical region in the *Arabidopsis* embryo // *Plant J*. — 1996. — V. 10. — P. 1005—1016.
- Berleth T., Jürgens G. The role of the *Monopteros* gene in organising the basal body region of the *Arabidopsis* embryo. *Development // Development*. — 1993. — V. 118. — P. 575—587.
- Mayer U., Büttner G., Jürgens G. Apical-basal pattern formation in the *Arabidopsis* embryo: Studies on the role of the *GNOM* gene // *Development*. — 1993. — V. 117. — P. 149—162.
- Рис. 9.9 Esau K. *Anatomy of Seed Plants*. — New York: Wiley, 1960. — 376 p.
- Рис. 9.10 Fiers M., Ku K.L., Liu C.-M. CLE peptide ligands and their roles in establishing meristems // *Current Opinion in Plant Biology*. — 2007. — V.10. — P. 39—43.
- Рис. 9.11 Vandebussche F., Van Der Straeten D. Shaping the shoot: a circuitry that integrates multiple signals // *TRENDS in Plant Science*. — 2004. — V. 9. — P. 499—506.

- Рис. 9.12, 9.29 Esau K. *Anatomy of Seed Plants*. — New York: Wiley, 1960. — 376 p.
- Рис. 9.14 Dhonukshe P., Kleine-Vehn J., Friml J. Cell polarity, auxin transport and cytoskeleton mediated division planes: who comes first? // *Protoplasma*. — 2005. — V. 226. — P. 67—73.
- Рис. 9.15 Gersani M., Sachs T. Polarity reorientation in beans expressed by vascular differentiation and polar auxin transport // *Differentiation*. — 1984. — V. 25. — P. 205—208.
- Рис. 9.16 Sieburth L. E., Deyholos M. K. Vascular development: the long and winding road // *Current Opinion in Plant Biology*. — 2006. — V. 9. — P. 48—54.
- Рис. 9.18, 9.20 Taiz L., Zeiger E. (Eds) *Plant Physiology*. 2-nd edition. — Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc. Publishers, 1998. — 792 p.
- Рис. 9.19 Lee J. H., Hong S. M., Yoo S. J., Park O. K., Lee J. S., Ahn H. J. Integration of floral inductive signals by flowering locus T and suppressor of overexpression of *Constans 1* // *Physiologia Plantarum*. — 2006. — V. 126. — P. 475—483.
- Рис. 9.21 Zeevaart J. A. D. Leaf-produced floral signals // *Current Opinion in Plant Biology*. — 2008. — V. 11. — P. 541—547.
- Рис. 9.22 Blázquez M. A. Flower development pathways // *Journal Cell Science*. — 2000. — V. 113. — P. 3547—3548.
- Рис. 9.23 Weigel D., Meyerowitz E. M. The ABCs of floral homeotic genes // *Cell*. — 1994. — V. 78. — P. 203—209.
- Рис. 9.24 Sussex I. M. Developmental programming of the shoot meristem // *Cell*. — 1989. — V. 56. — P. 225—229.
- Рис. 9.25 Parcy F., Nilsson O., Busch M. A., Lee I., Weigel D. A genetic framework for floral patterning // *Nature*. — 1998. — V. 395. — P. 561—566.
- Рис. 9.28 Жизнь растений: В 6 т. / Т. 5: Цветковые растения. / Под ред. А. Л. Тахтаджана. — М.: Просвещение, 1980. — 431 с.

Глава 10

- Рис. 10.1 Nemhauser J., Chory J. Photomorphogenesis // *The Arabidopsis Book*. — American Society of Plant Biologists. Rockville, MD, 2002. — P. 1—12.
- Рис. 10.2 Toole E. H., Borthwick H. A., Hendricks S. B., Toole V. K. Physiological studies of the effects of light and temperature on seed germination // *Proc. Int. Seed Test. Assoc.* — 1953. — V.18. — P. 267—276.

- Рис. 10.3 Vierstra, R. D., Quail P. H. Photochemistry of 124 kilodalton *Avena* phytochrome *in vitro* // *Plant Physiol.* — 1983. — V. 72. — P. 264—267.
- Рис. 10.4 Andel F., Hasson K. C., Gai F., Anfinrud P. A., Mathies R. A. Femto-second time-resolved spectroscopy of the primary photochemistry of phytochrome // *Biospectroscopy.* — 1997. — V. 3. — P. 421—433.
- Рис. 10.5 Oh E., Yamaguchi S., Hu J., Yusuke J., Jung B., Paik I., Lee H. S., Sun T. P., Kamiya Y., Choi G. PIL5, a phytochrome interacting bHLH protein, regulates gibberellin responsiveness by binding directly to the GAI and RGA promoters in *Arabidopsis* seeds // *Plant Cell.* — 2007. — V. 19. — P. 1192—1208.
- Bae G., Choi G. Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2008. — V. 59. — P. 281—311.
- Рис. 10.6 Lin C. Blue light receptors and signal transduction // *The Plant Cell.* — 2002. — Supplement. — S207—S225.
- Рис. 10.7 Thomas B., Dickinson HG. Evidence for two photoreceptors controlling growth in de-etiolated seedlings // *Planta.* — 1979. — V. 146. — P. 545—550.
- Рис. 10.8 Thimann K. V., Curry G. M. Phototropism and phototaxis // *Comparative Biochemistry: Vol. 1.* — New York: Academic Press, 1960.
- Рис. 10.9 Schwartz A., Zeiger E. Metabolic energy for stomatal opening: role of photophosphorylation and oxidative phosphorylation // *Planta.* — 1984. — V. 161. — P. 129—136.

