

Міністерство аграрної політики України
Харківський національний аграрний університет ім. В.В. Докучаєва

Ю.Є. Колупаєв

ОСНОВИ ФІЗІОЛОГІЇ СТІЙКОСТІ РОСЛИН

Курс лекцій

Харків – 2010

УДК 581.1
ББК 28.57
К 61

Рецензенти: *чл.-кор. НАН України, докт. біол. наук, професор Л.І.Мусатенко*
(Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, м. Київ);
докт. біол. наук Т.М.Шадчина
(Національний університет біоресурсів і природокористування
України, м. Київ)

Колупасв Ю.Є.

К 61 Основи фізіології стійкості рослин: Курс лекцій. – Харків, 2010. – 121 с.

ISBN 978-966-1664-88-2

У навчальному посібнику в формі лекцій викладені фізіолого-біохімічні і структурно-функціональні аспекти стійкості і адаптації рослин до дії стресорів біотичної та абіотичної природи. Особлива увага приділена механізмам передачі стресових сигналів у генетичний апарат клітини, взаємодії неспецифічних і специфічних механізмів стійкості. Наводяться короткі відомості про методи діагностики стійкості рослин до дії стресорів.

Посібник призначений для студентів біологічних спеціальностей вищих навчальних закладів, також може бути використаний аспірантами і викладачами.

ББК 28.57

Друкується за рішенням ученої ради
Навчально-наукового інституту агробіології
Харківського національного аграрного університету
ім. В.В. Докучаєва

ISBN 978-966-1664-88-2

© Колупасв Ю.Є., 2010

ВСТУП

З'ясування механізмів стійкості рослин до несприятливих умов навколишнього середовища в останні десятиліття увійшло до числа найбільш актуальних проблем фізіології рослин і загальної біології. Це зумовлено, зокрема, глобальними кліматичними змінами та зростанням антропогенного тиску на біосферу.

Вплив на рослини екстремальних температур є одним з найбільш поширених абіотичних несприятливих чинників (стресорів). На 40% територій помірного клімату Землі рослини зазнають впливу підвищених стресових температур. Особливої актуальності проблема теплостійкості рослин набуває у зв'язку з глобальним потеплінням. Воно загрожує не лише сільськогосподарській сфері, а й збереженню біорізноманіття. Так, згідно з прогнозами, наступне підвищення середньої температури на 1°C може призвести до скорочення видового різноманіття рослин в Європі на третину (Thuiller et al., 2005). Водночас, незважаючи на підвищення середньорічної температури, для більшості країн Європи актуальність проблеми холодо- і морозостійкості рослин також посилюється. Зимові відлиги, що чергуються з раптовими морозами, призводять до серйозних пошкоджень і зниження урожайності озимих злаків. Більш раннє настання метеорологічної весни підвищує ймовірність пошкодження рослин внаслідок весняних заморозків.

Іншим несприятливим кліматичним чинником, дія якого посилюється, є нестача вологи. Так, на території України в останню чверть століття спостерігається стійка тенденція до зниження річної кількості опадів.

Крім сільськогосподарського аспекту, проблема стійкості має велике природно-екологічне значення, адже здатність рослин адаптуватися до умов існування – один із факторів, що визначає ареали поширення видів на планеті і можливість їх інтродукції.

Актуальність досліджень стійкості рослин також зумовлюється посиленням впливу на них різноманітних чинників антропогенного походження (важкі метали, газоподібні токсиканти, органічні ксенобіотики, різні види випромінювання тощо).

Упродовж більшої частини 20 століття досліджувалася феноменологія загального адаптаційного синдрому і фізіологічних змін, що супроводжують пристосування рослин до конкретних

несприятливих чинників. На якісно новому рівні дослідження механізмів адаптації почалися після з'ясування загальних принципів передачі стресових сигналів в рослинних клітинах, ідентифікації генів і кодованих ними специфічних білків, причетних до розвитку стійкості (Тарчевский, 2002; Дмитриев, 2003; Kasperska, 2004; Bhattacharjee, 2005; Kaur, Gupta, 2005, Колупаев, Карпец, 2010). Але такий підхід у вивченні проблеми стійкості досі не знайшов відображення у вітчизняній навчальній літературі.

Зважаючи на сказане, автор поставив за мету представити в доступній формі сучасні уявлення про загальні принципи відповіді рослин на дію несприятливих чинників (стресорів) та механізми формування конкретних адаптивних реакцій. В основу посібника покладений курс лекцій, що читається автором у Харківському національному аграрному університеті ім. В.В.Докучаєва для магістрантів факультету захисту рослин. Номінально курс розрахований на 24 години (12 лекцій). Перші чотири лекції присвячені загальним питанням стресу, адаптації, стійкості і механізмів передачі стресового сигналу в геном рослинної клітини. Наступні – побудовані за класичним «факторіальним» принципом і відображають в основному специфічні механізми стійкості до конкретних несприятливих чинників.

Посібник адресований передусім студентам біологічних спеціальностей вищих навчальних закладів, де читається курс «Фізіологія стійкості рослин», він може бути використаний при вивченні відповідних розділів загального курсу фізіології рослин. Також видання може використовуватися спеціалістами у галузі фізіології і екології рослин.

Автор вдячний кандидату біологічних наук Ю.В.Карпцю за вагому допомогу у доборі матеріалу і рецензентам чл.-кор. НАН України Л.І.Мусатенко і доктору біологічних наук Т.М.Шадчиній за уважне прочитання рукопису, що дозволило уникнути ряду помилок і неточностей.

Лекція 1

ПОНЯТТЯ ПРО СТРЕС, ПРИСТОСУВАННЯ І СТІЙКІСТЬ РОСЛИН

Рослинні організми в природних і штучних умовах зазнають впливу різноманітних чинників середовища, що практично постійно змінюються. До них належать:

- *фізичні фактори* – температура (висока, низька, охолодження, заморожування, перегрів); гідратація (посуха, затоплення), світло (висока інтенсивність, низька інтенсивність); радіація (ультрафіолет, α -, β -, γ - та X - випромінювання); магнітне поле (гравітація);
- *хімічні фактори* (солі, важкі метали, кислотність середовища, газоподібні токсиканти, гербіциди тощо);
- *біотичні фактори* (інфекції, комахи);
- *механічні фактори* (вітер, тиск, пошкодження).

Вплив таких чинників може досягати небезпечних амплітуд. Водночас не будь-який вплив здатний викликати реакцію організму. Частина зовнішніх абіотичних і біотичних факторів необхідна для нормального перебігу біологічних процесів. Наприклад, макро- і мікроелементи, освітленість, волога, вуглекислий газ, гравітація, організми-симбіонти тощо. Ці умови можуть бути навіть далекими від оптимальних, але вони так чи інакше задають вихідний (фоновий або контрольний) стан біосистеми (рослини). Рівні цих чинників, необхідні для функціонування, росту, розвитку і розмноження біологічних об'єктів, прийнято називати підтримуючими (Костюк, Михеев, 1997). Умовно виділяють також індіферентні рівні зовнішніх чинників, що не мають істотного впливу на організм. Вживають і поняття «фонового» рівня, наприклад, фонові температури (Титов и др., 2006). Як показують дослідження, зміни температури в межах фонові зони не позначаються на стійкості рослин.

В умовах незначних змін зовнішніх чинників сталість параметрів функціонування організму підтримується *гомеостатичними* механізмами. Термін *гомеостаз* було введено У.Кенноном у 1929 році. Під гомеостазом розуміють стабільність

біологічних об'єктів, здатність зберігати сталість свого внутрішнього середовища, підтримувати фізіологічні характеристики в певних межах (межі норми). Гомеостаз забезпечується в клітинах і організмі за рахунок авторегуляції і керування метаболічними процесами. Коли говорять про гомеостаз, мають на увазі стаціонарний рівень обмінних процесів у відносно короткий порівняно з періодом розвитку організму відрізок часу.

Переведення організму в кількісно і якісно інший стан здатні забезпечити рівні факторів, що виходять за межі фонових, тобто перевищують поріг чутливості. Саме такі фактори умовно можуть бути названі *стресовими*. Під впливом стресових чинників рослинний організм може переходити від фізіологічно нормального до стану стресу.

Термін «стрес» був перенесений в фізіологію рослин з медичної науки і міцно закріпився в лексиконі фізіології стійкості рослин. За автором концепції стресу Г.Сельє, *стрес* – це загальна неспецифічна реакція організму на будь-яку вимогу (Сельє, 1992). Фактори, що спричиняють стан стресу, Сельє назвав стресорами, а сукупність змін, що відбуваються під впливом стресорів, адаптаційним синдромом, виділивши у ньому три фази: тривоги, адаптації і виснаження. Такий поділ на стадії досить умовний.

Виокремлення явищ, сукупність яких складає стрес, ускладнюється тим, що за дії стресорів відбуваються, по-перше, *пошкодження*, що виявляються на різних рівнях структурної і функціональної організації рослини, наприклад, денатурація білків, порушення напівпроникності мембран, нагромадження в клітинах токсичних метаболітів тощо; по-друге, мають місце *реакції-відповіді*, що дозволяють рослинам пристосовуватися до нових умов. Вони супроводжуються змінами в експресії генів, метаболізмі, фізіологічних функціях. Процеси, пов'язані з пошкодженням і пристосуванням, можуть відбуватися одночасно, проте на різних стадіях стресової реакції співвідношення між ними може змінюватися.

За уніфікованою концепцією стресу, що включає оригінальну концепцію стресу Г.Сельє і доповнення, у відповідях рослин на стрес виділяють чотири фази (Кордюм и др., 2003):

1. Фаза відповіді – реакція тривоги (початок стресу). Вона виявляється у відхиленні від функціональної норми, зниженні життєздатності.

2. Фаза відновлення, що включає в себе процеси адаптації, репарації і ефект досягнення підвищеної стійкості.

3. Фаза виснаження. Настає якщо інтенсивність стресового впливу надто висока, перевищує адаптаційні можливості. Вона закінчується хронічною хворобою або загибеллю.

4. Фаза регенерації – часткове або повне відновлення фізіологічної функції після припинення дії стресора і за умови, що ушкодження було не надто сильним.

Необхідно відзначити, що універсального і прийнятого усім біологічним співтовариством визначення стресу досі немає. Поширеною є точка зору, згідно з якою під стресом розуміють комплекс змін у клітині (організмі), який забезпечує підтримання нативності у той час, коли зовнішні впливи такі, що гомеостатичні механізми вже недостатні для підтримання життєдіяльності, а нові генотипні пристосування ще не завершені через повільну їх реалізацію (Веселовский и др., 1993). Тобто стресовим пропонується вважати стан системи в момент переходу у новий стаціонарний стан.

Стресові реакції передують змінам експресії генів, які забезпечують довготривале (чи відносно довготривале) пристосування. Сукупність стресових і пристосувальних реакцій визначається терміном *аклімація*. В процесі аклімації рослина набуває стійкості до дії стресора. Аклімація відбувається за життя організму і не успадковується. Разом з тим вона здійснюється на основі тих можливостей, які закладені в генотипі, тобто в межах спадково обумовленої амплітуди можливих змін у реалізації генотипу. Прикладом аклімації є загартування рослин (зокрема, до низьких або високих температур).

Нерідко у науковій літературі термін «аклімація» замінюють терміном *адаптація*, розуміючи під адаптацією стан біологічного об'єкта, що характеризується підвищеною стійкістю до повторної дії стрес-фактора, який спричинив відповідні пристосувальні реакції, або ж до іншого фактора (перехресна чи множинна адаптація) (Костюк, Михеев, 1997). Водночас у більш точному розумінні слова терміном «адаптація» визначають *спадково* закріплену конститутивну ознаку, присутню в рослині незалежно від того, перебуває вона в стресових умовах чи ні (Ермаков и др., 2005). Адаптації роблять популяцію організмів пристосованою до відповідних умов навколишнього середовища. Проте традиційно терміном «адаптація» часто визначають і пристосувальні реакції, які складають аклімацію, а

також сам процес формування таких реакцій. У разі ж спадкового закріплення адаптивних ознак явище називають *генетичною адаптацією*.

Під переходом від стресу до власне пристосувальних (адаптивних) реакцій (аклімації) слід розуміти зміну експресії генів, що виявляється в інгібуванні активних генів, котрі в нормі контролюють ріст, розвиток, фотосинтез та інші функції рослинного організму. При цьому активується система генів, що забезпечує пристосованість організмів до існування в несприятливих (інших) умовах. Наприклад, генів стресових білків та генів, що контролюють синтез специфічних адаптогенів і протекторів. Завершується ця фізіолого-біохімічна перебудова структурними змінами або морфологічними проявами пристосування. Морфологічні адаптивні зміни виявляються від рівня клітини і тканини (форма і розміри клітин, структура тканин, їх спеціалізація) до рівня цілісного організму (зміна розмірів, форми, співвідношення різних органів тощо).

Завдяки адаптивним змінам формується *стійкість* організму до несприятливих чинників. Термін «стійкість» ще не має однозначного визначення в літературі. Так, М.М. Мусієнко (2006) тлумачить стійкість як реакцію організму на дію несприятливих факторів; здатність витримувати стресові навантаження; ймовірність ефективного функціонування біологічного об'єкта; фактор надійності організму як живої системи.

Стойкість – генетично детермінована ознака, що успадковується. Водночас стійкість рослин змінюється в онтогенезі і під впливом зовнішніх умов. Це значною мірою потенційна властивість рослин і може бути повністю реалізована в екстремальних ситуаціях. Лише спостерігаючи за характером реакції-відповіді можна отримати інформацію про стійкість даного організму до певного чинника. Стойкість рослин до багатьох природних чинників (стресові температури, посуха, засолення середовища) визначається функціонуванням *конститутивних* та *індукованих* захисних систем. Обидва компоненти стійкості детерміновані генетично. Їх принципова відмінність полягає у тому, що конститутивні системи постійно перебувають у функціонально активному стані, а індуковані – в нормі відсутні і виявляються лише у відповідь на дію ушкоджуючого чинника (виникають після аклімації). Так, конститутивні механізми солестійкості більш виражені у галофітів,

для яких засолене середовище є нормою, а індуковані – у глікофітів, на які засолення діє як стресор. Наявність у рослин конститутивних механізмів стійкості до тих чи інших чинників середовища зумовлена генетичною адаптацією протягом еволюції. При цьому використовуються всі можливі стратегії пристосування, у тому числі й мутації. Водночас, як уже зазначалося, індуковані механізми стійкості можуть формуватися в ході життя індивідуального організму внаслідок аклімації, набутої під час попередньої дії на організм того самого фактора, тобто є результатом загартування.

Рослини з вираженою конститутивною стійкістю пошкоджуються за вищої інтенсивності дії стресора порівняно з нестійкими рослинами, які адаптуються до даного стресора переважно за рахунок індукованих механізмів стійкості.

Необхідно наголосити, що стійкість є відносною характеристикою видів і сортів рослин. Для визначення стійкості зразків для потреб селекції використовують сорти-класифікатори.

Стійкість рослин до стресорів забезпечується передусім особливостями такої базової ознаки життя як метаболізм – сукупність процесів обміну речовин. Функції метаболізму полягають не лише у забезпеченні біосистеми пластичними речовинами та енергією, а й у сприйнятті, збереженні, переробці і використанні інформації.

У процесі еволюції у клітин з'явилися пристосування, що дозволяють сприймати, перетворювати та посилювати зовнішні сигнали хімічної і фізичної природи і за допомогою генетичного апарату реагувати на них. При цьому внаслідок перебудови обміну речовин в клітинах, які отримали первинний сигнал, можливе утворення інших сигнальних молекул, що спричиняють відповідь інших клітин, розташованих на значній відстані від місця дії на рослину первинного сигналу.

Можна вважати, що всі адаптивні події на рівні індивідуального організму відбуваються внаслідок змін в інформаційному полі клітин (див. лекцію 3). Адекватна відповідь рослини на дію стресора відбувається, якщо рослина «розпізнає» стресор на клітинному рівні. Первинні сигнали, після їх розпізнавання за допомогою рецепторів, за посередництва різних сигнальних систем спричиняють реакцію з боку геному клітин, що виявляється в репрограмуванні експресії генів. По суті сигнальні системи у поєднанні з гормональною регулюють роботу основного сховища інформації – молекул ДНК. З іншого боку, ці системи самі перебувають під контролем геному.

Безпосередньо внаслідок перепрограмування геному відбуваються метаболічні (біохімічні) зміни, які, в свою чергу, призводять до фізіологічної і морфологічної адаптації (аклімації).

Незважаючи на значні успіхи у дослідженні механізмів стійкості живих організмів, саме поняття «стійкість» для біологів досі залишається багато в чому інтуїтивним. Цим поняттям визначається спроможність організмів (популяцій) зберігати життєздатність в умовах, що змінюються (Веселова и др., 1993). Як уже зазначалося, рівень стійкості конкретного організму не є сталим. Він може підвищуватися під впливом загартування, знижуватися під час первинної реакції на стресор. Неоднакова стійкість в ході онтогенезу. Вона низька під час проростання насіння, підвищується при закладанні вегетативних органів і падає при формуванні генеративних. Максимальна стійкість організмів спостерігається при анабіозі.

Анабіоз – тимчасовий стан організму, коли всі життєві процеси у ньому уповільнюються настільки, що зникають видимі ознаки життя. У різних організмів стан анабіозу може тривати від кількох хвилин до багатьох років. У багатьох організмів тимчасове пригнічення чи майже повне припинення життєдіяльності увійшло в нормальний цикл розвитку (насіння, спори, цисти).