Глава 11

- Рис. 11.1 Батыгина Т. Б., Брагина Е. А., Ересковский А. В., Островский А. Н., Васильева В. Е. Живорождение у растений и животных: беспозвоночных и низших хордовых. — СПб.: Изд-во СПбГУ, 2006. — 132 с.
- Рис. 11.2 Саматова И. С., Гавриленко Т. А., Шарова Е. И., Антонова О. Ю., Дунаева С. Е., Щипарев С. М., Медведев С. С. Особенности физиологии растений, хранящихся при пониженных температурах в условиях *in vitro* / Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях Крайнего Севера. — Апатиты, 2009. — С. 264—265.

Глава 12

- Рис. 12.1 Sievers A., Behrens H. M., Buckhout T. J., Gradmann D. Can a Ca^{2+} pump in the endoplasmic reticulum of the *Lepidium* root be the trigger for rapid changes in membrane potential after gravistimulation // *Z. Pflanzenphysiol.* — 1984. — Bd. 114. — P. 195—200.

- Рис. 12.2 Darwin Ch., Darwin F. The Power of Movement in Plants. — London: John Murray, 1880. (По Kiss J. Z. Up, down, and all around: how plants sense and respond to environmental stimuli // PNAS. — 2006. — V. 103. — P. 829—830.)

Глава 13

- Рис. 13.1 Mansfield M. A., Key J. L. Synthesis of low molecular weight heat shock proteins in plants // Plant Physiology. — 1987. — V. 84. — P. 1007—1017.
- Рис. 13.2 Greenway H., Munns R. Mechanisms of salt tolerance in Nonhalophytes // Annu Rev Plant Physiol. — 1980. — V. 31. — P. 149—190.
- Рис. 13.3 Ward J. M., Hirschi K. D., Sze H. Plants pass the salt // TRENDS in Plant Science. — 2003. — V. 8. — P. 200—201.
- Рис. 13.4 Drew M. C., He C.-J., Morgan P. W. Programmed cell death and aerenchyma formation in roots // TRENDS in Plant Science. — 2000. — V. 5. — P. 123—127.

Глава 14

- Рис. 14.1 Bradley D. J., Kjellbom P., Lamb C.J. Elicitor and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: A novel, rapid defense response // Cell. — 1992. — V. 70. — P. 21—30.
- Рис. 14.2 Brett C., Waldron K. Physiology and biochemistry of plant cell walls. — London: Chapman and Hall, 1996. — 255 p.
- Рис. 14.4 Van Loon L. C., Geraats B. P. J., Linthorst H. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants // TRENDS in Plant Science. — 2006. — V. 11. — P. 184—191.
- Рис. 14.5 Pearce G., Strydom D., Johnson S., Ryan C. A. A polypeptide from tomato leaves activates the expression of proteinase inhibitor genes // Science. — 1991. — V. 253. — P. 895—898.

Глава 15

- Рис. 15.11 Nimz H. Beech lignin — proposal of a constitutional scheme // Angew. Chem. — 1974. — V. 39. — P. 313—321.



Приложение 2

Описание электронного архива. Сайт интерактивных трехмерных моделей биомолекул

По ссылке <ftp://85.249.45.166/9785977507165.zip> можно скачать электронный архив с иллюстрациями к книге. Эта ссылка доступна также со страницы книги на сайте www.bhv.ru.

Иллюстрации распределены по папкам, которые соответствуют главам книги, т. е. в папке Глава_01 находятся рисунки к главе 1 и т. д.

Кроме того, электронный архив содержит список литературных источников, использованных при подготовке иллюстраций.

На специальном сайте по адресу <http://science.pozhvanov.com/mol/> доступны интерактивные трехмерные модели биомолекул, обсуждаемых в главах 2, 8 и 10. Каждая молекулярная модель отображается таким образом, чтобы акцентировать внимание читателя на особенностях структуры биомолекулы, и снабжена подробными комментариями на каждом этапе визуализации.

Вы можете также перейти к интересующей вас модели, введя в адресную строку браузера короткую ссылку из списка далее.

- Фотосистема II
- Светособирающий комплекс II
- Фикобилипротеин
- Цитохром *b₆/f*
- Пластоцианин
- Фотосистема I
- Ферредоксин
- F₀F₁ АТФ-синтаза
- Бактериальная фотосистема из *Rhodospseudomonas viridis*
- Фитохром Б
- Криптохром