Складний характер явища стійкості виявляється у варіюванні результатів вимірювання залежно від характеру впливу несприятливого чинника (раптовий, пролонгований, хронічний) і умов спостереження за станом організму після припинення дії стресора (Александров, 1975). Якщо здійснюється короткочасний інтенсивний вплив (наприклад, нагрівання) з реєстрацією ефекту одразу після нього, то визначається *первинна* стійкість. Це стійкість, яка не включає в себе механізмів відновлення (репарації) порушених структур і функцій. У разі вимірювання стійкості у тривалих експериментах або ж при визначенні її за виживанням рослин чи інтенсивністю їх росту через певний час після дії стресора йдеться про *загальну* стійкість. Умовно кажучи, загальна стійкість являє собою поєднання механізмів, що забезпечують первинну стійкість та ліквідацію завданих пошкоджень (репарацію).

Лекція 2

НЕСПЕЦИФІЧНІ І СПЕЦИФІЧНІ МЕХАНІЗМИ АДАПТАЦІЇ РОСЛИН

Стійкість рослин до несприятливих чинників забезпечується комплексом *неспецифічних* і *специфічних* адаптивних реакцій. Неспецифічними називають реакції, характер яких не залежить від природи діючого стресора. Специфічні зміни різняться залежно від природи стресора. Водночас питання про специфічність адаптивних реакцій рослин є одним з найбільш спірних в проблемі стійкості, дискусія стосовно цього питання у тій чи іншій формі тривала протягом всього 20 століття і не втратила актуальності досі.

Одні дослідники вважають, що основними механізмами стійкості є неспецифічні (Удовенко, 1979, Александров, 1985). Як вагомий аргумент на користь такої точки зору наводяться численні дані про підвищення стійкості рослин до одних несприятливих чинників попередньою дією інших (перехресне загартування: наприклад, підвищення солестійкості під впливом нагрівання або, навпаки, зростання теплостійкості рослин після попередньої обробки солями). Ще однією підставою для визнання важливої ролі неспецифічних адаптивних механізмів є стійкість клітин і організмів до чинників, з якими вони не стикалися в ході еволюції (наприклад, ксенобіотиків).

Інша точка зору полягає у тому, що стійкість забезпечується передусім специфічними пристосувальними реакціями, адекватними природі пошкоджуючого чинника (Генкель, 1982). Прихильники такої точки зору наводять приклади зниження стійкості рослин до одного стресового чинника при довготривалій адаптації до іншого, можливості протилежно спрямованих змін хімічного складу організму залежно від характеру чинника, до якого відбувається адаптація. Так, наприклад, збільшення ступеня ненасиченості ліпідів біомембран, яке відбувається при адаптації рослин до холоду і спрямоване на зниження температури їх фазового переходу, може призводити до порушення функцій біомембран за високих температур.

Для того, щоб розібратися в біологічній доцільності поєднання специфічних і неспецифічних реакцій клітин і організмів на дію стресорів, необхідно розглядати клітину і організм як систему, функціонування якої відрізняється від конгломерату (Александров, 1985).

Конгломерат, що складається із непов'язаних елементів, різних за своєю фізико-хімічною природою, за дії різних агентів змінюватиметься неоднаково, специфічно, якщо до одних чинників менш стійкими виявляться одні його елементи, а до інших – інші. Система, в якій різномірні складові перебувають у жорсткому взаємозв'язку, на дію різних агентів може реагувати одноманітно, неспецифічно, незважаючи на те, що різні агенти первинно змінюватимуть різні елементи системи. Живі клітини і організми не конгломерати, вони є системами. Проте зв'язки між елементами, з яких вони складаються, зафіксовані не жорстко, лабільно. Через це живим системам притаманна здатність реагувати на дію фізіологічних подразників (стресорів), поєднуючи у своїй відповіді як специфічні, так і неспецифічні риси.

Пояснюючи причини неспецифічного реагування клітини, необхідно наголосити, що кожен її елемент не автономний, а підпорядкований системі в цілому. Реагуючи на зміну зовнішніх умов, клітина тією чи іншою мірою модифікує функціональну активність всіх своїх елементів. Інтеграція життєдіяльності здійснюється кількома шляхами. Однією з її передумов є хімічна єдність продуктів функціонування каталітичних систем, наявність поліфункціональних коферментів, єдиних проміжних метаболітів, що беруть участь в різних метаболічних циклах. Невелика кількість типів і механізмів реакцій створює сприятливі умови для їх координованої взаємодії.

Іншою передумовою для об'єднання клітинного метаболізму є наявність структурних елементів, передусім мембран. Більшість ферментів функціонує не у розчинному вигляді, а в формі асоціатів, вмонтованих в мембрани. В мембранах локалізовані основні цикли клітинного обміну. Мембранні утворення рослинної клітини складають в середньому близько половини маси її сухих речовин. Мембрани розділяють об'єм клітини на відокремлені простори – компартменти. Але останні не є непроникними, навпаки, мембрани допомагають інтегрувати клітинний метаболізм в цілому.

Важливу роль в інтеграції метаболізму і впорядкування структури клітини відіграє також її цитокелет. Його утворюють внутрішньоклітинні фібрилярні структури: мікротрубочки (діаметр 20-30 нм), актинові філаменти (5-7 нм) і проміжні філаменти (10 нм).

Отже, надмолекулярні структури рослинної клітини, представлені мембранами, цитоскелетом і позаклітинним матриксом, можна розглядати як загальну механічну конструкцію. Хоча елементи цієї системи постійно оновлюються, її цілісність зберігається за рахунок надлишку слабких зв'язків. Останні легко руйнуються, адже їх енергія всього в кілька разів перевищує енергію молекул за кімнатної температури, але так само швидко відновлюються. Тому механічний каркас рослинної клітини є динамічним утворенням. Крім виконання структурно-опорної функції, мембрани і цитоскелет впливають на просторову і часову організацію метаболізму. Сигнали від плазматичної мембрани, в якій локалізовані різні білкові рецептори, транслюються в геном.

Розглядаючи клітину як систему універсальних елементів, необхідно наголосити на універсальності структури основних носіїв інформації клітин – ДНК і генів та механізмів, які обслуговують реалізацію цієї інформації (Тарчевский, 2002). Це стосується реплікації ДНК і транскрипції, структури і механізму дії рибосом, а також механізмів регуляції експресії генів під впливом зміни умов існування клітини (організму). Зміна експресії генів відбувається за участю значною мірою універсальних сигнальних систем. Ланки сигнальних систем також в основному уніфіковані. За влучним виразом І.А. Тарчевського, «природа, знайшовши свого часу оптимальне структурне і функціональне вирішення біохімічного та інформаційного завдання, зберігає і тиражує це рішення в процесі еволюції».

У більшості випадків найрізноманітніші хімічні сигнали, що надходять з навколишнього середовища, вловлюються клітиною за допомогою спеціальних «антен» – рецепторних білкових молекул, які пронизують клітинну мембрану і виступають над її поверхнями із зовнішнього і внутрішнього боків. Нековалентна взаємодія зовнішньої ділянки рецептора з тією чи іншою сигнальною молекулою, що надходить із середовища, яке оточує клітину, призводить до зміни конформації рецепторного білка. Він може контактувати з білками-посередниками (наприклад, G-білками), які виконують функції перетворювача сигналу, передаючи сигнальний

конформаційний імпульс на стартові ферменти сигнальних систем (див. лекцію 3). Під їх впливом з'являються сигнальні метаболіти. Ці метаболіти прямо, а частіше через систему універсальних внутрішньоклітинних месенджерів (посередників) змінюють активність протеїнкіназ. Протеїнкінази є однією з найважливіших ланок сигнальних систем. Це ферменти, що переносять залишок фосфорної кислоти з АТФ на ті чи інші білки, зокрема, білкові фактори регуляції транскрипції. Структура останніх також значною мірою уніфікована, а модифікації структури визначають належність факторів регуляції транскрипції до тієї чи іншої сигнальної системи (Тарчевский, 2002). Фосфорилування факторів регуляції транскрипції зумовлює зміни конформації цих білків, їх активацію і наступну взаємодію з промотроною ділянкою певного гена, що призводить до зміни інтенсивності його експресії (індукції або репресії), а у крайніх випадках – до активації непрацюючих генів або «вимкнення» активних. Репрограмування експресії сукупності генів геному спричинює зміни співвідношення білків в клітині, що і є основою її функціональної відповіді.

З'ясування механізмів передачі стресових сигналів в клітині дозволило по-новому поглянути на комплекс неспецифічних реакцій на дію стресорів різної природи. Чимало так званих неспецифічних змін є проявом або наслідком активації стресорами відносно невеликої кількості неспецифічних сигнальних систем (Тарчевский, 2002).

Необхідно наголосити, що первинний вплив стресора на клітину може бути більш або менш специфічним. Навіть такий чинник як висока температура може спершу вибірково вплинути на певний термолабільний білок. Вибірковою є первинна дія на компоненти клітини хімічних сполук, наприклад, антибіотиків чи інших антибактеріальних препаратів, які мають конкретні мішені впливу. Взаємодіючи з ними, вони впливають на певну ланку метаболізму бактеріальної клітини. Наприклад, сульфамідний препарат, проникнувши в бактеріальну клітину, заміщує *p*-амінобензойну кислоту, що призводить до порушення синтезу фолієвої кислоти, яка відіграє роль коферменту при синтезі ряду амінокислот та азотистих основ. У кінцевому підсумку порушення низки важливих синтезів спричиняє загибель бактерії. Ссавці не мають власної системи синтезу фолієвої кислоти і отримують її з їжею. Тому сульфамідні

препарати для клітин ссавців не є антиметаболітами, що дає змогу використовувати їх як бактерицидні препарати.

З наведеного прикладу випливає, що завдяки вибірковій чутливості окремих компонентів клітини, можна отримати специфічні реакції на селективно діючі речовини. Однак порушення практично будь-якої ланки в клітинному метаболізмі, через взаємопов'язаність елементів клітинної системи, не може не позначитися на інших частинах і на системі в цілому. Надалі виявляється комплекс неспецифічних змін. Частина цих змін може бути деструктивною, а частина може мати певне фізіологічне значення (наприклад, активація сигнальних систем, яка може призвести до формування адаптивних реакцій). Співвідношення між деструктивними і «корисними» змінами може визначатися інтенсивністю дії стресового чинника (величиною стресової температури, дозою антибіотика). Але так чи інакше первинний специфічний вплив спричиняє низку неспецифічних (малоспецифічних) реакцій. Неспецифічність таких реакцій зумовлена причинами, наведеними вище: функціонуванням клітини як системи, наявністю єдиного мембранного комплексу, спільних метаболітів, універсальністю структури основних носіїв інформації – ДНК і генів та механізмів, які обслуговують реалізацію цієї інформації.

Однією з серйозних проблем фізіології стійкості є відокремлення фізіологічно важливих неспецифічних реакцій, пов'язаних з передачею стресового сигналу і забезпеченням формування адаптивної відповіді, від неспецифічних проявів деструктивних процесів. На жаль, успіхи у цьому поки що досить скромні. Навіть добре відомим неспецифічним стресовим реакціям непросто дати фізіологічну інтерпретацію.

Нижче наводиться перелік таких стресових реакцій, які виникають у рослин на дію різних стресорів абіотичної і біотичної природи.

1. Збільшення вмісту в клітинах активних форм кисню, у т.ч. радикальних форм, посилення пероксидного окиснення ліпідів.
2. Підвищення вмісту іонів кальцію в цитозолі з наступною активацією кальцієвих АТФаз.
3. Підкислення цитозолу з подальшою активацією протонних pomp, що повертає рН до вихідного значення.
4. Вихід з клітин іонів калію.

5. Падіння мембранного потенціалу (на плазмалемі).
6. Посилення катаболізму біополімерів і ліпідів.
7. Нагромадження поліфункціональних низькомолекулярних сполук (пролін, поліаміни, розчинні вуглеводи).
8. Зниження загальної інтенсивності синтезу біополімерів.
9. Посилення синтезу стресових білків.
10. Посилення синтезу і підвищення вмісту стресових фітогормонів та гормоноподібних сполук – абсцизової, жасмонової, саліцилової кислот, етилену.
11. Гальмування фотосинтезу.
12. Посилення інтенсивності дихання з наступним пригніченням. Активація альтернативної оксидази, що змінює спрямованість електронного транспорту в мітохондріях.
13. Гальмування росту.

Більшість реакцій, наведених у цьому переліку, розглядаються як фізіологічно доцільні. Чимало з них можуть бути проявом активації сигнальних систем або ж являти собою первинну ланку захисних реакцій, що забезпечують виживання клітини до моменту, коли спрацюють довготривалі адаптивні механізми, пов'язані з перепрограмуванням геному. Нижче наводиться більш детальна характеристика окремих груп таких реакцій.

Неспецифічні стресові реакції, пов'язані з активацією сигнальних систем

Посилення утворення активних форм кисню і процесу пероксидного окиснення ліпідів. Активні форми кисню посідають особливе місце серед стресових метаболітів. Термін «активні форми кисню» (АФК) означає сукупність реакційно здатних форм кисню, що взаємно перетворюються, більшість з яких має короткий час існування. Серед АФК виділяють вільнорадикальні частинки – супероксидний аніон-радикал ($O_2^{\cdot-}$), гідроксильний радикал (OH^{\cdot}), пероксидні радикали (RO_2^{\cdot} та ін.) і нейтральні молекули, такі як пероксид водню (H_2O_2), синглетний кисень (1O_2), озон (O_3) та ін.

Посилення нагромадження АФК є однією з найменш специфічних реакцій живих організмів на дію біотичних і абіотичних стресорів. Явище зрушення тканинного балансу антиоксидантів і прооксидантів у бік останніх називають «окиснювальним стресом». Найрізноманітніші несприятливі впливи, у т.ч. протилежні за характером дії, спричиняють різне за тривалістю збільшення вмісту

АФК в багатьох компартментах рослинних клітин. Це – посуха і засолення, низькі і високі температури, дія важких металів, гербіцидів, УФ радіації, забруднення повітря, гіпоксії. Значне посилення генерації АФК викликають біотичні стресори – ураження рослин бактеріями, грибами, мікоплазмами.

Одним із продуцентів АФК (супероксидного радикала) є НАДФН-оксидаза, локалізована в плазмалемі. Цей фермент виділений з різних видів рослин. НАДФН-оксидаза – стартовий фермент супероксидсинтазної (НАДФН-оксидазної) сигнальної системи рослинних клітин. Добре вивчена його активація за дії на рослини патогенів та їх еліситорів. Водночас є відомості про активацію цього ферменту під впливом абіотичних стресорів – низьких і високих температур, посухи. В утворенні супероксидного радикала також можуть брати участь позаклітинні форми пероксидаз, котрі деякими авторами розглядаються як додаткові компоненти супероксидсинтазної сигнальної системи. Супероксидний радикал спонтанно або за участю супероксидисмутази перетворюється на стабільну активну форму кисню – пероксид водню:



Саме пероксид водню виконує функції посередника, що бере участь в передачі стресового сигналу в геном (див. лекцію 4).

Безумовно, збільшення вмісту АФК в рослинних тканинах за дії стресорів може бути пов'язане не лише з підвищенням активності НАДФН-оксидази. Джерелами АФК є електрон-транспортні ланцюги хлоропластів і мітохондрій. Вважають, що однією з причин посилення утворення АФК в мітохондріях за стресових станів може бути надвідновленість їх електрон-транспортних ланцюгів, пов'язана з пригніченням енергозатратних процесів. Подібні ефекти можуть виявлятися і в хлоропластах внаслідок зменшення фіксації CO_2 і зниження споживання НАДФН за стресів. За сильного стресового впливу АФК можуть накопичуватися і внаслідок інактивації антиоксидантних ферментів (каталази, аскорбатпероксидази тощо). Чи виконують накопичувані такими шляхами АФК сигнальні функції, поки що неясно. Водночас відомо, що неконтрольоване збільшення вмісту АФК в клітинах призводить до незворотних змін. Зокрема, АФК спричиняють окиснювальне пошкодження білків, що виявляється в окисненні $-\text{SH}$ груп, FeS центрів ферментів,

фрагментації пептидних ланцюгів, підвищенні чутливості білків до дії протеаз. АФК також здатні прямо взаємодіяти з ДНК, спричиняючи пошкодження азотистих основ, дезоксирибози і появу нових ковалентних зв'язків (зшивок) (Пескин, 1997; Лукаткин, 2002).

Уразливими до дії АФК є ліпіди. АФК здатні ініціювати реакції їх окиснення (пероксидне окиснення ліпідів – ПОЛ), яке має вільнорадикальний характер. Головні ефекти ПОЛ включають в себе окиснення ненасичених жирних кислот мембран і взаємодію з білковими молекулами мембран. Посилення ПОЛ є однією з неспецифічних стресових реакцій. Донедавна таку реакцію вважали відображенням пошкоджень клітин, проявом метаболічного дисбалансу. Водночас останніми роками з'явилися відомості, що кероване переокиснення ліпідів може бути механізмом регуляції їх структури і функцій біомембран, що підтримує необхідний стан іонних каналів, ферментів, рецепторів (Барабой, Сутковой, 1997).

Пероксили ліпідів можуть виступати у ролі алостеричних ефекторів, активуючи або інгібуючи деякі ферменти. Сама по собі зміна структури мембран внаслідок ПОЛ може використовуватися клітиною як механізм регуляції мембранозв'язаних ферментів. На прикладі тваринних клітин показано, що поява підвищеної кількості активних продуктів ПОЛ може бути сигналом для активації фосфоліпази, насамперед фосфоліпази A_2 . Вважають, що цей фермент здійснює вищеплювання з мембран передусім жирних кислот, які зазнали окиснення і містять пероксидні та епоксидні угруповання. Деякими авторами цей процес розглядається як один з механізмів оновлення складу мембран.