goo.gl/mIjPy

goo.gl/s2f5d

goo.gl/YgmsM

goo.gl/b3krl

goo.gl/91PTW

goo.gl/YWXf2

goo.gl/ucHTe

goo.gl/RntCi

goo.gl/KJd2Y

goo.gl/LbiVm

goo.gl/hEQgU

Рекомендуемая литература

1. Алехина Н. Д. и др. Физиология растений / Под ред. И. П. Ермакова. — М.: Академия, 2007. — 640 с.
2. Битюцкий Н. П. Микроэлементы и растение. — СПб.: Изд-во СПбГУ, 1999. — 230 с.
3. Батыгина Т. Б., Васильева В. Е. Размножение растений. — СПб.: Изд-во СПбГУ, 2002. — 230 с.
4. Бутенко Р. Г. Экспериментальный морфогенез и дифференциация в культуре клеток растений. 35-е Тимирязевское чтение. — М.: Наука, 1975. — 51 с.
5. Вайнар Р. Движения растений. — М.: Знание, 1987. — 176 с.
6. Васильев А. Е. и др. Анатомия и морфология растений. — М.: Просвещение, 1978. — 480 с.
7. Вахмистров Д. Б. Питание растений. — М.: Знание, 1979. — 64 с.
8. Вахмистров Д. Б. Пространственная организация ионного транспорта в корне. 49-е Тимирязевское чтение. — М.: Наука, 1991. — 48 с.
9. Гамалей Ю. В. Эндоплазматическая сеть растений. 53-е Тимирязевское чтение. — СПб.: Наука, 1994. — 80 с.
10. Головкин Т. К. Дыхание растений (физиологические аспекты). — СПб.: Наука, 1999. — 204 с.
11. Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений: том 1. — М.: Мир, 1986. — 392 с.
12. Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений: том 2. — М.: Мир, 1986. — 312 с.
13. Гэлстон А., Девис П., Сэттер Р. Жизнь зеленого растения. — М.: Мир, 1983. — 549 с.
14. Горшкова Т. А. Растительная клеточная стенка как динамичная система. — М.: Наука, 2007. — 429 с.
15. Дерфлинг К. Гормоны растений. — М.: Мир, 1985. — 303 с.
16. Ежова Т. А. и др. *Arabidopsis thaliana* — модельный объект генетики растений. — М.: МАКС Пресс, 2003. — 219 с.

17. Жолкевич В. Н. и др. Водный обмен растений. — М.: Наука, 1989. — 256 с.
18. Запрометов М. Н. Фенольные соединения и их роль в жизни растения. 56-е Тимирязевское чтение. — М.: Наука, 1996. — 45 с.
19. Зитте П. и др. Том 2. Физиология растений. На основе учебника Э. Страсбургера и др.; под ред. В. В. Чуба. — М.: Академия, 2006. — 421 с.
20. Иванов В. Б. Клеточные основы роста растений. — М.: Наука, 1974. — 223 с.
21. Измайлов С. Ф. Азотный обмен в растениях. — М.: Наука, 1986. — 320 с.
22. Ильин В. Б. Элементный химический состав растений. — Новосибирск: Наука, 1895. — 129 с.
23. Исаева В. В. Клетки в морфогенезе. — М.: Наука, 1994. — 224 с.
24. Кабата-Пендиас А., Пендиас Х. Микроэлементы в почвах и растениях. — М.: Мир, 1989. — 438 с.
25. Кларксон Д. Транспорт ионов и структура растительной клетки. — М.: Мир, 1978. — 368 с.
26. Крутецкая З. И., Лонский А. В. Биофизика мембран. — СПб.: Изд-во СПбГУ, 1994. — 287 с.
27. Кузнецов Вл. В., Дмитриева Г. А. Физиология растений. — М.: Высшая школа, 2011. — 784 с.
28. Кулаева О. Н. Гормональная регуляция физиологических процессов у растений на уровне синтеза РНК и белка. 41-е Тимирязевское чтение. — М.: Наука, 1982. — 83 с.
29. Курсанов А. Л. Транспорт ассимилятов в растениях. — М.: Наука, 1976. — 646 с.
30. Левицкий Д. О. Кальций и биологические мембраны. — М.: Высшая школа, 1990. — 124 с.
31. Лукнер М. Вторичный метаболизм у микроорганизмов, растений и животных. — М.: Мир, 1979. — 548 с.
32. Люттге У., Хигинботам Н. Передвижение веществ в растениях. — М.: Мир, 1984. — 408 с.
33. Лутова Л. А. и др. Генетика развития растений. — СПб.: Наука, 2000. — 539 с.
34. Лутова Л. А. Биотехнология высших растений. — СПб.: Изд-во СПбГУ, 2003. — 227 с.
35. Лутова Л. А. и др. Генетика развития растений. — СПб.: Издательство Н-Л, 2010. — 431 с.
36. Медведев С. С. Физиологические основы полярности растений. — СПб.: Колна, 1996. — 159 с.
37. Медведев С. С. Электрофизиология растений. — СПб.: Изд-во СПбГУ, 1998. — 179 с.

38. Медведев С. С., Шарова Е. И. Биология развития растений. Том 1. Начала биологии развития растений. Фитогормоны. — СПб.: Изд-во СПбГУ, 2011. — 253 с.
39. Мокроносов А. Т. Фотосинтетическая функция и целостность растительного организма. 42-е Тимирязевское чтение. — М.: Наука, 1983. — 64 с.
40. Нобел П. Физиология растительной клетки (физико-химический подход). — М.: Мир, 1973. — 287 с.
41. Опритов В. А., Пятыгин С. С., Ретивин В. Г. Биоэлектрогенез у высших растений. — М.: Наука, 1991. — 214 с.
42. Пиневич А. В., Аверина С. Г. Кислородная фототрофия. — СПб.: Изд-во СПбГУ, 2002. — 234 с.
43. Полевой В. В., Саламатова Т. С. Физиология роста и развития растений. — Л.: Изд-во ЛГУ, 1991. — 239 с.
44. Рубин А. Б. Биофизика. В 2 т. — М.: МГУ, 2004. — 944 с.
45. Сабинин Д. А. Физиология развития растений. — М.: Изд-во АН СССР, 1963. — 196 с.
46. Саламатова Т. С. Физиология растительной клетки. — Л.: Изд-во ЛГУ, 1983. — 232 с.
47. Саламатова Т. С., Зауралов О. А. Физиология выделения веществ растениями. — Л.: Изд-во ЛГУ, 1991. — 149 с.
48. Семихатова О. А., Чиркова Т. В. Физиология дыхания растений. — СПб.: Изд-во СПбГУ, 2001. — 220 с.
49. Сингер М., Берг П. Гены и геномы: Том 1. — М.: Мир, 1998. — 373 с.
50. Сингер М., Берг П. Гены и геномы: Том 2. — М.: Мир, 1998. — 391 с.
51. Синнот Э. Морфогенез растений. — М.: ИЛ, 1963. — 603 с.
52. Тарчевский И. А. Сигнальные системы клеток растений. — М.: Наука, 2002. — 294 с.
53. Уинфри А. Т. Время по биологическим часам. — М.: Мир, 1990. — 208 с.
54. Уоринг Ф., Филлипс И. Рост растений и дифференцировка. — М.: Мир, 1984. — 512 с.
55. Усманов И. Ю., Рахманкулова З. Ф., Кулагин А. Ю. Экологическая физиология растений. — М.: Логос, 2001. — 223 с.
56. Фотосинтез: Том 1. Под ред. Говинджи. — М.: Мир, 1987. — 728 с.
57. Фотосинтез: Том 2. Под ред. Говинджи. — М.: Мир, 1987. — 460 с.
58. Чайлахян М. Х. Регуляция цветения высших растений. — М.: Наука, 1988. — 560 с.
59. Чиркова Т. В. Физиологические основы устойчивости растений. — СПб.: Изд-во СПбГУ, 2002. — 240 с.

60. Шакирова Ф. М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. — Уфа: Гилем, 2001. — 159 с.
61. Шарова Е. И. Клеточная стенка растений. — СПб.: Изд-во СПбГУ. 2004. — 156 с.
62. Школьник М. Я. Микроэлементы в жизни растений. — Л.: Наука, 1974. — 324 с.
63. Эзау К. Анатомия семенных растений: В 2 т. — М.: Мир, 1980. — 558 с.
64. Biochemistry and Molecular Biology of Plants; eds. B.B. Buchanan, W. Gruissem, R.L. Jones. — American Society of Plant Physiologists, 2000. — 1408 p.
65. Ke B. Photosynthesis, Photobiochemistry and Photobiophysics. — Kluwer Academic Publishers, 2001. — 792 p.
66. Mohr H., Schopfer P. Plant Physiology. — Springer, 1995. — 629 p.
67. Plant Physiology; eds. L. Taiz, E. Zeiger. 4-th Edition Sunderland. — Massachusetts: Sinauer Associates Inc. Publishers, 2006. — 705 p.

Предметный указатель

А

- Абсцизин (дормин) 296
- Абсцизовая кислота 295
 - механизм действия 298
 - синтез 296
- АВС-переносчики 188
- Адаптация 416
- Адгезия 148
- Азот 218
- Азотфиксирующие микроорганизмы:
 - свободноживущие 236
 - симбиотические 236
- Аквапорины 155
- Акклиматизация 416
- Активность иона 176
- Активные формы кислорода (АФК) 142, 429
 - гидроксильный радикал 142
 - образование 142
 - пероксид водорода 142
 - синглетный кислород 142
 - супероксидный анион радикал 142
- Актинориза 237
- Алейроновый слой 354
- Алкалоиды 459
 - истинные 460
 - протоалкалоиды 460
 - псевдоалкалоиды 460
- Аллофикоцианобилины 48
- Альтернативная терминальная оксидаза 138
- Амилопласты 12
- Аминоциклопропан-1-карбоновая кислота (АЦК) 307
- Амины 462
- Аммонификация 235
- Анатомия крапц-типа 78
- Андроцей 382
- Аноксия 426
- Антенный комплекс:
 - фотосистемы I 62
 - фотосистемы II 62
- Антраксантин 47
- Антиоксиданты 143
- Антоцианидины 455
 - цианидин 456
- Антоцианы 455
- Апикальная меристема побега:
 - генетический контроль деления и дифференцировки клеток 360
 - строение 358
- Апикальное доминирование 342
- Апомиксис 357
- Апопласт 7, 22
- Аппарат (комплекс) Гольджи 17
- Аскорбатоксидаза 139
- Аспарагинсинтетаза 245
- Аспаратаминотрансфераза 245
- Ассимиляция:
 - аммония 244
 - нитрата 242
 - сульфата 245
- Аттрагирующий эффект 295
- АТФ-синтаза митохондрий:
 - механизм работы 134
 - строение 134
- АТФ-синтаза хлоропластов
 - строение 73
 - функционирование 73