Процес ПОЛ тісно пов'язаний з функціонуванням ліпоксигеназної сигнальної системи (див. лекцію 4), стартовим ферментом якої є фосфоліпаза A_2 . Відокремлені нею від мембранних фосфоліпідів залишки ненасичених жирних кислот надалі активно окиснюються ліпоксигеназами. Оксигеновані похідні виконують різноманітні регуляторні функції. В ході деградації ліпідів можуть утворюватися фітогормони жасмонат і метилжасмонат (Тарчевский, 2002). При розпаді олігопреноїдів (ліпідні компоненти мембран хлоропластів, серед них і віолаксантин) утворюється «стресова» АБК. За деградації ліпідів також з'являється велика група так званих C_6 і C_{12} -сполук-оксиліпінів, котрі виконують захисні, у т.ч. антимікробні, функції за дії біотичних стресорів. Чимало продуктів ліпоксигеназної

деградації здатні індукувати зміни спектра синтезованих рослинами білків.

Таким чином, процеси ПОЛ, особливо пов'язані з функціонуванням ліпоксигеназної сигнальної системи, можуть бути фізіологічно доцільними. Водночас спонтанна пероксидація ліпідів є ознакою суттєвих порушень, спричинюваних дією на клітину пошкоджуючих чинників.

Вихід іонів кальцію в цитозоль. На початку 80-х років минулого століття Х. Расмуссеном була сформульована концепція, згідно з якою кальцій виконує функцію вторинного месенджера при проведенні сигналів, що надходять із зовнішнього і внутрішнього середовища організму. Нині визнається роль кальцію як універсального месенджера клітинних реакцій рослинних і тваринних організмів. Саме цитозольний кальцій може слугувати зв'язуючою ланкою для багатьох сигнальних шляхів, сприяючи формуванню сигнальної мережі рослинної клітини.

Підвищення концентрації іонів кальцію в цитозолі є однією з найбільш ранніх реакцій на стресові впливи. Надходження іонів Ca^{2+} в цитозоль відбувається завдяки відкриванню кальцієвих каналів різних типів. Такі канали у рослинній клітині виявлені в плазмалемі, тонопласті, мембранах ендоплазматичного ретикулуму, хлоропластів, ядерній мембрані. Відкриття кальцієвих каналів значною мірою пов'язане з активацією фосфоліпази С (стартового ферменту кальцієвої сигнальної системи, див. лекцію 4) і нагромадженням в результаті цього продуктів гідролізу одного з мембранних фосфоліпідів – фосфатидилінозитолдифосфату. При його гідролізі фосфоліпазою С утворюються діацилгліцерол та інозитол-1,4,5-трифосфат. Обидві ці сполуки виконують роль вторинних месенджерів. Діацилгліцерол активує мембранні кальційзалежні протеїнкінази С, які контролюють стан однієї з груп кальцієвих каналів, а інозитолтрифосфат бере безпосередню участь у відкриванні кальцієвих каналів плазмалеми, тонопласту та ендоплазматичного ретикулуму (Жерелова, Чайлахян, 1994, Тарчевский, 2002). Як правило, підвищення концентрації кальцію в цитозолі, спричинюване різними впливами, у тому числі стресовими, має короточасний характер і змінюється зниженням цитозольного вмісту кальцію. Однак такого кальцієвого «спалаху» буває достатньо для запуску глибоких метаболічних змін в клітині. Декодування кальцієвого сигналу відбувається з участю великої кількості кальційзв'язуючих

білків. Серед них особливу роль відіграють кальмодулін і протеїнкінази. Розрізняють кілька типів протеїнкіназ, що регулюються безпосередньо іонами кальцію або кальмодуліном. Останній набуває властивості регуляторного білка після зв'язування з чотирма іонами Ca^{2+} (Медведев, 2005). Кальмодулін не виявляє власної ензиматичної активності, однак бере участь в регуляції багатьох ферментів, у т.ч. протеїнкіназ. Протеїнкінази, як кальмодулінзалежні, так і кальмодуліннезалежні, але залежні від іонів кальцію, здійснюють фосфорилування білків – факторів регуляції транскрипції. Переважно за допомогою протеїнкіназ і передається сигнал на геном, що призводить до активації експресії генів, які кодують білки, важливі для захисної відповіді клітини на дію стресорів.

Необхідно відзначити, що між зміною кальцієвого балансу клітин і генерацією ними АФК можуть бути прямі і зворотні зв'язки (Колупаєв, 2007). АФК можуть впливати на певні типи кальцієвих каналів (наприклад, потенціалзалежні, що регулюються гіперполяризацією), спричиняючи їх відкриття. Стан механочутливих кальцієвих каналів також може залежати від вмісту АФК, оскільки останні мають здатність взаємодіяти з деякими функціональними групами актину або інших білків цитоскелету, асоційованих з плазматичною мембраною (Mori, Shroeder, 2004). У свою чергу, підвищення вмісту кальцію в клітинах може призводити до активації НАДФН-оксидази та інших ферментів, що беруть участь в генерації АФК. Таким чином, може відбуватися взаємне підсилення сигналів АФК і кальцію.

Функціонування сигнальних систем тісно пов'язане з роботою гормональної системи рослин. Встановлено, що у багатьох випадках посилення синтезу стресових фітогормонів (наприклад, АБК) є наслідком індукованої стресором активації сигнальних систем. Водночас передача гормонального сигналу в геном здійснюється за допомогою сигнальних посередників. Тому, як правило, як рання реакція на дію стресорів різної природи виявляється майже одночасне збільшення вмісту в клітинах сигнальних посередників (АФК, інозитолтрифосфат, кальцій) і стресових фітогормонів та гормоноподібних сполук (АБК, саліцилова і жасмонова кислоти, етилен).

Реакції, пов'язані з виходом іонів з клітин. Підвищення проникності мембран належить до добре відомих ознак стресових

реакцій. У багатьох випадках воно може бути оборотним, у зв'язку з чим розглядається не лише як ознака пошкоджень. Відомий феномен оборотного виходу іонів калію з клітин за дії стресорів. Він може здійснюватися через калієві канали вибірково і з високою швидкістю. Є. Мелеховим і В. Аневим (Мелехов, Анев, 1991) на прикладі рослинних об'єктів отримані експериментальні докази позитивного (адаптивного) значення виходу калію з клітин за сильної дії стресових чинників. Відомо, що активність кількох десятків ферментів залежить від наявності іонів калію. При його виході з цитозолу їх активність знижується, що призводить до зниження загальної інтенсивності метаболізму. Інтенсивність розвитку пошкоджень клітин за жорсткої дії стресорів залежить від інтенсивності метаболічних потоків. Отже, їх уповільнення може мати адаптивне значення на стадії стресової реакції, коли ще не почалася реалізація більш-менш специфічних генозалежних адаптивних реакцій.

Однією з ранніх неспецифічних змін в клітинах на дію стресорів є підвищення кислотності цитоплазми (зниження рН або ацидоз клітин). Відомо, що значне збільшення внутрішньоклітинної концентрації протонів спричиняє зміни конформації внутрішньоклітинних білків і сприяє вивільненню калію, який може бути асоційований з білками (Браун, Моженко, 1987). Таким чином, ацидоз може сприяти вивільненню калію і наступному його виходу з клітин. Підкислення цитоплазми може спричиняти активацію ряду гідролітичних ферментів, підвищена активність яких теж є ознакою стресової реакції. Проте питання про фізіологічне значення підкислення цитозолу залишається дискусійним. При фізіологічних впливах, сумісних з життям, як правило, після зниження рН відбувається активація протонних помп, що виводять іони водню з клітин, внаслідок чого рН в клітинах нормалізується.

Посилення деградації біополімерів і нагромадження низькомолекулярних сполук. В останні десятиліття накопичено експериментальні дані, які свідчать, що за стресових умов низькомолекулярні сполуки типу вільних амінокислот, поліамінів, розчинних вуглеводів виконують не лише звичні функції учасників пластичного та енергетичного обміну, беруть участь у підтриманні осмотичного потенціалу клітини, а й виступають у ролі поліфункціональних протекторних і навіть регуляторних речовин.

Розчинні вуглеводи. Давно з'ясовано, що за дії гіпотермії та деяких інших чинників у багатьох рослинах нагромаджуються розчинні вуглеводи. Цукри, що нагромаджуються за стресових умов, передусім сахароза, фруктоза, а у деяких рослин і трегалоза, захищають білки від денатурації і підтримують цілісність мембранних структур. Показано, зокрема, що сахароза може замінювати воду в структурі фосфоліпідів за дії на рослини стресорів, що спричиняють зневоднення клітин. Експериментально доведена можливість утворення водневих зв'язків між кисневими атомами фосфатів у складі фосфоліпідів і атомами водню гідроксилів цукрів (Stras, Hauser, 1986). Цукри здатні зв'язувати вільні радикали, а, отже, можуть виявляти антиоксидантні властивості (Колупаєв, Трунова, 1992). Мембранопротекторні функції розчинних вуглеводів, зокрема, трегалози встановлені не лише у рослин, а й у прокаріотичних організмів (Баснак'ян, 2003).

Останніми роками з'явилися відомості про сигнальні функції розчинних вуглеводів. На прикладі рослин *Arabidopsis thaliana* доведена участь цукрів в регуляції експресії гена гексокінази (Pego et al., 2000). Крім того, показано, що екзогенна глюкоза може активувати гени біосинтезу АБК і спричиняти її нагромадження в рослинах (Rolland, Sheen, 2005).

Особливі сигнальні функції виконують олігосахарини, що утворюються при деградації полімерних вуглеводів клітинних стінок. Вони розглядаються як вторинні еліситори, що індукують захисні реакції рослин за дії біотичних стресорів (див. лекцію 12).

Низькомолекулярні сполуки азоту. Найбільш ґрунтовно зміни пулу проліну та інших вільних амінокислот вивчені за умов осмотичного, сольового стресів, а також кріостресу (заморожування). Вміст проліну в рослинах за дії таких стресорів може зростати у багато разів.

Іншою групою низькомолекулярних сполук азоту, що накопичуються рослинними клітинами за несприятливих умов, є поліаміни. Збільшення їх вмісту зареєстровано за умов сольового, водного та холодового стресів, а також дії інших чинників.

Збільшення пулу низькомолекулярних сполук азоту може відбуватися різними шляхами. Так, підвищення загального вмісту амінокислот і низькомолекулярних пептидів за дії стресорів може бути пов'язане з протеолізмом. Таким чином підвищення активності протеаз, яке відбувається за дії на рослини різних стресорів, можна

розглядати як одну із захисних реакцій, спрямованих на нагромадження низькомолекулярних протекторів. Механізми регуляції протеаз різноманітні, серед них особливе місце посідає регуляція за допомогою специфічних білкових інгібіторів. Модуляція іонної сили розчинів, що відбувається під час осмотичного та сольового стресів, може перешкоджати взаємодії інгібітору та протеази і спричинити протеоліз (Balesteri, Felicon, 1990). Проте значне збільшення вмісту окремих амінокислот (насамперед, проліну) очевидно відбувається за рахунок посилення його синтезу (Кузнецов, Шевякова, 1999), тобто є ефектом, що не належить до ранніх стресових реакцій. Такий ефект може відображати відносно специфічні функції проліну, пов'язані з його осмопротекторною дією. Водночас навіть у незначних концентраціях пролін виявляє антиоксидантні властивості. Антиоксидантні функції можуть виконувати і деякі інші амінокислоти, зокрема, аргінін, гістидин, цистеїн, триптофан, лізин, метіонін, треонін (Larson, 1988).

Антиоксидантні властивості виявляють і поліаміни. Причому ці ефекти можуть бути пов'язані з їх здатністю індукувати синтез антиоксидантних ферментів в рослинах (Аронова и др., 2005). Також показана здатність екзогенних поліамінів (спермін, спермідин) підвищувати стабільність біомембран.

Напевно велике значення за стресових умов має вплив амінокислот на роботу білоксинтезуючого апарату (Пахомова, Чернов, 1996). Так, показано, що аланін і орнітин посилюють агрегацію полірибосом. Дія аланіну супроводжується зменшенням часу елонгації синтезованих поліпептидних ланцюгів. Пролін за умов стресу стимулює включення мічених попередників в клітинні білки, стабілізує полірибосоми.

Отже, стресори спричиняють нагромадження широкого спектра поліфункціональних низькомолекулярних сполук. Фізіологічна доцільність цього феномена певною мірою може бути пояснена з позицій синергізму. За визначенням П. Корнінга (Corning, 1998), синергізм – фундаментально важливий аспект природи, що стосується структурних та функціональних ефектів, котрі є результатом різних комбінацій, коли ефект цілого відрізняється від того, що частини можуть дати окремо. Так, замість нагромадження однієї захисної речовини у порівняно високих концентраціях рослини можуть накопичувати різні комбінації хімічних сполук з більшою ефективністю за значно нижчих концентрацій. Результатом

синергічної дії речовин може бути зміна активності макромолекул, у т.ч. рецепторів, ферментів тощо. При цьому речовини-синергісти (або антагоністи) можуть впливати на одні й ті самі, або на різні мішені, що у підсумку може змінити інтенсивність певних фізіологічних процесів.

Пригнічення загальної інтенсивності біосинтезу білків і посилення утворення стресових білків. Зменшення загального синтезу білка на стадії стресової реакції може мати адаптивне значення, пов'язане з економією енергетичних ресурсів клітини. Посилення синтезу стресових білків не є суто неспецифічною стресовою реакцією, оскільки їх спектр може різнитися залежно від природи стресового чинника. Водночас серед них є білки з функціями, «корисними» за дії різних стресорів. До таких функцій стресових білків належить захист за їх допомогою інших білків від денатурації відновлення частково денатурованих білків, протеолітичний розпад пошкоджених білків, що не підлягають відновленню.

Вперше феномен утворення стресових білків був виявлений на прикладі дії теплового шоку на дрізофілу. Італійський дослідник Ф.Ритоза у 60-ті роки 20 століття встановив, що за дії температури 37 °С утворюються гігантські пухи хромосом дрізофіли. Дещо пізніше було з'ясовано, що це явище пов'язане з синтезом особливої групи білків, які було названо білками теплового шоку (БТШ). Нині синтез БТШ у відповідь на гіпертермію виявлено у широкої групи організмів – від бактерій до людини, включаючи царство рослин. Водночас з'ясувалося, що такі білки синтезуються не лише у відповідь на дію високої температури, а й багатьох інших несприятливих чинників – низької температури, посухи, засолення середовища, важких металів тощо. Через це більш коректно такі білки називати стресовими білками, хоча в літературі нерідко вживають аббревіатуру «БТШ», коли йдеться про вплив не лише високої температури, а й інших стресорів.

Одна з важливих універсальних функцій стресових білків – шаперонна. Назва «шаперони» походить від французького слова «*chaperon*», що дослівно означає – літня дама, яка супроводжує дівчину при її виході у світське життя. Шаперони «асистують» при збиранні і розбиранні білків зі складною четвертинною структурою, транспортують інші білки до лізосом і протеосом. Водночас функції шаперонів пов'язані з попередженням агрегації часткового денатурованих молекул білків, полегшенням протеолітичної

деградації необоротно пошкоджених білкових молекул. Такі функції, зокрема, виконують стресові білки з молекулярною масою 70 kD (умовне позначення – БТШ 70).

БТШ 90, експресія якого посилюється за впливу різних стресорів також задіяний в управлінні процесом деградації білків. Він здатний зв'язуватися з денатурованими білками. Є підстави вважати, що БТШ 90 бере участь в зміні стану факторів регуляції транскрипції інших БТШ. За умов теплового шоку відбувається зв'язування частини молекул БТШ 90 денатурованими молекулами білків, при цьому через дефіцит вільного БТШ 90 відбувається «розблокування» синтезу інших БТШ.

Нині досліджені умови синтезу і функції у рослин стресових білків з молекулярними масами 101, 45, 32 kD, а також так званих малих БТШ з молекулярною масою менше 30 kD.

Немає сумнівів, що стресові білки важливі для захисту рослин від стресорів різної природи. Одні й ті ж стресові білки можуть нагромаджуватися за дії високих і низьких температур, засолення, посухи тощо. Неспецифічність дії стресорів у даному разі може бути зумовлена однаковою їх спрямованістю на пошкодження білків. Інша причина може полягати в єдиних принципах передачі стресових сигналів, наявності одних і тих же сигнальних посередників, що спричинюють зміни експресії геному. Водночас, на думку багатьох дослідників, утворення стресових білків не є суто неспецифічною реакцією (такою як, наприклад, збільшення вмісту АФК, концентрації цитозольного кальцію чи активація катаболічного потоку), а належить до так званих проміжних реакцій, що передують виникненню специфічних (Саляев, Кефели, 1988).

До проміжних реакцій, очевидно, належать і реакції, пов'язані з пригніченням фотосинтезу, дихання і росту. На тлі останніх відбувається розвиток специфічних реакцій, що зумовлюють довготривалу адаптацію до конкретних чинників – низьких і високих температур, посухи, засолення, аноксії тощо. Водночас механізми трансформації неспецифічних реакцій в специфічні досі залишаються мало з'ясованими.