- АТФ-сульфуриказы 245
 Ауксины 265
 аттрагирующий эффект 274
 метаболизм 266
 механизм действия 270
 транспорт 267
 Ацидоз 427
 Аэренхима 314, 428
- Б**
- Белки:
 LEA 418, 421
 PR 437
 анаэробного стресса 428
 теплового шока 422
 Белковые тела 17
 Белок Риске 60
 Бензиламинопури́н (БАП) 288
 Бензойная кислота 454
 Биотрофы 432
 Бор 233
 Брассиностероиды 314
 Брожение 111
 молочнокислородное 112
 спиртовое 112
- В**
- Вакуоль 18
 Вегетативный этап онтогенеза 357
 Вернализация 336, 375
 Виолаксантин 46
 Виолаксантиновый (ксантофилловый) цикл 47
 Витамин К₁ 60
 Вода:
 агрегатные состояния 147
 гидратация 149
 ионизация 147
 свойства 148
 структура 146
 формы в растениях 150
 Водный дефицит 417
 Водный обмен, степень оводненности 156
 Водный потенциал 152
 Возбудимость 405
 Воска 166
- Вторичные метаболиты 445
 Вторичный метаболизм растений 445
 Выделение веществ растениями 253
 Выращивание растений без почвы 250
- Г**
- Галактуроно́вая кислота 434
 Галофиты 424
 Гаметофит:
 женский (зародышевый мешок) 381
 мужской (пыльца) 382
 Гаметы 369, 380
 Гемиксерофиты 172
 Гемицеллюлозы 25, 30
 Генеративный этап развития 368
 Гены:
 SAR 439
 авирулентности 431, 434
 вирулентности 431
 гомеобокс-содержащие 332
 гомеозисные 331
 контролирующие эмбриогенез 352
 регуляторы (переключатели) развития 331
 светорегулируемые 390
 содержащие MADS-боксы 332
 старения 385
 устойчивости 431, 434, 435
 Гиббереллины 275
 синтез 277
 механизм проведения сигнала 279
 Гигрофиты 173
 Гидатоды 161, 258
 Гидренхима 84
 Гидропоника 250
 Гидротропизм 409
 Гинецей 380
 Гипоксия 426
 Гипофиза 351
 Гликолиз 108
 обращение 111
 Гликофиты 424
 Глиоксилатный цикл 118
 Глиоксисомы 118
 Глутаматдегидрогеназа 244
 Глутаматсинтаза 244
 Глутаминсинтаза 244
 Глутатион 246

Глюкозинолаты 463
Глюконеогенез 111
Глюкуроноарабиноксиланы 30
Гомогалактуронан (полигалактуроновая кислота) 31
Гормональная система растений 264
Гравистимуляция 407
Гравитропизм 407
Градиенты:
 скорости роста 338
 цветения 338
Граны тилакоидов 13
Гуттация 161

Д

Дегидрогеназы:
 анаэробные 106
 аэробные 106
Деление клеток 346
Денитрификация 235
Десмотрубка 7
Дефензины 437, 438
Дезтиоляция 386
Дигидрозеатин 288
Диктиосомы 17
Дифференциация сосудов 366
Дифференцировка 329
Диффузия:
 облегченная 178
 простая (пассивная) 178
Донорно-акцепторные взаимосвязи 341
Дыхание:
 зависимость от содержания кислорода и АДФ 140
 климактерическое 313
 перекисная теория 104
 цианид-устойчивое 137

Ж

Жасмонаты 319
Жасмонилизолейцин 319, 442
Жасмоновая кислота 319, 436, 442
Железистые трихомы (железистые волоски) 254
Железки 255
Железо 227
Женский гаметофит 350

З

Завязь 380
Закаливание растений 419
Замыкающие клетки 35
Зародыш:
 зиготический (половой) 352
 развитие 351
 соматический (эмбрионд) 352
Зародышевый мешок 350, 381
 антиподы 350
 синергиды 350
 центральная клетка 350
 яйцеклетка 350
Засоление 424
Засуха:
 атмосферная 417
 почвенная 417
Защитные пептиды 438
Зеаксантин 46, 47
Зеатин 288
Зигота 350, 380
Зонды флуоресцентные 212

И

Идиообласты 260
Изменчивость соматоклональная 397
Изопентениладенин 288
Изопрен 447
Изопреноиды 447
Иммунитет:
 видовой 432
 врожденный 432
Ингибиторы протеаз 442
Индол-3-уксусная кислота (ИУК) 265
Индукцируемая системная устойчивость 441
Интерфаза 346
Интина 383
Ионные каналы 196
 анионные 205
 калиевые 199
 кальциевые 202
 механочувствительные 207
 неселективные 204
 свойства 198
 строение 197
Ионные насосы 179
Ионофоры 208

К

Калий 220
 Каллоза 90
 Каллус 294, 397
 Кальций 221
 Са-связывающие белки-сенсоры 224
 сигнальные функции 222
 Камбий 345
 Камеди 260, 447
 Капиллярность 148
 Каротиноиды 45
 Каротины 45
 Кatalаза 144
 Кинетин 287
 Клатрины (окаймленные
 пузырьки) 18
 Клетки:
 замыкающие 163
 инициали 344
 обкладки 79
 побочные 163
 спутники 90
 Клеточная пластинка 23
 Клеточная стенка 22
 Клеточное дыхание 101
 Клеточный цикл 347
 Клональное
 микроразмножение 400
 Клонирование растений 397
 Клоны 397
 Клубеньковые бактерии 236
 Клубни 399
 Кобальт 233
 Когезия 148
 Колеоптиль 358
 Комплекс цитохромов *b₆/f* 60
 Корень:
 полярный транспорт ауксина 365
 радиальный транспорт воды 160
 регуляция развития 365
 строение 158, 364
 Корневое давление 160
 Коррелятивное ингибирование
 почек 342
 Коэффициент дыхательный 141
 Крахмал 88
 Кремний 226
 Криопротекторы 420