Лекція 3

ПРИНЦИПИ ПЕРЕДАЧІ СТРЕСОВИХ СИГНАЛІВ В ГЕНОМ І ФОРМУВАННЯ ВІДПОВІДІ НА НИХ

Сприйняття клітинами зовнішніх сигналів (в т.ч. стресових) відбувається переважно шляхом впливу цих факторів на певні рецептори плазматичної мембрани, які впізнають сигнали і запускають внутрішньоклітинні шляхи трансдукції інформації до ядра та інших органел, що призводить до виникнення фізіологічної відповіді. Виділяють три основних механізми трансмембранної передачі сигналу (Крутецкая, Лебедев, 2000): лігандрегульований транспорт іонів, лігандрегульовані рецептори-ферменти і лігандрегульована активація ланцюжка рецептор – G-білок. При цьому опосередковано або прямо активуються стартові ферменти сигнальних систем. Продукт реакції стартового ферменту виступає в ролі месенджера, сигнал якого може трансформуватися іншими вторинними месенджерами. У ролі сенсорів сигналу виступають здебільшого протеїнкінази і протеїнфосфатази, які фосфорилують/дефосфорилують білки – фактори регуляції транскрипції, котрі змінюють експресію відповідних генів, в результаті чого формується фізіологічна відповідь.

У рослинних клітинах функціонує щонайменше сім сигнальних систем: аденілатциклазна, MAP-кіназна (MAP – mitogen activated protein, активований мітогеном білок), кальцієва, фосфатидокислотна, ліпоксигеназна, супероксидсинтазна, NO-синтазна. Всі вони тією чи іншою мірою можуть бути задіяні у трансдукції стресових сигналів (Тарчевский, 2002).

Сенсори стресових впливів. Незважаючи на досить швидке накопичення відомостей про загальні принципи трансдукції стресових сигналів в геном, а також про участь різноманітних вторинних месенджерів в активації адаптивних реакцій, конкретні сенсори, що сприймають дію більшості абіотичних стресорів, дотепер не відомі. Як одна з основних структур локалізації сенсорів розглядається плазмалема. Значна роль в сприйнятті стресових

сигналів також відводиться взаємодіям плазматичної мембрани і клітинної стінки (Kasperska, 2004; Niklas, 2008).

Нині як претенденти на роль сенсорів, що сприймають абіотичні стресові впливи, розглядаються різні сенсорні кінази, іонні (перш за все, кальцієві) канали і окиснювальні комплекси, що містять електрон-транспортні компоненти (Kasperska, 2004; Chinnusamy et al., 2007; Chae et al., 2009; Tor et al., 2009).

Рецептороподібні кінази знайдені в клітинах як рослин, так і тварин. Показано, що геном *Arabidopsis thaliana* кодує більше 600 рецептороподібних кіназ (receptor-like kinases – RLKs), що є домінуючим класом рецепторів білкової природи (Chae et al., 2009). Вважають, що ці рецептори задіяні в сприйнятті абіотичних і біотичних стресорів та сигналів фітогормонів (Chae et al., 2009; Lehti-Shiu et al., 2009).

Представники класу рецептороподібних кіназ RLK, які складаються з позаклітинного, трансмембранного і цитозольного доменів, розглядаються як претенденти на сприйняття сигналу водного дефіциту. Позаклітинний домен таких кіназ багатий на лейцин. Вважають, що первинним стимулом, який спричиняють стресори, є зміна стану позаклітинного домена RLK. Оборнена в цитозоль фосфорильована частина рецептороподібних протеїнкіназ може взаємодіяти з іншими білками, зокрема, з MAP-кіназами (Xiong, Zhu, 2001).

Ще один тип кіназ – трансмембранні автофосфорилуючі гістидинкінази – вважається одним із давніх консервативних типів мембранних рецепторів. Вони здатні активуватися під дією елісаторних сигнальних молекул, деяких фітогормонів і, можливо, абіотичних стресорів. При сприйнятті сигналу екстраклітинним сенсорним доменом відбувається зміна конформації рецептора і автофосфорилування гістидинового залишку. Потім залишок фосфорної кислоти передається на аспартатний залишок внутрішньої (цитоплазматичної) ділянки білка, що також спричиняє зміну його конформації і, внаслідок цього, активацію асоційованого з рецептором стартового ферменту сигнальної системи (безпосередньо або через посередників, частіше через G-білки (див. нижче)).

У *Synechocystis* ідентифікована мембранозв'язана гістидинкіназа, яка розглядається як можливий холодний сенсор (Sung et al., 2003). Порушення гена гістидинкінази цілеспрямованим

мутагенезом запобігало активації транскрипції кількох холодоіндукованих генів.

Поряд з розглянутими рецепторними кіназами, значна роль у сприйнятті дії абіотичних стресорів відводиться системам, що забезпечують швидку регуляцію концентрації кальцію в цитозолі і деяких органелах.

Стан кальцієвих каналів може змінюватися залежно від динамічних характеристик біомембран, які можуть практично миттєво перетворюватися за дії деяких стресорів. Так, показано, що низькотемпературне підвищення жорсткості плазматичної мембрани приводило до відкриття чутливих до натягнення кальцієвих каналів і збільшення потоку кальцію в цитозоль (Orvar et al., 2000; Chinnusamy et al., 2007). Припускають, що за дії абіотичних стресорів у ролі сенсорів можуть виступати не тільки механочутливі, а й потенціалзалежні кальцієві канали. Так, відкриття кальцієвих каналів плазмалеми відбувалося після спричинюваних стресорами змін поляризації мембран (Gelli, Blumwald, 1997).

Запропонована недавно К. Нікласом (Niklas, 2008) гіпотетична «загальна модель сигнального сприйняття» базується на визнанні основної ролі кальцієвих каналів у сприйнятті стресових сигналів. Вважається, що *будь-яка* (механічна, електрична або хімічна) зміна в клітинній стінці чи плазматичній мембрані теоретично може вплинути на стан кальцієвих каналів. Вибірковість сприйняття сигналу може бути пояснена наявністю різних типів іонних каналів і різних білків у складі каналу.

Крім реакцій, пов'язаних з відкриттям кальцієвих каналів, важливу роль в сприйнятті дії абіотичних стресорів можуть відігравати зміни в системах, що беруть участь в генерації активних форм кисню (АФК). Окиснювально-відновний гомеостаз визначається балансом між генерацією і нейтралізацією АФК (пероксиду водню і радикальних форм кисню). Відомо, що накопичення H_2O_2 в клітинах може приводити до змін в балансі між сульфгідрильними і дисульфідними групами білків (зокрема, протеїнкіназ і факторів регуляції транскрипції) і, як наслідок, до передачі стресового сигналу в геном. Так, гістидинкінази розглядаються як можливі сенсори пероксиду водню (Szalai et al., 2009). Показана і окислювальна модифікація пероксидом водню й інших типів протеїнкіназ. Крім того, АФК можуть бути задіяні у відкритті кальцієвих каналів і формуванні кальцієвого сигналу.

Відомо, що супероксидний радикал утворюється в електрон-транспортних ланцюгах хлоропластів і мітохондрій і цей процес посилюється при зменшеній витраті відновника – НАДФН, що цілком можливе в несприятливих умовах. Крім того, випадкова взаємодія переносників електронів в хлоропластах і мітохондріях з молекулярним киснем може призвести до одноелектронного відновлення O_2 до $O_2^{\bullet-}$. Вірогідність такої стохастичної взаємодії в стресових умовах зростає, оскільки можливе пошкодження окремих компонентів мембран. Ще однією причиною посилення генерації АФК може бути активація НАДФН-оксидази, локалізованої в плазматичній мембрані та/або зв'язаної з клітинною стінкою пероксидази. Зміни активності даних ферментів також можуть бути наслідком малоспецифічного (стохастичного) порушення слабких зв'язків в плазмалемі або зв'язків між плазматичною мембраною і клітинними стінками. Супероксидні аніон-радикали, що генеруються цими ферментами, спонтанно або під дією супероксиддисмутази легко перетворюються на молекули перексиду водню. Вони є достатньо стабільними і здатні до переміщення в гідрофільному внутріклітинному середовищі. Саме H_2O_2 вважається основною сигнальною формою активного кисню (Neill et al., 2002). Таким чином, ефект незначного пошкодження клітинних структур може виступати в ролі первинного стимулу для активації сигнальних систем, посередниками в яких є АФК.

В цілому існує досить багато систем, котрі можуть розглядатися як кандидати на роль сенсорів, що сприймають сигнал абіотичних стресорів. Однозначних доказів участі тієї або іншої молекули або молекулярного комплексу як сенсора таких стресових впливів поки що не одержано.

Отже, вважається, що явно специфічних сенсорів, які б сприймали сигнал абіотичних стресорів, у рослинних клітин не існує. Водночас у сприйнятті впливу біотичних стресорів (патогенів) основна роль належить специфічним рецепторам білкової природи. Саме ними сприймаються еліситори – речовини які виділяють патогени (первинні еліситори) та сполуки, що утворюються при деградації рослинних клітинних стінок і мембран (вторинні еліситори). Еліситорні сполуки можуть мати вуглеводну (олігосахарини), пептидну або ліпідну (арахідонова і ейкозапентаєнова кислоти та їх оксигеновані похідні) природу (див. лекцію 12). Хімічна індивідуальність еліситорів дещо спростила

пошук їх рецепторів і сприяла успіху у розшифруванні механізму сприйняття сигналу.

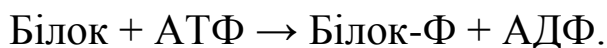
Вважається, що кількість молекулярних антен одного виду рецепторів плазмалемі може досягати кількох тисяч. Вони мають уніфіковану структуру (Тарчевский, 2002). Ці рецепторні антени містять три основні домени: зовнішній варіабельний N-кінцевий домен (акцепторний щодо елісатора), трансмембранний і цитоплазматичний варіабельний C-кінцевий домен, від структури якого залежить передача сигнального імпульсу в ту чи іншу сигнальну систему. Рецептор може бути специфічним тільки для одного виду елісатора або для групи споріднених елісаторів. Структура рецепторних білків рослинних клітин залишається маловивченою, але є докази, що вони мають властивості протеїнкіназ. Акт передачі сигнального імпульсу від зовнішнього чинника (наприклад, елісатора) на внутрішній бік плазматичної мембрани включає в себе автофосфорилування цитоплазматичної ділянки рецептора. Підтвердженням ролі взаємодії елісатор – рецептор в передачі і перетворенні сигналів від патогенів в геном було встановлення позитивної кореляції між здатністю елісаторів нековалентно з'єднуватися з рецепторами і спричиняти захисні реакції клітин, наприклад, нагромадження фітоалексинів (рослинних антибіотиків, див. лекцію 12). Здатність спричиняти такі ефекти встановлена для олігосахаридних та деяких інших елісаторів (Тарчевский, 2002).

G-білки. До *G-білків* належать різноманітні білки, здатні взаємодіяти з гуанозинтрифосфатом (ГТФ). Ці білки локалізовані на внутрішньому боці плазмалемі. Їх молекули складаються з трьох субодиниць: α , β і γ . Коли білок перебуває в неактивному стані, всі субодиниці утворюють комплекс, в якому α -субодиниця зв'язана з гуанозиндифосфатом. Після отримання стимулу і відповідних конформаційних змін рецептор приєднується до *G*-білка. При цьому гуанозиндифосфат відокремлюється від α -субодиниці і його місце посідає гуанозиндифосфат. Надалі α -субодиниця відокремлюється від двох інших субодиниць і зв'язується з одним із стартових ферментів сигнальних систем. Процес інактивації *G*-білка (переривання сигнального ланцюга) зводиться до дефосфорилування гуанозинтрифосфату до гуанозиндифосфату і наступного приєднання α -субодиниці до вільних β - і γ -субодиниць. *G*-білки є посередниками між рецепторами і стартовими ферментами більшості сигнальних

систем рослинних клітин: аденілатцилазної, МАР-кіназної, кальцієвої, фосфатидокислотної, ліпоксигеназної, супероксидсинтазної.

Внутрішньоклітинні месенджери. Внутрішньоклітинні месенджери виступають в ролі посередників, що передають сигнал до протеїнкіназ або протеїнфосфатаз, котрі модифікують стан факторів регуляції транскрипції. Деякі месенджери можуть бути безпосередніми продуктами реакцій, які відбуваються з участю стартових ферментів сигнальних систем. Так, циклічний аденозинмонофосфат (цАМФ) є продуктом реакції, яку каталізує аденілатциклаза (стартовий фермент аденілатциклазної сигнальної системи). Активні форми кисню (супероксид і пероксид водню, який утворюється внаслідок його дисмутації) є продуктами НАДФН-оксидази – стартового ферменту супероксидсинтазної сигнальної системи. Месенджерами кальцієвої сигнальної системи є діацилгліцерол та інозитолтрифосфат, які відкривають кальцієві канали, завдяки чому відбувається надходження в клітину кальцію, який є вторинним месенджером. В цілому ж месенджери конкретних сигнальних систем можуть відрізнятися, хоча деякі з них спільні для різних сигнальних систем, завдяки чому сигнальні системи об'єднуються в мережу.

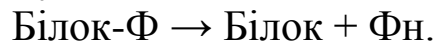
Протеїнкінази і протеїнфосфатази. Ефективним і поширеним способом зміни функціональної активності білків є фосфорилування амінокислот, що входять до їх складу. Оскільки залишок ортофосфорної кислоти зазвичай (за умов внутрішньоклітинного діапазону рН) несе негативний заряд, то його поява призводить до зміни конформації білка. Реакції фосфорилування білків каталізуються протеїнкіназами, які є обов'язковими компонентами сигнальних систем. Для еукаріотичних організмів описано понад 1000 представників цих ферментів. Протеїнкінази каталізують перенесення кінцевого ортофосфату від АТФ на деякі амінокислотні залишки білків:



Каталітичні домени протеїнкіназ різних родин мають досить консервативну структуру, а домени, що розпізнають субстрати – варіабельні, що дозволяє впізнавати субстратні ділянки білків-мішеней. Крім того, в молекулах протеїнкіназ є регуляторні домени. Особливості їх структури дозволяють протеїнкіназам взаємодіяти з певними молекулами ефекторів, у ролі яких можуть виступати різні

вторинні посередники сигнальних систем клітин. Це призводить до активації або інактивації протеїнкіназ і зміни інтенсивності перетворення й передачі сигнального імпульсу по сигнальній мережі. Активація різних форм протеїнкіназ може здійснюватися іонами кальцію, кальмодуліном, діацилгліцеролом, цАМФ тощо.

Ключову роль у функціонуванні сигнальних систем відіграють не лише реакції фосфорилювання білків, а й зворотні реакції їх дефосфорилювання, що каталізуються протеїнфосфатазами. Такі реакції повертають білки у вихідний стан:



Субстратами протеїнфосфатаз можуть бути не лише регуляторні білки, а й протеїнкінази. Окремі групи протеїнфосфатаз мають компліментарність до певних протеїнкіназ – учасників сигнальних систем. При цьому збільшення кількості певної протеїнкінази – посередника сигнального ланцюга – активує фосфатазу і призводить до дефосфорилювання й інактивації протеїнкінази. Це дозволяє ефективно блокувати передачу в геном сигнального імпульсу.

Фактори регуляції транскрипції – це білки, що відповідають за організацію роботи ДНК-залежних РНК-полімераз. Ці полімерази каталізують синтез матричних РНК. Фактори регуляції транскрипції впізнають регуляторні послідовності нуклеотидів в промоторних ділянках генів і спрямовують РНК-полімеразу на точку ініціації транскрипції відповідного гена (або сукупності генів). Таким чином, фактори регуляції транскрипції регулюють інтенсивність експресії генів, хоча при цьому вони не беруть участі в акті синтезу мРНК.

Типові фактори регуляції транскрипції містять ДНК-зв'язуючий, олігомеризаційний і регуляторний домени. Мономерні форми транскрипційних факторів неактивні, на відміну від олігомерних. Утворенню олігомерних форм передують фосфорилювання мономерних форм в цитозолі. Після цього відбувається їх асоціація і доставка в ядро, де вони взаємодіють з промоторними ділянками відповідних генів. Механізм взаємодії факторів регуляції транскрипції з ДНК-залежними РНК-полімеразами і промоторними ділянками генів залишається однією з ключових і недостатньо вивчених проблем функціонування геному клітин, особливо рослинних (Тарчевский, 2002).

Лекція 4

ОСНОВНІ СИГНАЛЬНІ СИСТЕМИ РОСЛИННИХ КЛІТИН

Аденілатциклазна сигнальна система

Ключовим ферментом цієї системи є аденілатциклаза. Зовнішній сигнал (наприклад, гормон або еліситор, взаємодіє з білком-рецептором плазмалемі, що призводить до активації G-білка (зв'язування ним ГТФ) і передачі сигнального імпульсу на аденілатциклазу, яка каталізує синтез цАМФ з АТФ.

Підвищення концентрації цАМФ активує різні цАМФ-залежні протеїнкінази, які можуть фосфорилувати різні білки, у тому числі фактори регуляції транскрипції, що призводить до активації експресії різних генів і відповіді клітини на зовнішні впливи. Інший сигнальний шлях, пов'язаний з дією цАМФ, полягає в активації кальцієвих каналів і відповідної сигнальної системи.

Вміст цАМФ в клітинах визначається співвідношенням активності аденілатциклази і фосфодіестерази. За дії останньої фосфодієфірний зв'язок цАМФ зазнає гідролізу, що призводить до утворення неактивного нециклічного АМФ. Таким чином відбувається послаблення дії аденілатциклазної сигнальної системи.

Є відомості про активацію аденілатциклазної сигнальної системи рослинних клітин за дії патогенів та абіотичних стресорів. Так, вміст цАМФ у рослинних клітинах підвищувався за дії температурного та гравітаційного стресів (Яворская, Драговоз, 1999, Драговоз и др., 2005).

Кальцієва сигнальна система

Вважається, що основним механізмом активації кальцієвої сигнальної системи є підвищення активності її стартового ферменту фосфоліпази С, яка, гідролізуючи фосфатидилінозитолдифосфат, утворює два внутрішньоклітинних месенджери – діацилгліцерол та інозитол-1,4,5-трифосфат. Ці сполуки змінюють кальцієвий баланс клітин, впливаючи на стан кальцієвих каналів. Активації фосфоліпази С патогенними еліситорами передують їх взаємодія з рецепторами плазмалемі, після чого еліситорний імпульс трансмембранно

передається на G-білки, а від них на фосфоліпазу C (Тарчевский, 2002). Припускають, що за схожим механізмом фосфоліпаза C може активуватися і під впливом абіотичних стресорів (Kaur, Gupta, 2005). Показано значне зменшення вмісту фосфатидилінозитолдифосфату і збільшення концентрації інозитолтрифосфату при гіпотермії.

Дія двох месенджерів кальцієвої сигнальної системи – діацилгліцеролу та інозитол-1,4,5-трифосфату – спричиняє відкриття кальцієвих каналів різних типів. Діацилгліцерол активує мембранну кальційзалежну протеїнкіназу C, що контролює стан потенціалзалежних кальцієвих каналів, а інозитол-1,4,5-трифосфат, як гідрофільна речовина, дифундує в цитозоль і бере безпосередню участь у відкритті кальцієвих каналів плазмалемі, тонопласту та ендоплазматичного ретикулуму.

Водночас шлях збільшення концентрації цитозольного кальцію, пов'язаний з активацією фосфоліпази C і нагромадженням діацилгліцеролу та інозитол-1,4,5-трифосфату, не єдиний. Можлива також пряма регуляція стану кальцієвих каналів механічним подразненням, зміною текучості мембран та іншими шляхами (White, 2002; Гималов и др., 2004). Такі механізми можуть бути важливими при реакції рослин на температурні, осмотичні та інші абіотичні впливи.

Концентрація цитозольного кальцію завдяки відкриванню кальцієвих каналів може підвищуватися на порядок. При цьому кальцій виконує функцію сигнального посередника. Важливою особливістю іона кальцію є його низька швидкість дифузії в клітинах. Вона є однією з причин специфічності Ca^{2+} -сигналу, оскільки дозволяє локально підвищити рівень іонізованого кальцію в певних ділянках цитоплазми протягом часу, достатнього для подальшої передачі сигналу за допомогою білків-сенсорів (Медведев, 2005). Локальні кальцієві сигнали не лише безпосередньо впливають на клітинні процеси поблизу активованих каналів, а й здатні діяти на різні типи кальцієвих каналів, ініціювати масштабне зростання рівня кальцію у формі кальцієвих хвиль і кальцієвих осциляцій, що спричиняє в клітинах суттєві перетворення.

Значну роль у виникненні кальцієвих хвиль відіграють активні форми кисню. Окремі типи кальцієвих каналів можуть опосередковано регулюватися активними формами кисню. Водночас під контролем кальцію перебуває НАДФН-оксидаза плазмалемі, яка є одним з основних генераторів супероксидного радикала. Вона має

дві кальційзв'язуючі ділянки. Через активацію цього ферменту кальцієм може посилюватися генерація активних форм кисню, що, у свою чергу, може призводити до відкриття більшої кількості кальцієвих каналів. Таким чином, активні форми кисню і кальцій можуть діяти як взаємопов'язані месенджери.

Передача опосередкованого кальцієм сигналу в геном здійснюється передусім за допомогою різних протеїніназ, які є одними з головних кальційзв'язуючих білків. Так, із виявлених в рослинах арабідопсису 150 кальційзв'язуючих білків 34 є протеїніназами (Cheng et al., 2002). Різні ізоформи кальційзалежних протеїніназ мають різну субстратну специфічність і різний поріг активації іонами кальцію. Ці особливості протеїніназ, поряд з відмінностями в їх клітинній локалізації, очевидно, забезпечують можливість специфічного перетворення кальцієвого сигналу. Частина протеїніназ активуються безпосередньо кальцієм, частина – за допомогою кальмодуліну, який є одним з рецепторів кальцію. Кальмодулін бере участь в регуляції не лише окремих протеїніназ, а й ряду інших білків, причетних до стресових реакцій рослин.

До важливих, але менш досліджених Ca^{2+} -зв'язуючих білків належить кальційнейрин. Він є Ca^{2+} і кальмодулінзалежною протеїнфосфатазою. Цей фермент також може бути причетний до передачі опосередкованих кальцієм стресових сигналів в рослинних клітинах (Pardo et al., 1998).

Спричинювані протеїніназами і протеїнфосфатазами зміни стану білків факторів регуляції транскрипції призводить до зміни спектра синтезованих клітиною білків і фізіологічної відповіді. Серед кальційзалежних стресових реакцій рослин такі важливі, як синтез стресових білків, нагромадження проліну та інших протекторних сполук, синтез калози і фітоалексинів у відповідь на патогенні еліситори.

Обов'язковою умовою функціонування кальцієвої сигнальної системи є наступне після «кальцієвого сплеску» зниження концентрації Ca^{2+} в цитозолі. Довготривале сигнал індуковане підвищення концентрації іонів кальцію може призвести до загибелі клітин. Доведено, що кальцій є необхідним учасником програмованої загибелі клітин (апоптозу). Основну роль у зниженні концентрації кальцію в цитозолі відіграють закриття кальцієвих каналів в результаті гідролізу інозитол-1,4,5-трифосфату специфічними фосфатазами і активація Ca^{2+} -АТФаз, що викачують іони кальцію з

клітини або закачують його в вакуолю та ендоплазматичний ретикулум. Ще один механізм зниження концентрації кальцію в цитозолі – його виведення за допомогою $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -антипортерів, які локалізовані переважно в тонопласті.

Фосфатидокислотна сигнальна система

Стартовим ферментом фосфатидокислої сигнальної системи є фосфоліпаза D. Субстратом для нього є фосфатидилхолін, фосфатидилетаноламін та фосфатидилгліцерол. Виявлено, що патогени і механічне пошкодження спричиняють пересування фосфоліпази D з цитозолу та підвищення активності ферменту (Тарчевский, 2002). Відомостей про передачу сигналу, який призводить до активації фосфоліпази D, мало, хоча є непрямі свідчення, що такий сигнал передається з участю G-білка. Внаслідок активації фосфоліпази D і посилення гідролізу перелічених вище фосфоліпідів плазмалеми збільшується вміст вільної фосфатидної кислоти – ліпідного вторинного месенджера. Далі сигнальний імпульс передається на протеїнкінази і фактори регуляції транскрипції, активуючи у кінцевому підсумку експресію захисних генів.

Є відомості про активацію фосфатидною кислотою кальційзалежних і кальційнезалежних протеїнкіназ, MAP-кіназ, НАДФН-оксидази, фосфоліпаз C і A_2 . Таким чином фосфатидна кислота може впливати на функціонування інших сигнальних систем. Крім того, фосфатидна кислота здатна перетворюватися на посередники, характерні для інших сигнальних систем – поліенові жирні кислоти (компоненти ліпоксигеназного шляху) діацилгліцерол (посередник кальцієвої сигнальної системи) (Тарчевский, 2002).

Ліпоксигеназна сигнальна система

Сприйняття певними рецепторами дії еліситорів або абіотичних чинників призводить до активації мембранозв'язаної фосфоліпази A_2 . Цей процес відбувається за посередництва G-білка. Фосфоліпаза A_2 є стартовим ферментом ліпоксигеназної сигнальної системи, вона каталізує вивільнення з фосфоліпідів плазмалеми ненасичених жирних кислот, у тому числі лінолевої і ліноленової. Ці кислоти є субстратом для ліпоксигеназ. Експресія генів ліпоксигеназ значно посилюється за появи в клітинах ненасичених жирних кислот. Ліпоксигенази – ферменти, що каталізують приєднання

молекулярного кисню до одного з атомів вуглецю *цис*, *цис*-пентадієнового радикала жирних кислот, в результаті чого утворюється гідропероксидне похідне. Більшість рослинних ліпоксигеназ відрізняється високою специфічністю, вони окиснюють лінолеат і ліноленат за положенням С-9 і С-13. Гідропероксидні похідні жирних кислот під впливом гідропероксидліаз перетворюються на різноманітні фізіологічно активні сполуки (оксиліпіни). Серед них особливе значення має фітодієнова кислота, яка перетворюється на жасмонову кислоту, що належить до стресових фітогормонів. Жасмонова кислота, а також окси- і епоксиполіненасичені жирні кислоти активують різні групи протеїніназ і посилюють фосфорилування білків, у тому числі факторів регуляції транскрипції.

Однією з особливостей посилення сигналів в ліпоксигеназній системі є використання кількох видів автокаталітичних процесів (Гречкин, Тарчевский, 1999). Це, наприклад, автокаталітичне посилення сигналу з участю іонів кальцію і кальмодуліну. Утворювані в плазмалемі з лінолеату або ліноленату гідропероксиформи цих кислот можуть виступати у ролі іонофорів, що переносять іони кальцію ззовні всередину клітини за градієнтом концентрації. Підвищення концентрації іонів кальцію в цитозолі призводить до активації фосфоліпаз за участю кальмодуліну і, внаслідок цього, до ще більшого вивільнення поліненасичених жирних кислот з фосфоліпідів. Інший механізм посилення ліпоксигеназного метаболізму – це опосередкована жасмонатом або метилжасмонатом індукція експресії генів ліпоксигеназ, що призводить до підвищення швидкості окиснення лінолеату і ліноленату. Можлива також індукція метилжасмонатом експресії генів десатурази, що каталізує перетворення лінолевої кислоти на ліноленову.

Механізм інгібування ліпоксигеназної сигнальної системи (переривання проходження сигналу) досліджений слабо. Є відомості, що окремі продукти ліпоксигеназного каскаду можуть інгібувати активність ліпоксигенази і уповільнювати функціонування сигнальної системи (Гречкин, Тарчевский, 1999).

Ферменти ліпоксигеназного каскаду активуються за дії на рослини різноманітних стресорів, зокрема, у відповідь на атаку патогенів, комах, а також абіотичні чинники – зневоднення, високі температури (Тарчевский, 2002).

МАР-кіназна сигнальна система

Активація мітогенактивованих протеїнкіназ (МАР-кіназного сигнального каскаду), як і інших сигнальних систем, розглянутих вище, починається зі сприйняття сигналу рецептором і передачі його за допомогою G-білка на стартові ферменти – кінази кіназ МАР-кінази (МАРККК). Існує значне різноманіття стартових ферментів у сигнальному ланцюгу. МАРККК поділяються на кілька груп залежно від первинної структури. Відмінності цих кіназ стосуються передусім будови регуляторного домену (Тарчевский, 2002). МАРККК каталізує фосфорилування залишків серину і треоніну у кіназ МАР-кінази (МАРКК), а остання – залишків треоніну і тирозину в МАР-кіназі (МАРК). МАРК переходить в ядро, де фосфорилує білки – фактори регуляції транскрипції.

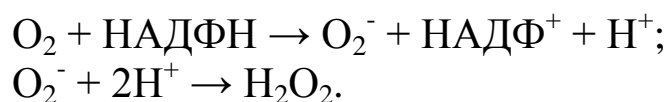
МАР-кіназна сигнальна система зв'язана з іншими сигнальними посредниками рослинних клітин. Так, наприклад, показано, що спричинюване абіотичним стресом (зневодненням) нагромадження активних форм кисню в суспензійній культурі клітин тютюну відбувається за участю МАР-кіназ (Холл и др., 2002). Водночас обробка суспензії клітин арабідопсису пероксидом водню спричиняла підвищення МАР-кіназної активності. Таким чином, між МАР-кіназами і активними формами кисню можуть бути реципрокні відносини.

Інактивація МАР-кіназної сигнальної системи здійснюється, в першу чергу, за рахунок дефосфорилування МАРК за допомогою протеїнфосфатаз.

МАР-кіназний каскад активується в рослинних клітинах при мітозі (цим пояснюється назва відповідних протеїнкіназ), а також при зневодненні, низькій температурі, механічному подразненні і пошкодженні, дії патогенів та їх еліситорів, стресових фітогормонів.

НАДФН-оксидазна (супероксидсинтазна) сигнальна система

Основним стартовим ферментом цієї сигнальної системи є НАДФН-оксидаза, яка зумовлює утворення супероксидного радикала, що може перетворюватися на пероксид водню та інші активні форми кисню:



НАДФН-оксидаза активується еліситорами та іншими чинниками (абіотичними стресорами, стресовими гормонами, гормоноподібними сполуками), як і більшість стартових ферментів сигнальних систем, ймовірно, за допомогою G-білка. Участь останнього продемонстрована в експериментах з активатором G-білків мастопараном. Цей активатор значно посилював утворення активних форм кисню в культурі клітин петрушки, індуковане саліциловою кислотою (Kauss, Jeblick, 1995).

Крім НАДФН-оксидази при активації супероксидсинтазної сигнальної системи можуть активуватися й інші ферменти, локалізовані в клітинних стінках, в плазмалемі та вільному просторі – пероксидази, оксалатоксидази. Генеровані внаслідок активації комплексу ферментів супероксидні радикали перетворюються під дією супероксиддисмутази або спонтанно на більш стабільну форму активну форму кисню – пероксид водню. H_2O_2 є сигнальною молекулою, здатною активувати певні групи протеїнкіназ. Встановлено, зокрема, що пероксид водню може впливати на активність кінази кінази MAP-кінази. Таким чином, можлива взаємодія НАДФН-оксидазної і MAP-кіназної сигнальних систем. Є приклади впливу пероксиду водню (через протеїнкінази або навіть безпосередньо) на фактори регуляції транскрипції генів, що кодують різноманітні білки, необхідні для захисту від патогенів, а також БТШ та інші стресові білки.

Пероксид водню може бути індуктором синтезу саліцилової кислоти (Leon et al., 1995). Остання сама по собі є сигнальною молекулою. Крім того, вона значною мірою впливає на вміст активних форм кисню в клітинах. Одним з механізмів такого впливу є інгібування каталази шляхом зв'язування з активним центром ферменту (Chen et al., 1993). Це призводить до нагромадження пероксиду водню. Водночас встановлено, що це не єдиний шлях впливу саліцилової кислоти на вміст активних форм кисню. Саліцилова кислота здатна активувати форми пероксидази, причетні до генерації супероксидного радикала (Kawano et al., 1998), а також супероксиддисмутази, що призводить до нагромадження стабільної активної форми кисню – пероксиду водню (Колупаєв, 2007). Крім того, вплив саліцилової кислоти на генерацію супероксидного радикала може бути пов'язаний зі збільшенням активності НАДФН-оксидази (Geetha, Shetty, 2002). Дослідженнями останніх років

встановлено, що підвищення активності АФК-генеруючих ферментів і супероксиддисмутази, індуковане саліциловою кислотою, відбувається з участю іонів кальцію та кальмодуліну. Так, посилення генерації активних форм кисню в колеоптилях пшениці, спричинюване екзогенною саліциловою кислотою, пригнічувалося блокаторами кальцієвих каналів і антагоністами кальмодуліну (Колупаєв, Карпец, 2006).

Активні форми кисню, що утворюються за участю ендogenous або екзогенного саліцилату, причетні до різноманітних захисних реакцій, важливих не лише для компетентної відповіді рослин на патогени, а й для формування стійкості до абіотичних стресорів, наприклад, сольового і теплового стресів.

Що ж стосується значення посилення утворення активних форм кисню за дії патогенів, то воно полягає не лише в активації синтезу спеціальних захисних білків, фітоалексинів, а й у безпосередньому знищенні патогенів у місцях проникнення інфекції: так званий «окиснювальний вибух» – складова реакції надчутливості. В ході такої реакції відбувається загибель патогенів разом з частиною рослинних тканин, що некротизуються.

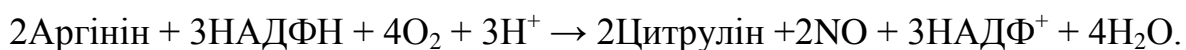
В цілому, характер реакцій, спричинюваних активними формами кисню, очевидно, визначається їх кількістю. Помірне посилення генерації активних форм кисню може призводити до активації класичних захисних механізмів (синтез антиоксидантних ферментів, стресових білків та ін.). При цьому підвищення активності антиоксидантних ферментів, очевидно, може бути способом переривання супероксидсинтазного сигнального ланцюга. Сильніший сигнал (більша кількість активних форм кисню) може індукувати програмовану клітинну загибель. Нарешті, неконтрольоване утворення АФК призводить до глибоких пошкоджень біомакромолекул і мембран та некрозу тканин.

NO-синтазна сигнальна система

Ролі оксиду азоту як сигнальній молекулі в клітинах тварин в останні десятиліття приділяється велика увага. Особлива роль цієї молекули у запальних процесах, імунних реакціях, відповіді на дії стресорів, регулюванні апоптозу. У 1992 році журналом «Science» NO був оголошений «молекулою року», а у 1998 році трьом ученим, які

зробили значний внесок в опис біологічної активності оксиду азоту, присуджена Нобелівська премія в галузі медицини.

У 1996 році у рослин було виявлено наявність ферменту NO-синтази, подібної за будовою до відповідного ферменту ссавців (Guento et al., 1996). NO-синтаза є стартовим ферментом сигнальної системи з відповідною назвою. Цей фермент каталізує утворення NO з аргініну, НАДФН і кисню:



NO-синтаза належить до найбільш складних ферментів, причому активність виявляє гомодимерна форма ензиму, а кожен неактивний мономер складається з редуктазного (НАДФН–ФАД–ФМН) і оксигеназного (Fe-гем) доменів, між якими розташована молекула кальмодуліну.