Криптохромы:
 спектр поглощения 393
 строение 392
 Кристаллогидрат 150
 Кристы митохондрий 15
 Кросс-адаптация 416, 423
 Ксантофиллы 45, 46
 Ксерофиты 172, 417
 Ксилема 35, 168
 Ксилоглюканы 30
 Культура:
 каллусная 397, 403
 меристем 403
 пыльников 403
 Кумарины 455
 фуранокумарины 455
 Кутикула 165
 Кутин 166

Л

Ламеллы стромы 13
 Леггемоглобин 241
 Лейкопласты 12
 Лектины 441
 Лигнин 457
 Липоксигеназы 105
 Лист 34
 формирование 361
 Листовые примордии:
 генетический и гормональный
 контроль формирования 362
 закладка 361
 Луковица 399
 Лютеин 46

М

Магний 225
 Макроэлементы 217
 Марганец 231
 Масляные тела 17
 Мегаспорогенез 381
 Мегаспороцит 381
 Мегаспоры 381
 Медь 229
 Мезофилл 34
 Мезофиты 173, 418
 Мембранные везикулы 212

Меристемы 343
 апикальные 344
 вторичные латеральные 345
 интеркалярные 360
 интеркалярные (вставочные) 345
 первичные латеральные 344
Меристемы флоральные,
 формирование 376
Метаксилема 345
Метафлоэма 345
Метилвый эфир жасмоновой
 кислоты 319
Метод пэтч-кламп 210
Механизм закрывания устьиц под
 действием АБК 302
Микроэлементы 227
Микориза 247
 арбускулярная 248
 эктотрофная 247
Микроклонирование 400
Микропила 351
МикроРНК 337
Микроспорогенез 383
Микроспоры (пыльцевые зерна) 383
Микротрубочки 20
Микрофиламенты 21
Минеральное питание 215
Минорные вторичные
 метаболиты 462
Миозин 22
Митоз 347
Митохондриальный геном 15
Митохондрии 13
Млечники 261, 452
Модификация гистонов 337
 ацетилирование 337
 гликозилирование 337
 метилование 337
 убиквитинирование 337
 фосфорилирование 337
Модификация ДНК 336
 метилование гистонов 336
 метилование ДНК 336
 ремоделирование хроматина 336
Молибден 232
Морозоустойчивость 419
Морфогенез 329
 определяющие факторы 330

Н

НАДФН-оксидаза 435
Насекомоядные растения 413
Настии 411
 гипонастия 411
 сеймонастия 411
 термонастия 411
 фотонастия 411
 эпинастия 411
Натрий 227
Небелковые аминокислоты 462
Некрозы 439
Нектарники 256
Нектотрофы 432
Необычные жирные кислоты 462
Неоксантин 46
Нижний концевой двигатель 160
Никель 233
Нитратредуктаза 242
Нитрификация 235
Нитрогеназа 240
Нуклеоплазма 9
Нуклеопорины 9
Нутации 412

О

Окаймленные пузырьки
 (клатрины) 18
Окислительно-восстановительные
 реакции 106
Окислительное
 фосфорилирование 123, 131
Окислительный (оксидативный)
 стресс 429
Окислительный взрыв 429, 435
Оксигеназы 104
 диоксигеназы 104
 монооксигеназы (гидроксиллазы) 104
Оксидазы 106
 немитохондриальные 139
Оксидоредуктазы 106
Олеозины 17
Олеосомы 17, 118
Онтогенез 329
Оплодотворение двойное 384
Осмоз 153
Отводки 398

П

Паранекроз 406
 Паренхима 34
 губчатая 34
 столбчатая 34
 Парниковый эффект 5, 97
 Партенокарпия 275, 286
 Пектины 26, 31
 Пентозофосфатный путь окисления
 глюкозы 120
 Пептидные гормоны растений 326
 Переносчики:
 аминокислот 196
 анионов 194
 катионов 191
 сахаров 196
 Перидерма 345
 Перинуклеарное пространство 9
 Перицикл 344
 Peroксидазы 144
 Пестик 380
 Плазмодесмы 7, 23
 Плазмолиз 155
 Пластохинол 68
 Пластохинон 57, 68
 Пластохрон 361
 Пластоцианин 64, 230
 Плацента 380
 Плодолистики 380
 Плоды:
 типы 355
 формирование 355
 Поверхностное натяжение 148
 Позиционная информация 343
 Покой:
 вынужденный 356
 семян 356
 физиологический 356
 Покоящийся центр 344
 Полирибосома (полисома) 11
 Полифенолоксидаза 139
 Полифенолы 452
 Полярность 338
 аксиальная 338
 дорсовентральная 338
 радиальная 338
 Почки:
 адвентивные 398
 спящие 398

Превращение жиров в углеводы 118
 Программируемая гибель клеток 385
 Прокамбий 345
 Пропластиды 11
 Прорастание семян 357
 Протеинопласты 12
 Протоксилема 345
 Протоксинины 462
 Протонные АТФазы V-типа 185
 Протофлözема 345
 Пыльца 382
 Пыльцевой мешок 382

Р

Развитие 329
 Разделение зарядов:
 в фотосистеме I 64
 в фотосистеме II 64
 Раздражители 405
 Размножение:
 бесполое 369
 вегетативное 369, 397
 половое 369
 Рамногалактуронан 31
 Растения:
 гомеогидридные 172
 длиннодневные 373
 короткодневные 373
 нейтральные 373
 озимые 375
 пойкилогидридные 172
 регенеранты 397
 соматоклональные 400
 холодостойкие 420
 чувствительные к холоду 420
 эфмероиды 173
 эфмеры 173
 яровые 375
 Реакция:
 гидроксиглирования 140
 десатурации 140
 Мелера 70
 сверхчувствительности 144, 432, 433
 Фентона 143
 Хабера—Вайса 143
 Хилла 51
 Редупликация 346
 Рефлексы 405

- Рибосомы 10
Рибулозобисфосфат-
карбоксилаза/оксигеназа —
РУБИСКО 75
Рост 329
 делением клеток 346
 растяжением 348
Рыльце 380
- С**
- Салициловая кислота 323, 436, 439
САМ-метаболизм (фотосинтез) 83
Сахароза 88
Свет:
 дальний красный 386
 красный 386
 синий 392
Световой компенсационный пункт 92
Светособирающие комплексы 61
 комплекс I 63
 комплекс II 55, 62
Секреторные пузырьки 18
Секреторные структуры:
 внутренние 259
 наружные 254
Секреция 253
Семя:
 строение 354
 формирование 354
Семязачатки (семяпочки) 380
Семязачаток 349
 гипостаза 349
 интегументы 349
 микропиле 349
 нуцеллус 349
 обтуратор 349
 рубчик 349
 фуникулус 349
 халаза 349
Сенильный этап развития 384
Сера 224
Сеть Хартига 247
Сигнальный пептид CLAVATA3 326
Сигнальный пептид ENOD40 327
Симпласт 7, 23
Синтез:
 крахмала 87
 сахарозы 87
Синтез АТФ
 механохимическая гипотеза
 Бойера 131
 обменно-связывающий механизм
 Бойера 134
 хемиосмотическая гипотеза
 Митчелла 131
Сирогем 242
Системин 326, 442
Системная приобретенная
 устойчивость 438
Системный приобретенный
 иммунитет 438
Ситовидная пластинка 89
Ситовидная трубка 90
Ситовидные элементы 89
Слизь 447
 полисахаридная 260
Смола (бальзам) 260
Смоляные ходы 259
Солевые волоски 257
Солевые железки 257
Сопрягающая мембрана 72, 131
Спорополнение 384
Срединная пластинка 24
Стандартный электрод 105
Старение 384
Стаголиты 407
Статоциты 407
Столбик 380
Столony 399
Стресс 415
 оксидативный (окислительный) 143
Стрессоры 415
Суберин 167
Суккуленты 173, 418
Супероксиддисмутаза 142
Суспензор 351
- Т**
- Таксисы 405
Таннины 458
 гидролизуемые 459
 конденсированные 458
Тапетум 382
Температурный компенсационный
 пункт 422
Тепловой шок 422

- Терпеноиды 447
 Терпены 447
 дитерпены 450
 каучук 452
 латекс 447
 монотерпены 448
 политерпены 452
 сесквитерпены 449
 смолы 447
 стероиды 450
 тритерпены 450
 Тетрада 383
 Тигмотропизм 410
 Тилакоиды 13
 гран 35
 стромы 35
 Тионины 437, 438
 Тонопласт 19
 Тотипотентность 397
 Транс-коричная кислота 454
 Транскрипционные факторы 333
 Транспирация:
 кутикулярная 165
 устьичная 162
 Транспорт:
 ассимилятов 88
 вторично-активный
 (сопряженный) 190
 первично-активный 177
 электронов:
 в комплексе цитохромов *b₆f* 68
 в фотосистеме I 68
 в фотосистеме II 67
 во внутренней мембране
 митохондрий 127
 циклический в фотосистеме I 70
 циклический в фотосистеме II 70
 Транспортные АТФазы Р-типа 179
 кальциевые АТФазы 181
 протонные помпы 180
 транспортёры тяжелых металлов 184
 Транспортные пирофосфатазы —
 H⁺-РРазы 187
 Трахеальные элементы:
 трахеиды 168
 членики сосудов 168
 Трахеиды 168
 Трифина 382
 Тропизмы 407
 Тубулин 20
 Тубулярно-везикулярная сеть 23
 Тургор 154
 Тычинка 382
- У**
- Углекислотный компенсационный
 пункт 98
 Удобрения 248
 Уреаза 234
 Устойчивость:
 к фитофагам 441
 кросс 416
 неспецифическая 416
 Устьица 35, 163
 закрывание 164
 открывание 164
 Усы 398
- Ф**
- Факторы:
 быстрого подщелачивания RALF 328
 нодуляции (Nod-факторы) 237
 Феллема (пробка) 345
 Феллоген 345
 Феллодерма 345
 Фенилпропаноидные спирты 457
 Фенольные соединения 452
 фенилаланинаммонийлиаза 454
 Феофетин 54, 63
 Ферредоксин 60
 Ферредоксин-НАДФ-редуктаза 60
 Фикобилипротеины 48
 Фикобилисомы 49
 Фикоцианин 48
 Фикоцианобилины 48
 Фикоэритрин 48
 Фикоэритробилины 48
 Фиксация азота клубеньковыми
 бактериями 236
 Филлотаксис 361
 Филлохинон 60
 Фитоалексины 437, 459
 Фитоантисипины 433, 462
 Фитогормоны 263
 Фитопатология 431
 Фитосидерофоры 228
 Фитосульфокнины 328