Наявність NO-синтази у рослин неодноразово ставилася під сумнів і нині немає однозначних доказів її присутності у рослин. Водночас є припущення про існування у рослин різних монопептидів з окиснювально-відновними доменами, здатних об'єднуватися у ферментативний комплекс після сприйняття клітиною відповідного сигналу. Припускають, що кофактором такого комплексу є кальмодулін (Courtois et al., 2008; Neill et al., 2008).

Ще одним ферментативним джерелом оксиду азоту може бути нітратредуктаза. Первинна функція нітратредуктази в рослинах пов'язана з асиміляцією азоту – перетворенням нітрату на нітрит. Однак цей фермент може перетворювати нітрит на оксид азоту в НАДФН-залежній реакції. Подібна реакція була відтворена *in vitro* з використанням вилученого з рослин очищеного ферменту. Є підстави вважати, що NO може утворюватися з нітриту з участю нітратредуктази в мітохондріях і хлоропластах (Wilson et al., 2008). Показано, що синтез нітратредуктази, що продукує NO, може бути спричинений стресорами, зокрема інфікуванням рослин.

Природа рецептора, через який відбувається запуск NO-синтазної системи у рослин, досі залишається нез'ясованою. Так само неясно, чи беруть участь G-білки в передачі сигналу до стартового ферменту – NO-синтази. Висловлюються припущення, що рецептором зовнішніх сигналів може бути сама NO-синтаза (Тарчевский, 2002).

Водночас шлях трансдукції сигналу NO в геном встановлений. Посередниками, як і в NO-синтазній системі тваринних клітин, є циклічна гуанозинмонофосфатрибоза (цГМФ-рибоза) і циклічна АДФ-рибоза.

цГМФ утворюється з ГТФ за допомогою гуанілатциклази, одна з субодиниць якої містить гем. Активація гуанілатциклази відбувається при взаємодії NO з гемом. цГМФ активує цГМФ-залежну протеїнкіназу, а остання фактори регуляції транскрипції. Крім того, можливий інший шлях сигналу, спричинюваного цГМФ (кальційзалежний). При цьому цГМФ активує АДФ-рибозилциклазу, що призводить до накопичення цАДФ-рибози. Під її впливом відбувається відкриття кальцієвих каналів, наступне підвищення концентрації кальцію в цитозолі, активація кальційзалежних протеїнкіназ, зміна стану факторів регуляції транскрипції і активація експресії відповідних генів.

Ще один шлях передачі сигналу NO включає в себе саліцилову кислоту як посередника. Нагромадження саліцилату під впливом NO показано на різних рослинних об'єктах. Його пов'язують зі здатністю цГМФ, концентрація якого збільшується за рахунок підвищення активності гуанілатциклази під дією NO, активувати ключовий фермент синтезу саліцилової кислоти – фенілаланінамонійліази.

Саліцилова кислота розглядається як підсилювач сигналу оксиду азоту. Водночас, зважаючи на здатність саліцилової кислоти спричиняти нагромадження активних форм кисню, можна говорити про синергічну взаємодію компонентів NO-синтазної і НАДФН-оксидазної сигнальних систем.

В ході одночасної активації NO-синтазної і НАДФН-оксидазної сигнальних систем внаслідок взаємодії радикальної форми оксиду азоту і супероксидного радикала можливе утворення пероксинітриту (ONOO^\cdot), який чинить пряму токсичну дію на патогени (Дмитриев, 2004). Крім того, отримані відомості про участь NO в активації апоптозу рослинних клітин.

Ще один шлях дії NO як сигнальної молекули пов'язаний з її здатністю активувати фосфоліпазу D, що зумовлює накопичення фосфатидної кислоти, яка впливає на активність протеїнкіназ прямо або опосередковано, діючи як кальцієвий іонофор і підвищуючи вміст цитозольного кальцію. Можливий також прямий вплив оксиду азоту на стан кальцієвих каналів і на активність деяких протеїнкіназ, в т.ч. MAP-кіназ, шляхом S-нітрозилування.

Серед реакцій, індукованих оксидом азоту і важливих для стійкості рослин до патогенів – синтез фітоалексинів. NO-синтазна сигнальна система бере участь і у відповідях рослин на дію абіотичних стресорів. Повідомляється про антиоксидантні ефекти оксиду азоту, ймовірно за рахунок впливу на синтез антиоксидантних ферментів. За дії донора оксиду азоту зменшується негативний вплив на рослини таких стресорів, як ультрафіолет-Б, засолення, посуха. Показана участь NO в індукуванні синтезу АБК.

Переривання NO-сигнального ланцюга, ймовірно, може відбуватися за рахунок його взаємодії з рослинним гемоглобіном або іншими білками.

Лекція 5

ХОЛОДОСТІЙКІСТЬ РОСЛИН

Температура є одним з найбільш значимих лімітуючих факторів, що визначають поширення і продуктивність рослин. Рослини належать до пойкилотермних організмів, температура тіла яких в результаті енергообміну з навколишнім середовищем дещо відрізняється від температури повітря. У рослин в ході еволюції сформувалися різноманітні механізми адаптації до змін температури існування. Проте екстремальні температури спричиняють явне порушення фізіологічних функцій. Значимість проблеми холодо- і морозостійкості рослин зумовлена тим, що на 64% території суші рослини зазнають згубної дії низьких температур (Климов, 2001). У зв'язку з глобальними змінами клімату на планеті актуальність проблеми зростає, адже зумовлене антропогенними чинниками загальне потепління супроводжується посиленням нестабільності погодно-кліматичних умов, у тому числі різкими перепадами температур за відносно короткі відрізки часу.

За реакцією на температуру рослини поділяють на такі групи (Levitt, 1980):

- теплолюбні – види, чутливі до температур вище 0°C;
- ніжні – види, чутливі до заморозків близько 0°C;
- слабо стійкі – види, здатні розвивати деяку стійкість до заморозків; виживання обмежене температурами близько - 5°C;
- помірно стійкі – виживання обмежене температурами від - 5 до -10°C;
- дуже стійкі – здатні витримувати дію температури до - 20°C і значне зневоднення, пов'язане з утворенням льоду;
- особливо стійкі – здатні підтримувати воду у рідкому переохолодженому стані.

Більше половини існуючих на Землі видів рослин ростуть в тропіках і субтропіках, в ході еволюції вони не змогли набути здатності протистояти низьким позитивним температурам. Більшість

цих видів пошкоджується за температур вищих від точки замерзання тканин, але нижчих від 15°C (низьких позитивних).

Здатність рослин, що перебувають в стані активної вегетації, витримувати дію будь-яких низьких позитивних температур називають *холодостійкістю*. Водночас холодостійкі рослини можуть загинути після утворення льоду в тканинах.

Теплолюбними називають рослини, що виявляють чутливість до охолодження і пошкоджуються при витримуванні за умов знижених температур довше деякого обмеженого часу; після тривалого витримування за таких температур розвиваються зовнішні симптоми пошкодження і відбувається загибель організму (Лукаткин, 2002). Навіть незначне зниження температур, що не призводить до видимих пошкоджень теплолюбних рослин, може спричиняти падіння їх продуктивності до 50% (Коровин, 1984). Проблема стійкості рослин до низьких позитивних температур, що часто діють на рослини у весняний та осінній періоди, актуальна для рослинництва на всій території України, включаючи південь.

Ефекти холодового пошкодження рослин на рівні цілого організму

Холодове пошкодження рослин виявляється на всіх рівнях організації: на рівні цілого організму, міжклітинному і клітинному рівнях (Лукаткин, 2002).

Найбільш помітними зовнішніми симптомами холодового пошкодження у трав'янистих рослин є в'янення листків, гіпокотилів, пагона, якому передують поява інфільтрацій (насичених водою ділянок); зміна забарвлення листків; підсихання країв або кінчиків листових пластинок; розриви охолоджених тканин; прискорене старіння рослин; неповне або нерівномірне визрівання плодів, що супроводжується погіршенням структури і смакових якостей; при тривалому (летальному) охолодженні – некроз листків і відмирання рослин.

Внаслідок дії гіпотермії уповільнюється проростання насіння і знижується його схожість. Насіння теплолюбних рослин не проростає за температур нижчих від 10–15°C. За цим параметром його поділяють на дві групи (Herner, 1986).

Насіння першої групи не ушкоджується під час набубнявіння за знижених температур і з підвищенням температури нормально проростає; однак при ініціації росту кореня відбувається

низькотемпературне пошкодження, симптоми якого – недорозвинутість кінчика кореня, некроз тканини за кінчиком. Представниками цієї групи рослин є чимало теплолюбних пасльонових і гарбузові.

До другої групи належать рослини, насіння яких особливо чутливе до зниженої температури в період набубнявіння: квасоля, боби, соя, нут, кукурудза, бавовник. Охолодження під час проростання призводить до уповільнення росту проростків, його наслідки позначаються на обсязі урожаю і його якості.

Вплив низьких температур упродовж вегетації також позначається на рості теплолюбних рослин, що призводить до значного зниження їх продуктивності. Дія знижених температур в період проростання насіння і початкових фаз вегетації виявляється у подовженні вегетаційного періоду і зниженні основних елементів продуктивності. При цьому уповільнюється диференціація конусу наростання і проходження етапів морфогенезу, знижується інтенсивність цвітіння, наповнення плодів і насіння.

За чутливістю до дії знижених температур теплолюбні рослини розташовані так (у порядку зростання стійкості): огірок – бавовник – квасоля – кукурудза – баклажан – сорго – просо – кунжут – томат – гречка. Однак стійкість може варіювати залежно від віку рослин. Крім того, різні сорти однієї культури можуть істотно відрізнятися за стійкістю до охолодження.

Ефекти дії знижених температур, що виявляються на клітинному рівні

Знижені температури спричиняють численні порушення ультраструктури мембран клітин теплолюбних рослин. Так, зменшується електронна щільність цитоплазми, відбувається конденсація хроматину в ядрі, набубнявіння хлоропластів і їх структурні зміни (дезінтеграція гран, нагромадження ліпідних крапель, зникнення крохмальних зерен). Вважають, що у ряду теплолюбних рослин (бавовник, соя, квасоля) хлоропласт є первинною органелою, що виявляє ультраструктурні пошкодження при охолодженні. Встановлені також зміни ультраструктури мітохондрій за дії гіпотермії.

Причини пошкодження рослин за дії низьких позитивних температур

Чимало ефектів, спричинюваних дією знижених температур на теплолюбні рослини, можна розглядати як ознаки неспецифічної стресової реакції. До таких ефектів, зокрема, належать зменшення цитоплазматичного рН, яке пояснюють пригніченням роботи протонних pomp (Зауралов и др., 1994), активація нагромадження активних форм кисню, наслідком якої є посилення пероксидного окиснення ліпідів і порушення проникності мембран. Мембранні зміни за дії гіпотермії належать до ранньої реакції і розглядаються багатьма авторами як визначальні.

За знижених температур відбувається фазовий перехід мембран клітин теплолюбних рослин (але не холодостійких) із еластичної рідинно-кристалічної в твердо-гелеву структуру. Це призводить до значних змін властивостей мембран і активності мембранозв'язаних ферментів. Вважається, що фазові переходи навіть малих фракцій мембранних ліпідів призводять до порушень клітин. З фазовим переходом пов'язане фазове розділення компонентів мембран, за якого з'являються ділянки гелеподібних ліпідів, частково або повністю вільних від білків. За тривалого охолодження порушення стають необоротними, що виявляється у зовнішніх симптомах. У ряду видів тропічного походження температура латерального фазового переходу мембран вища (близько 15°C), ніж у рослин з помірних зон (6-8°C) (Лукаткин, 2002).

Порушення функціональної активності мембран внаслідок переходу їхніх ненасичених жирних кислот з рідинно-кристалічного в стан гелю більшість дослідників вважають основною причиною пошкоджень теплолюбних рослин дією низьких позитивних температур (Мусієнко, 2006). Наслідком цих пошкоджень може бути порушення роботи мембранних АТФаз, а отже, активного транспорту іонів через мембрани, дезінтеграція електрон-транспортних ланцюгів мітохондрій і хлоропластів, що призводить до порушень енергетичного обміну і фотосинтезу. При порушенні процесу перенесення електронів в електрон-транспортних ланцюгах збільшується ймовірність стохастичного утворення активних форм кисню, що спричиняє вторинний окиснювальний стрес і додаткові пошкодження, пов'язані з пероксидним окисненням ліпідів. (Первинна хвиля посилення утворення активних форм кисню за дії

стресорів розглядається як процес, пов'язаний з передачею внутрішньоклітинних сигналів, див. лекції 3, 4).

З іншого боку, ряд авторів вважає, що фазові зміни ліпідів не спричиняються прямою дією знижених температур, а швидше відображають наступні біохімічні зміни, що сприяють розвитку холодового пошкодження (Sharom et al., 1994). О.С. Лукаткіним (Лукаткин, 2002) запропонована концепція ініціації холодового пошкодження теплолюбних рослин за рахунок окиснювального стресу. Результати досліджень часової динаміки змін генерації активних форм кисню, інтенсивності пероксидного окиснення ліпідів і показників проникності мембран (вихід електролітів) свідчать, що збільшення вмісту активних форм кисню і продуктів пероксидації ліпідів за дії охолодження відбуваються раніше, ніж спостерігається посилення виходу електролітів. На підставі цього автор робить висновок, що окиснювальний стрес є індуктором холодових пошкоджень. При цьому, за даними досліджень, проведених в Мордовському університеті (Росія), у теплолюбних культур активація антиоксидантних ферментів у відповідь на охолодження відбувається із запізненням, через що мають місце холодові пошкодження. На користь такої точки зору свідчать факти підвищення холодостійкості рослин антиоксидантами, а також екзогенними сполуками, що збільшують активність антиоксидантних ферментів.

Водночас не можна недооцінювати значення фазового переходу мембран як одного з важливих чинників пошкоджень. На жаль, у більшості фізіологічних досліджень стан клітинних мембран оцінюється грубими методами за непрямими показниками (вихід електролітів). Такий підхід навряд чи може дозволити виявити тонкі первинні порушення структури мембран. На користь гіпотези про значення саме фазових переходів в ініціації холодових пошкоджень свідчать дані, отримані в експериментах з трансгенними рослинами зі зміненним жирнокислотним складом біомембран. Так, показано, що рослини тютюну з вбудованим геном *desC* $\Delta 9$ -ацил-ліпідної десатурази з ціанобактерії *Synechococcus vulkanus* відрізнялися підвищеною холодостійкістю (Попов и др., 2005). При цьому трансформовані рослини мали індекс ненасиченості ліпідів на 25% вищий порівняно з контрольними рослинами, у складі ліпідів знижувався вміст основних насичених жирних кислот і збільшувалася кількість дієнових і трієнових. Рослини, трансформовані геном десатурази мали більшу інтенсивність росту за низьких температур.

При цьому у трансформованих рослин за дії низьких температур відзначалася підвищена активність антиоксидантних ферментів (Кипайкина, 2007).

Таким чином, холодостійкість рослин значною мірою залежить від жирнокислотного складу ліпідів. При цьому підвищення вмісту ненасичених жирних кислот за рахунок десатуразних реакцій вважається однією з важливих адаптивних реакцій на рослини на дію низьких температур.

Адаптація рослин до дії низьких позитивних температур

Одним із способів підвищення стійкості рослин до стресових температур в природних і експериментальних умовах є загартування. Здатність до загартування притаманна якщо не всім, то більшості видів рослин і розглядається як важлива конститутивна ознака. При цьому стійкість не є сталою ознакою рослини, а змінюється у досить широких межах залежно від об'єкта (генотипу) і умов середовища (Титов и др., 2006).

С.М. Дроздовим і співавторами (Дроздов и др., 1984) залежно від реакції рослин виділено п'ять температурних зон: фоновая, холодового і теплового загартування (адаптації), холодового і теплового ушкодження. На думку авторів, у різних температурних умовах реалізуються різні фізіологічні програми рослини. Зокрема, в умовах фонові зони насамперед реалізується ростова та онтогенетична програми рослини. За дії температур із зон загартування (як холодового, так і теплового) відбувається генетичне перепрограмування, запуск процесів, що зумовлюють зростання стійкості.

Показано, що підвищення холодостійкості теплолюбних культур відбувається за дії на них знижених (неушкоджуючих) температур протягом кількох діб (кукурудза – 10°C; огірок – 9-15°C; томат – 8°C). Втрата холодостійкого стану також залежно від виду рослин відбувається через 2-4 доби після холодового загартування (Титов и др., 2006).

Найскладнішим питанням стійкості рослин до стресових температур є питання сприйняття рослиною температурного сигналу, який спричиняє перебудову метаболізму і формування стійкості. Як відомо, клітини і організми сприймають більшість зовнішніх сигналів за допомогою молекул рецепторів, що являють собою інтегральні білки, розташовані на плазматичних мембранах. Активовані

рецептори розпізнають сигнал і приводять в дію внутрішньоклітинні механізми передачі сигналу в геном, внаслідок чого відбувається його перепрограмування, яке виявляється в метаболічних і структурних змінах.

Як зазначалося, прямим і, ймовірно, найбільш раннім наслідком впливу флуктуацій температури на клітини є зміна текучості мембран, пов'язана з переходом насичених жирних кислот з рідиннокристалічного в стан гелю. Припускають, що плазматична мембрана діє як первинний сенсор температурних флуктуацій внаслідок змін її фізичних характеристик (Гималов и др., 2004). Ймовірно, такі зміни призводять до відкриття активованих розтягуванням механочутливих Ca^{2+} -каналів. Зниження текучості мембрани і дестабілізація компонентів цитоскелету спричиняють активацію кальцієвих каналів і надходження кальцію в цитозоль. Подальші зміни включають в себе вплив кальцію на протеїнкінази і фосфорилування білків, у тому числі факторів регуляції транскрипції.

Дещо інша модель сприйняття холодового сигналу запропонована на підставі вивчення реакції ціанобактерій (*Synechocystis*) на зниження температури (Suzuki et al., 2001). Було встановлено, що холодовій індукції гена десатурази (адаптивній реакції на охолодження) передують активація гістидинкінази, що виявляється в її автофосфорилуванні. Наділі фосфатна група через кілька посередників передається до фактора регуляції транскрипції десатурази. Активація експресії гена десатурази і підвищення активності відповідного ферменту, що перетворює насичені жирні кислоти на ненасичені і зумовлює підвищення холодостійкості ціанобактерії.

Таким чином, нині припускають існування принаймні двох механізмів сприйняття рослиною температурного (низькотемпературного) сигналу, один з яких пов'язаний з активацією кальцієвих каналів, а інший з прямим підвищенням активності протеїнкіназ, здатних до автофосфорилування. Водночас в обох випадках первинним стимулом може бути зміна фізико-хімічних характеристик плазмалемми (Гималов и др., 2004).

Серед адаптивних змін, які спричиняє передача сигналу охолодження в геном, очевидно, велике значення має зміна спектра синтезованих білків. Адже фізіологічна відповідь є наслідком таких змін. Значення синтезу білків у холодівому загартуванні як

теплолюбних, так і холодостійких рослин було доведено ще у 70-80-ті роки минулого століття. Обробка рослин перед загартуванням інгібіторами біосинтезу мРНК або білків призводила майже до повної втрати ними здатності підвищувати стійкість після дії загартовуючих температур (Дроздов и др., 1984). Пізніше були досліджені конкретні зміни білкового спектра у відповідь на дію гіпотермії. Так, охолодження рослин томатів за температури 8°C протягом 2-12 год спричиняло появу шести нових поліпептидів (Титов и др., 2006). Одночасно спостерігалось інгібування синтезу звичайних білків (характерних для рослин, існуючих у фізіологічно нормальних умовах). За даними різних дослідників, серед білків, синтез яких індуються зниженою температурою, убіквітин, що відповідає за ліквідацію денатурованих білків, альтернативна оксидаза (фермент електрон-транспортного ланцюга мітохондрій, що забезпечує шлях електронів в обхід цитохромному і зменшує ймовірність утворення активних форм кисню), шаперони, різноманітні протеїнази.

Як відзначалося вище, важливим для виживання і функціонування клітин за знижених температур є зміни складу біомембран. Здатність теплолюбних рослин адаптуватися до холоду значною мірою визначається наявністю у них механізму швидкого підвищення активності десатураз, що утворюють подвійні зв'язки в жирнокислотних залишках, або ж здатністю синтезувати ненасичені жирні кислоти. Це сприяє підвищенню текучості ліпідного бішару і попереджає фазове розділення ліпідів за дії холоду (Новицкая и др., 1999).

Деякі зміни у ліпідному складі, спричинювані гіпотермією, очевидно, можна розглядати як ознаку стресової активації сигнальних шляхів і катаболічного потоку. Так, наприклад, однією з реакцій на охолодження проростків кукурудзи є активація фосфоліпази D (Pinheiro et al., 1998) – стартового ферменту фосфатидокислої сигнальної системи. Нагромадження фосфатидної кислоти може впливати на кальцієвий статус клітин, а отже призводити до активації кальцієвої сигнальної системи і кальційзалежних процесів в цілому (див. лекції 3, 4).

Більшість метаболічних і структурних адаптивних змін у відповідь на гіпотермію реалізується з участю гормонального комплексу рослин. Так, показано, що формування холодостійкості теплолюбних рослин під впливом низьких загартовуючих температур супроводжується досить швидким нагромадженням стресового

гормону АБК в листках. Разом з тим підвищується вміст етилену. Швидкому утворенню «стресового» етилену відводять важливу роль у запуску механізмів підвищення стійкості до низьких температур (Michaeli et al., 1999).

Вміст ауксинів при холодовій адаптації рослин, за даними більшості авторів, знижується, хоча на початковій стадії формування холодостійкості можливе підвищення вмісту індолілоцтової кислоти.

Тривалий вплив знижених температур на рослини призводить до зменшення вмісту в них основних рістстимулюючих гормонів – цитокінінів і гіберелінів (див.: Титов и др., 2006).

Таким чином, при адаптації рослин до несприятливих температур змінюється гормональний баланс і встановлюється новий, сприятливий для забезпечення процесів, пов'язаних з температурною адаптацією. Припускають, що особливу роль на ранніх етапах адаптації теплолюбних рослин до дії низьких температур відіграють зміни вмісту АБК і ауксинів. Ці фітогормони разом з посередниками сигнальних систем причетні до індукування синтезу стресових білків та антиоксидантних ферментів, що є необхідним для підвищення холодостійкості.

Способи підвищення холодостійкості теплолюбних рослин

Одним з класичних способів підвищення холодостійкості рослин, що використовується у практичному рослинництві, є загартування насіння і проростків. Теоретичні основи такого підходу описані вище.

Холодостійкість рослин підвищується і обробкою екзогенними сполуками. Перспективними вважаються синтетичні аналоги фітогормонів та інші регулятори росту. Так, повідомляється про підвищення низькотемпературного проростання насіння і стійкості рослин до холодового пошкодження препаратами цитокінінового типу дії – кінетином, полістимуліном, каратоліном 2. Показано підвищення холодостійкості рослин томату і огірка під впливом деяких препаратів етиленпродуцентів (дигідрелу, алару, етрелу). Перспективним нині вважається використання саліцилової кислоти, яка неспецифічно підвищує стійкість рослин до різних стресорів, у тому числі до низьких температур.

Для підвищення холодостійкості культурних рослин також використовують регулятори росту негормональної природи – паклобутразол, хлорхолінхлорид, мефлуїдид, уніконазол. Водночас

слід відзначити, що механізми дії багатьох штучних препаратів залишаються мало дослідженими, а позитивні ефекти не завжди стабільні (див.: Лукаткин, 2002).

Останніми роками для підвищення холодостійкості рослин використовуються клітинні і генні технології. Так, скринінг і наступна регенерація клітин калусної і суспензійної культур тютюну, які виживали після охолодження, дозволили отримати рослини тютюну з епігенетичною підвищеною стійкістю до низьких температур. Шляхом соматичної гібридизації теплолюбного томата *Licopersicon esculentum* з холодостійким видом *Licopersicon peruvianum* отримано гібрид з поліпшеними фотосинтетичними характеристиками за умов знижених температур.

Як уже зазначалося, перспективним для підвищення холодостійкості теплолюбних видів рослин може бути перенесення в їх геном чужорідних генів десатурази, що зумовлює підвищення ступеня ненасиченості мембранних ліпідів і зниження температури їх фазового переходу. Ефекти підвищення холодостійкості теплолюбних культурних рослин отримані і при перенесенні в них генів антиоксидантних ферментів – супероксиддисмутази, глутатіонредуктази, глутатіон-S-трансферази.

Лекція 6

МОРОЗОСТІЙКІСТЬ РОСЛИН

Морозостійкість включає в себе властивість холодостійкості, але, на відміну від холодостійких, морозостійкі рослини здатні виживати за дії морозу (від'ємних температур), що супроводжується утворенням (нуклеацією) міжклітинного і позаорганного льоду (Трунова, 2007). Це унікальна властивість, притаманна виключно рослинам. Ніякі інші організми не залишаються живими після утворення льоду. Властивість морозостійкості є основою існування великої групи багаторічних рослин, що ростуть в умовах холодного і помірного клімату.

Причини пошкоджень рослин за дії від'ємних температур

Доведено, що лід може утворюватися всередині клітин та у міжклітинниках. Внутрішньоклітинне льодоутворення завжди летальне не лише для холодостійких і теплолюбних, а й для морозостійких рослин. Миттєве і необоротне ушкодження клітин при утворенні внутрішньоклітинного льоду свідчить про фізичну природу процесу: відбувається руйнування мембран клітини кристалами льоду, що формуються в протоплазмі (Левитт, 1983). Водночас в природних умовах дуже рідко має місце внутрішньоклітинне льодоутворення, адже воно можливе лише за дуже швидкого зниження температури (10-12 град. за годину). В природних умовах температура знижується зі швидкістю 1-2 град. за годину або ще повільніше (Самыгин, 1974).

Найбільш поширене в природі позаклітинне утворення льоду, яке відбувається в умовах відносно повільного зниження температури. Незважаючи на негативні наслідки, позаклітинне льодоутворення є фактично єдиним можливим шляхом виживання рослин за тривалого зимового періоду.

В ході еволюції у рослин сформувалися механізми, що дозволяють уникати утворення внутрішньоклітинного льоду. За поступового зниження температури відбувається повільний вихід води з клітин і замерзання її в міжклітинниках. Виходу води сприяє

збільшення водної проникності мембран (Трунова, 2007). Для утворення льоду за температур нижчих від 0°C необхідна наявність нуклеаторів – хімічних сполук або сапрофітних бактерій, які служать центрами кристалізації. В їхній присутності відбувається так звана гетерогенна нуклеація льоду. Гомогенна, характерна лише для абсолютно чистої води, починається за температури близько мінус 40°C за рахунок самозародження дрібних кристалів (зародків) льоду. В природних умовах таке переохолодження тканин без заморожування малоімовірно, хоча окремі тканини зимуючих рослин можуть зберігати воду у незамерзломому стані (Трунова, 2007).

Встановлено, що нуклеаторами льоду в рослинних тканинах можуть бути комплекси, що складаються з фосфоліпідів, вуглеводів і білків. Вони виділені, зокрема, з листків жита (Brush et al., 1994). Поширеними нуклеаторами є сапрофітні бактерії *Pseudomonas syringae* і *Erwinia herbicola*. Це пов'язане з особливостями їх мембран, що містять комплекс, який складається з білків, фосфатидилінозитолів і цукрів у вигляді маннози, глюкозаміну і галактози (Kozloff et al., 1991).

Нуклеація льоду в міжклітинниках хоча і є шляхом уникнення летального внутрішньоклітинного льодоутворення, не є безпечною для рослин і також може спричиняти пошкодження. Виділяють дві основні їх причини: зневоднення протопластів і механічні пошкодження зневодненої протоплазми. Показано, що морозостійка береза у зимовий період втрачає до 80% води. За такого зневоднення в умовах позитивних температур не може вижити жодна рослина. Озимі злаки менш стійкі до зневоднення порівняно з деревними рослинами і при заморожуванні витримують лише 50% втрату води (Трунова, 2007). Зневоднення протоплазми є переважною причиною загибелі незагартованих рослин, загартовані частіше гинуть через механічні пошкодження (Колесниченко, Войников, 2003).

Негативними наслідками зневоднення є, зокрема, підвищення концентрації розчинних речовин в клітинах, передусім, солей; висока ймовірність утворення ковалентних зв'язків між макромолекулами; конформаційні зміни макромолекул через зниження вмісту стабілізуючих їх молекул води; порушення структури мембран; пошкодження структури протоплазми при зворотному поглинанні води після розморожування (Левитт, 1983).

Особливо чутливими структурами клітини, що легко пошкоджуються при гіпотермії, є клітинні мембрани. В процесі

охолодження в'язкість ліпідного бішару мембран поступово підвищується, а при досягненні критичної низької температури різко зростає внаслідок фазового переходу ліпідного бішару з рідинно-кристалічного стану в стан гелю. Як уже зазначалося, схожі явища можливі і при низьких позитивних температурах у теплолюбних рослин, клітинні мембрани яких містять значну кількість насичених жирних кислот. У морозостійких рослин завдяки більшому вмісту ненасичених жирних кислот зміни стану мембран відбуваються за нижчих (від'ємних) температур. Поряд з прямим впливом температури на фазовий стан ліпідів мембран, важливим чинником пошкодження мембран при заморожуванні є втрата ними води. Зневоднення порушує рівновагу між системами білок–ліпід і білок–вода, внаслідок чого виникають структурні перебудови молекулярних шарів і змінюються властивості мембран.

За таких умов мембранозв'язані білки втрачають свою функціональну активність, підвищується пасивна проникність мембран і витікання іонів. За показником виходу іонів з клітин визначають пошкоджуючий вплив несприятливих чинників (у тому числі від'ємних температур).

Значні порушення за дії гіпотермії відбуваються не лише в плазмалемі, а й в мембранах хлоропластів та мітохондрій. При цьому можливе необоротне пригнічення фотосинтетичного і окиснювального фосфорилування (Колесниченко, Войников, 2003). Водночас порушення функціонування електрон-транспортних ланцюгів може призводити до посилення утворення активних форм кисню (наприклад, перенесення електрона на молекулярний кисень з утворенням супероксидного радикала) та інтенсифікації пероксидного окиснення ліпідів, що, в свою чергу, спричиняє додаткові порушення. Однак, необхідно зауважити, що такі процеси не є специфічною особливістю холодкових порушень. Вони можуть бути спричинені найрізноманітнішими чинниками, при цьому зростання вмісту активних форм кисню і продуктів пероксидації ліпідів в певних межах може виступати в ролі сигналу для активації важливих захисних (адаптивних) реакцій.

Водночас механізми запуску адаптивних реакцій, що приводять до формування морозостійкості, залишаються мало вивченими. Формування морозостійкості – досить складний і тривалий в часі процес, що включає зміни експресії значної кількості генів (див. нижче). Ймовірно, що індуктором таких змін є не лише зниження

температури, а й зміна інших зовнішніх і внутрішніх факторів – довжини дня, вмісту фітогормонів в тканинах тощо. Є підстави вважати, що у запуску адаптації до морозів задіяний комплекс сигнальних систем. Як уже зазначалося, первинним рецептором зниження температури можуть бути мембрани, в'язкість яких за зниження температури змінюється практично миттєво. Такі зміни, зокрема, можуть призводити до відкриття кальцієвих каналів і активації подальших шляхів сигнальної трансдукції. Практично не дослідженим залишається питання диференційованих, послідовних, довготривалих змін експресії генів, що супроводжують весь процес загартування.

Адаптація рослин до морозів

У процесі тривалої низькотемпературної адаптації морозостійкі рослини набувають стійкості до несприятливих наслідків позаклітинного утворення льоду, а при настанні оптимальних для росту умов переходять до вегетації.

Переходу рослин із вегетуючого в загартований морозостійкий стан сприяють відповідні зовнішні умови. В природі цей процес відбувається восени на тлі вкорочення довжини дня і зниження температур. І.І.Тумановим (Туманов, 1979) запропонована теорія, згідно з якою рослини проходять три етапи підготовки до зими: перехід до стану спокою і дві стадії загартування. Багаторічні рослини входять в органічний (глибокий) спокій, а озимі злаки у так званий вимушений. Обов'язковою зовнішньою умовою для входження деревних і чагарників у спокій є вкорочення довжини дня, зниження температури в цей період менш важливе. Під впливом короткого світлового дня відбувається перебудова гормонального балансу клітин: вміст ауксинів і гіберелінів зменшується, а кількість АБК зростає. Такі зміни призводять до призупинення росту апікальних меристем, і рослини переходять в стан глибокого спокою. Проте сам по собі цей процес не призводить до значного підвищення морозостійкості рослин. Входження у спокій, як результат призупинення росту, у багаторічних рослин є лише основою для процесу загартування.

Перша фаза загартування відбувається за близьких до 0°C, але позитивних температур. В природних умовах цей процес йде на світлі. При цьому в озимих жита і пшениці значно зростає вміст цукрів в листках і вузлах кущіння. Цьому сприяє те, що інтенсивність

фотосинтезу в цей період перевищує інтенсивність дихання. Також під час першої фази загартування збільшується кількість білків і загальний вміст мембранних ліпідів.

Друга фаза загартування зимуючих рослин проходить за невеликих морозів (до -5°C). При цьому створюються умови для виходу води з клітин в міжклітинники. Тим самим запобігається утворення льоду всередині клітин. Початку позаклітинного утворення льоду сприяє різниця тиску парів води всередині клітини і ззовні, висока водна провідність мембран і наявність нуклеаторів льоду в апопласті.

Значення розчинних вуглеводів в адаптації рослин до від'ємних температур. Існує позитивна кореляція між масовою часткою розчинних вуглеводів (цукрів) і морозостійкістю озимих культур і деревних рослин. Озимі злаки нагромаджують сахарозу та більш полімерні олігосахариди під час першої фази загартування за рахунок фотосинтезу. Деревні можуть нагромаджувати цукри і за рахунок гідролізу крохмалю.

Особливе значення нагромадження цукрів має для озимих злаків. Вони, на відміну від деревних, не здатні витримувати значного зневоднення при заморожуванні, їх морозостійкість формується не стільки за рахунок відтоку води з клітин в міжклітинники, скільки шляхом збереження її частини в клітинах у незамороженому стані. При цьому нагромадження цукрів та інших розчинних сполук, які виконують антифризні та осмопротекторні функції, сприяє підтриманню води у незамороженому стані. Інша важлива функція цукрів – кріопротекторна. Вони сприяють підтриманню нормальної конформації білків за умов зневоднення. Крім того, добре відома здатність цукрів стабілізувати мембрани. Показано, зокрема, що сахароза може замінювати воду в структурі фосфоліпідів за стресів, що спричиняють зневоднення клітин. Експериментально доведена можливість утворення водневих зв'язків між кисневими атомами фосфатів у складі фосфоліпідів і атомами водню гідроксилів цукрі. Ще одна протекторна функція вуглеводів пов'язана з їх антиоксидантними властивостями (Колупаев, Трунова, 1992).