- Фитоферритин 228
Фитохром 386
 превращения 389
 строение 389
Фитохромобилин 389
Фитохромы 389
Флавоноиды 455
Флавонолы 456
 кверцетин 456
 кемпферол 456
 мирицетин 456
 рутин 456
Флавононы 456
 гесперидин 456
 нарингенин 456
Флавоны 456
 апигенин 456
 трицин 456
Флавопротеинооксидаза 139
Флоральный стимул (флориген) 372
Флориген 276, 374
Флоэма 35
 загрузка 90
 строение 89
Фосфор 219
Фотодыхание 86
Фотолиазы 393
Фотоллиз (фотоокисление) воды 65
Фотоморфогенез 385
Фотопериод 372, 385
Фотопериодизм 372
Фоторедукция 51, 101
Фотосинтез 33
 С₂-путь фотосинтеза 86
 С₃-путь фотосинтеза 75
 С₄-путь фотосинтеза 78
 С₄-путь, возникновение 95
 влияние света 92
 влияние температуры 98
 влияние углекислоты 95
 квантовый выход 56
 квантовый расход 56
 по типу толстянковых 82
 полуденная депрессия 99
 световые реакции 53
 связывание углекислоты 74
 экология 92
Фотосинтетические единицы 55
Фотосистема I 55, 59
 строение у высших растений 59
 строение у цианобактерий 60
Фотосистема II 55
 строение у высших растений 57
 строение у цианобактерий 58, 59
Фотосистемы, реакционные центры 63
Фототропизм 385, 395, 409
Фототропин 409
 строение 395
 функции 395
Фотофосфорилирование 72
Фрагмопласт 23
- Х**
- Халконы 454
Хемибиотрофы 432
Хемиосмотическая гипотеза
 Митчелла 132
Хемиосмотическая теория Митчелла 72
Хемотропизм 410
Хиноны 459
Хитозаны 434
Хлор 234
Хлоренхима 34
Хлоропласт 11, 35
 внутренняя мембрана 35
 наружная мембрана 35
Хлорофиллы 36
 синтез 43
 спектры поглощения 39
 строение 37
 физико-химические свойства 37
 энергетические состояния 40
Холодостойкость 419
Хроматическая комплементарная
 адаптация водорослей 50
Хромопласты 11
Хромосома 9
- Ц**
- Цветение:
 инициация 371
 этапы 371
Цветок:
 АВСЕ-модель формирования 380
 АВС-модель формирования 378
 строение 369
 формирование органов 378

- Целлюлоза 26
Целлюлозные микрофибриллы 25
Цианогенные гликозиды 463
Цикл:
 аскорбат-глутатионовый (путь Холливэла—Асада) 144
 ди- и трикарбоновых кислот 113
 Кальвина 75
 убихиноновый 128
 Янга 308
Цинк 230
Цистеин-богатые пептиды S-локуса SCR 328
Цитокинины 287
 метаболизм в растениях 288
 механизм действия 291
Цитоскелет 20
- Ч, Ш**
- Чечевички 167
Шапероны 423
Шикиматный путь 452
- Э**
- Эвокация 375
Экзина 383
Экскреция 253
Экстенсины 436
Элайопласты 12
Электродный потенциал 105
Электрон-транспортная цепь митохондрий:
 комплекс I, 123
 комплекс II, 125
 комплекс III, 125
 комплекс IV, 127
Электрон-транспортные цепи митохондрий 123
 немитохондриальные 139
 тилакоидов 66
Электрхимический потенциал 175
- Элиситоры 434
Эмбриогенез 348, 350
 соматический 400
Эмбрионы:
 соматические 400
Эндоплазматический ретикулум:
 гладкий 17
 шероховатый (гранулярный) 17
Эндопласт 7
Эндосперм 354
Эндотеций 382
Эпигенетика 336
Эпидерма 35
Эпинастия 312, 427
Этапы онтогенеза:
 вегетативный 329
 генеративный 329
 сенильный 329
 эмбриональный 329
Этилен 305
 механизм действия 308
 синтез 306
 тройной ответ 311
 формирование гипокотильного крючка 312
Этиоляция 385
Этиопласты 11
Эуксерофиты 172
Эфемеры 418
Эфирные масла 260, 449
Эффект:
 Пастера 141
 Эмерсона 1 52
 Эмерсона 2 57
- Я**
- Ядерная пора 9
Ядро 9
Ядрышко 9
Ядрышковый организатор 9
Яровизация 336, 375