За дії від'ємних температур (друга фаза загартування і більш низькі температури) у озимих злаків відбувається активація інвертази, через що посилюється гідроліз сахарози та інших олігосахаридів, нагромаджених під час першої фази загартування (Колупаев и др., 1993). Це збільшує загальну концентрацію цукрів як

осмотично активних і протекторних речовин. Переконливі докази поліфункціонального значення цукрів в низькотемпературній адаптації отримані в лабораторії зимостійкості Інституту фізіології рослин ім. К.А. Тімірязєва Російської академії наук на прикладі рослин картоплі, трансформованих геном дріжджової інвертази. У таких рослин змінюється розподіл цукрів між органами і відбувається нагромадження розчинних вуглеводів у листках, що призводить до істотного підвищення їх стійкості до низьких температур.

Зміни ліпідного складу рослин за адаптації до від'ємних температур. Як зазначалося, важливе значення у стійкості до низьких позитивних температур має вміст залишків ненасичених жирних кислот у складі біомембран. Так само від ступеня ненасиченості ліпідів залежить і морозостійкість рослин. Чим він вищий, тим нижчою є температура фазового переходу мембран.

Відомо, що здатність клітин адаптуватися до низьких температур значною мірою пов'язана з синтезом ненасичених жирних кислот, зокрема, ліноленової. У підвищенні ступеня ненасиченості жирних кислот мембранних ліпідів мають також велике значення процеси десатурації насичених жирних кислот, яку здійснюють ацил-ліпідні десатурази (Трунова, 2007).

Показано, що експресія генів різних десатураз диференційовано залежить від температури. Так, на прикладі ціанобактерій встановлено, що експресія *desC*-гена, який кодує синтез десатурази, відповідальної за утворення подвійного зв'язку при переході зі стеаринової в олеїнову кислоту, не залежить від температури. Водночас гени *desA* і *desB*, що кодують синтез десатураз, котрі беруть участь в утворенні лінолевої і ліноленової кислот, експресуються під впливом знижених температур. Іншими словами, одна з форм десатураз, відповідальна за утворення першого подвійного зв'язку при переході стеаринової кислоти в олеїнову, конститутивно забезпечує клітини вихідним субстратом для подальшої десатурації, процес якої індукується зниженою температурою.

Поряд зі змінами жирнокислотного складу для адаптації до від'ємних температур має значення і зміна співвідношенням між формами ліпідів. Серед ліпідних форм, що сприяють стабілізації бішарової структури мембран при низьких температурах, особливо важливе значення мають фосфатидилхолін і дигалатозилдіацилгліцерол. Переважний синтез цих ліпідних форм

являє собою один з механізмів, що дозволяють уникнути переходу ліпідного бішару в окремих ділянках мембрани в інвертовану гексагональну фазу. Полярна голівка фосфатидилхоліну забезпечує нижчу температуру фазового переходу цього фосфоліпиду порівняно з фосфатидилетаноламіном (Климов, 2001).

Функції специфічних білків, що утворюються при адаптації рослин до морозу. Основою всіх адаптивних перетворень, у тому числі синтезу ліпідів і цукрів, є зміни набору синтезованих білків. З використанням інгібіторів біосинтезу білка ще у 70-ті роки минулого століття було показано, що пригнічення синтезу білків у рослин спричиняло повну втрату ними здатності до загартування до низьких температур (Трунова, Зверева, 1977).

Нині виявлено велику кількість груп (родин) білків, гени яких експресуються дією низької загартовуючої температури.

Однією з таких груп білків є дегідрини. Детальне вивчення особливостей структурної організації дегідринів показало наявність повторюваних консервативних доменів, які забезпечують дегідринам своєрідну просторову конфігурацію і можливість їх участі в реакціях, що попереджають втрату води. Це сприяє виконанню дегідринами специфічних функцій, зокрема, попередженню ними коагуляції макромолекул за умов зневоднення клітин (Аллагулова, 2003). Пізніше було встановлено, що синтез цих білків посилюється і під час холодового загартування. Припускають, що дегідрини перешкоджають утворенню льоду в клітинах і стабілізують інші білки при зневодненні, пов'язаному з відтоком води в клітинах при позаклітинному утворенні льоду (Войников, Колесниченко, 2003).

Також за дії холоду індукується синтез білків з молекулярною масою 94 kD, котрі виявляють шаперонну активність і є аналогами білків теплового шоку з молекулярною масою 90 kD. Зафіксований також синтез ряду інших шаперонів за дії від'ємних температур (Трунова, 2007).

У морозостійких рослин у відповідь на гіпертермію синтезуються антифризні білки. Найважливішою властивістю цих білків є перешкоджання розростанню кристалів льоду до розмірів, що спричиняють летальні пошкодження клітин. Такі білки виявлені в апопласті озимого жита, деяких видів пшениці, а також в арахісу (Климов, 2001).

Серед механізмів захисту рослин від низькотемпературних ушкоджень важливу роль відіграє термогенез в мітохондріях, котрий,

як вважалося раніше, притаманний лише тваринним організмам. Однак в мітохондріях рослин також виявлені системи, здатні спричиняти дисипацію енергії з утворенням тепла. Першою з таких систем була виявлена альтернативна ціанідрезистентна оксидаза. У 60-ті роки 20 століття було встановлено, що під час цвітіння ароїдних лілій в їхніх квітках відбувається активація ціанідрезистентного дихання, яка супроводжується термогенезом, за рахунок чого температура квітки може підвищуватися на кілька градусів. Лілійні використовують термогенез як спосіб принаджування комах-запилювачів. Пізніше роль альтернативної оксидази в генерації тепла була встановлена у зв'язку зі стійкістю нетермогенних рослин (у тому числі озимої пшениці) до низьких температур (Колесниченко, Войников, 2003).

У рослин були виявлені й інші білки, причетні до ефекту термогенезу. Так, за рахунок роз'єднання окиснення і фосфорилування в мітохондріях зниженню температури початку нуклеації льоду в рослинах сприяють білки холодowego шоку з молекулярною масою 310 kD. Виділення теплоти тимчасово гальмує зниження температури самої рослини і може сприяти повільнішому виходу води з клітин в міжклітинники. Цікаво, що білок з молекулярною масою 310 kD, який синтезується у рослин озимої пшениці конститутивно, має слабшу роз'єднувальну активність порівняно з тим самим білком, синтезованим після тривалого впливу низької температури. Повідомляється також про антиоксидантну роль роз'єднувальних білків, оскільки при роз'єднанні окиснення і фосфорилування зменшується ймовірність утворення активних форм кисню в мітохондріях (Колесниченко, Войников, 2003).

Методи оцінки морозостійкості озимих злаків

Морозостійкість є полігенною ознакою, що ускладнює діагностику зразків рослин в селекційних програмах. Проте використання інтегральних показників (передусім виживаності рослин після дії низьких температур) дає змогу диференціювати генотипи.

Одним з поширених підходів є польове тестування. Його переваги полягають у доступності і можливості оцінки стійкості рослин до всього комплексу несприятливих чинників зимового періоду (проморожування рослин в факторостатних лабораторних умовах дає змогу оцінити тільки витривалість до низьких

температур). Водночас через дію на рослини в польових умовах комплексу несприятливих чинників не завжди можна оцінити саме морозостійкість. Крім того, з точки зору селекціонерів, зими, які добре диференціюють генотипи за зимостійкістю, не часті навіть в регіонах, де необхідний високий рівень стійкості до від'ємних температур.

Більш відтворювані результати дає штучне (модельне) тестування морозостійкості. Для цього рослини або проростки витримують за умов контрольованого проморожування у морозильних установках, вегетаційних камерах. Перед тестуванням проморожуванням рослини, як правило, загартовують в природних або лабораторних умовах. Проте у разі загартування в природних умовах відтворюваність результатів може бути незадовільно низькою. Загартування у вегетаційних камерах при заданих світлових і температурних режимах може забезпечити контрольований рівень даного процесу, однак метод досить дорогий і потребує перебування рослин в камері протягом 30 днів, що не завжди можливо. Компроміс полягає у використанні природних умов на початкових стадіях розвитку з перенесенням рослин у вегетаційні камери з контрольованими умовами на заключній стадії загартування на кілька днів (Применение..., 2007).

Непрямі методи оцінки морозостійкості також дозволяють вести добір зразків на цю ознаку. Так, встановлено кореляції між вмістом проліну, розчинних вуглеводів і морозостійкістю зразків. Певну інформаційну цінність можуть мати дані про динаміку активності деяких ферментів (наприклад, інвертази) під час загартування і тестуючого проморожування. Із виживаністю рослин після тестуючого охолодження зворотно корелює показник виходу електролітів з пошкоджених мембран.

Лекція 7

ЖАРОСТІЙКІСТЬ РОСЛИН

На 40% території помірного клімату Землі рослини зазнають впливу високих (ушкоджуючих) температур. Теплостійкість (жаростійкість) в контексті цілої рослини визначається як її здатність до росту і формування урожаю за умов дії високих температур (гіпертермії) (Wahid et al., 2007). Пошкоджуючі ефекти високих температур залежать від їх величин і тривалості впливу. Температура, за якої припиняється ріст і розвиток рослин, є верхнім пороговим значенням. За дуже високих температур пошкодження і смерть клітин можуть відбуватися протягом кількох хвилин і супроводжуватися втратою клітинної організації.

Ефекти високотемпературних пошкоджень

Серед відомих зовнішніх ефектів дії надмірно високих температур на рослини – опіки (запал) листків і стебел, прискорене старіння, опадання листків, гальмування або припинення росту, зниження урожайності. Тривалий високотемпературний вплив в період проростання насіння уповільнює цей процес. Так, ріст колеоптиля кукурудзи припиняється за дії температур 40-45°C. Дія високих температур окремо або в поєднанні з посухою є обмежуючим чинником в період цвітіння зернових і наливу зерна у багатьох регіонах з помірним кліматом. В цілому генеративні фази розвитку більшості видів рослин є чутливими до дії високих температур.

Основні функції рослин мають різну чутливість до дії високих температур. Як правило, спершу припиняється рух цитоплазми, інтенсивність якого безпосередньо залежить від енергопостачання за рахунок процесів дихання (наявності макроергічних сполук). За вищих температур знижується інтенсивність фотосинтезу. Хлоропласти досить чутливі до гіпертермії. Більш теплостійкою функцією є дихання (Лархер, 1978). В цілому висока температура може порушувати анатомічні структури на всіх рівнях – від субклітинного і клітинного до тканинного і органного.

Головними причинами ушкоджень і загибелі рослин за дії високих температур є інактивація і денатурація білків. Навіть у разі «виходу з ладу» небагатьох, особливо термолабільних ферментів, відбувається серйозне порушення метаболізму. При функціонуванні білків їх просторова конформація зазнає змін за рахунок перерозподілу слабких зв'язків. Можливість здійснення функціональних змін конформації визначається жорсткістю або гнучкістю структури макромолекули (Александров, 1985). Для нормального функціонування макромолекула повинна мати певну стабільність. Зі зростанням температури вище оптимальної гнучкість макромолекули стає надлишковою, що може призводити до порушення функцій, які перебувають під контролем даних термолабільних ферментів.

Схожим є вплив високих температур на ліпідні молекули. Для функціонування мембран необхідний певний рівень в'язкості ліпідів. Підвищення температури призводить до її зниження, через що порушуються функції біомембран.

Є підстави вважати, що температура впливає і на слабкі зв'язки в молекулах нуклеїнових кислот, а отже на їх функціонування. В цілому теплостійкість виду значною мірою визначається ступенем жорсткості всієї системи слабких зв'язків, що забезпечують просторову структуру компонентів клітин і беруть участь в її функціонуванні (Александров, 1985).

Наслідком зміни стану макромолекул є порушення перебігу конкретних фізіолого-біохімічних функцій рослинного організму.

Так, значних змін зазнають фотосинтетичні реакції. Зменшення споживання відновника НАДФН може призводити до посилення генерації активних форм кисню хлоропластами і, як наслідок, до окиснювальних пошкоджень. Водночас зміни співвідношення між хлорофілом і каротиноїдами на користь останніх, спрямовані на захист від вільнорадикального окиснення макромолекул, можуть негативно відбиватися на інтенсивності фотосинтезу.

Помітних змін може зазнавати і метаболізм азоту: уповільнюється поглинання мінерального азоту, його перетворення на органічний. При порушенні активності глутамінсинтази, яка належить до термолабільних ферментів, можливе збільшення вмісту аміаку в клітинах, що призводить до токсичних ефектів.

На перших етапах дії високих температур можлива активація біосинтезу білка, але надалі цей процес пригнічується (Шматько и

др., 1989). На тлі пригнічення синтезу конститутивних білків можливе посилення новоутворення білків теплового шоку. Цей процес розглядається як адаптивний (див. нижче).

Механізми пристосування рослин до гіпертермії

У період активної вегетації рослини можуть зазнавати дії різних за інтенсивністю стресових температур, тому в ході еволюції у них сформувалися різноманітні механізми захисту від негативної дії несприятливих температур. До них належить і здатність до теплового загартування – підвищення теплостійкості у відповідь на дію високих температур.

Феноменологія теплового загартування рослин. Відомо, що процес температурного загартування рослин включає «лаг-період» – відрізок часу, протягом якого стійкість рослин достовірно не збільшується. Так, встановлено, що при загартуванні проростків пшениці дією температури 40°C підвищення їх теплостійкості відбувалося через 5 хв, рослин огірка при загартуванні за температури 38°C – через 45 хв. Після завершення лаг-періоду теплостійкість монотонно зростала впродовж кількох годин (Титов и др., 2006). Лаг-період спостерігався і при короткочасному загартуванні проростків пшениці сублетальною температурою (30 секундний вплив температури 47 °C). Розвиток теплостійкості можна було зафіксувати через 1-3 год після дії високої температури (Акімова и др., 2002).

Слід зазначити, що ефекти, які спричиняє короткочасний нагрів рослин, можуть фіксуватися впродовж довгого часу і при визначенні теплостійкості окремих їх функцій. Так, теплостійкість фототаксису хлоропластів листків *Tradecantia albiflora* після їх загартування впродовж 3 год при температурі 38°C продовжувала збільшуватися протягом 5 діб, після чого знижувалася (Alexandrov et al., 1990). Існує припущення, що розвиток ефекту загартування в часі зумовлений необхідністю репарації певних функцій після загартування сублетальною температурою (Александров, Кислюк, 1994). В той же час наявність лаг-періоду можна розглядати і як непряме свідчення необхідності поступового запуску адаптивних процесів, пов'язаних з функціонуванням сигнальних систем і зміною експресії генів.

Можливі учасники трансдукції сигналу високотемпературного стресу в геном. Як уже зазначалося, природа рецептора, за допомогою якого рослинна клітина сприймає температурні зміни,

дотепер залишається невідомою. Припускають, що стан мембранних ліпідів змінюється як при зниженні, так і при підвищенні температури. Як наслідок, змінюється і стан мембранозв'язаних білків. Підвищення текучості мембран може впливати на експресію генів. Так, псевдорозрідження мембран *Synechocystis* бензиловим спиртом знизило порогову температуру активації експресії генів білків теплового шоку (БТШ) (Sung et al., 2003). Можна вважати, що температурна дія приводить до зміни активності стартових ферментів сигнальних систем, більшість з яких локалізована в плазмалемі, і появи відповідних сигнальних посередників або безпосередньо змінює стан кальцієвих каналів. Відомо, що збільшення концентрації кальцію в цитозолі є дуже швидкою реакцією на гіпертермію, яка може розвиватися впродовж кількох хвилин і навіть секунд.

Також вважають, що важливими посередниками між температурною дією і біохімічною відповіддю клітини можуть бути активні форми кисню (АФК) та продукти пероксидного окиснення ліпідів (Dat et al., 2000; Suzuki, Mittler, 2006).

Правда, є відомості про те, що підвищення теплостійкості рослин після короткочасної температурної дії може бути пов'язане зі зміною стану вже існуючих білків (Титов и др., 2006). Вважають, що такий ефект високотемпературного загартування може реалізовуватися без перепрограмування експресії геному та індукованого білкового синтезу. Так, підвищення теплостійкості проростків ячменю під впливом короткочасного нагріву не пригнічувалося інгібіторами біосинтезу білка і нуклеїнових кислот (Акімова и др., 2002).

Слід зазначити, що результати оцінки теплостійкості значною мірою залежать від методів її визначення. У згаданих дослідженнях (Акімова и др., 2002; Титов и др., 2006) теплостійкість оцінювалася за величиною температури, що спричиняє загибель (коагуляцію цитоплазми) 50% клітин висічок листків після їх 5-хвилинного нагрівання у водному термостаті за певних температур. Такий підхід дозволяє оцінити лише так звану первинну теплостійкість (Александров, Кислюк, 1994). Більш інтегральним показником стійкості може бути оцінка виживаності рослин через певний час (як правило, кілька діб) після дії ушкоджуючих температур. Такий показник включає як первинну теплостійкість рослин, так і їх реparatorну здатність і механізми довготривалої адаптації (Александров, Кислюк, 1994).

Є підстави вважати, що формування загальної стійкості відбувається з участю системи індукованого біосинтезу білка. Так, показано, що розвиток теплостійкості проростків сосни і пшениці після загартування короткочасною (1 хв) дією сублетальних температур пригнічувався попередньою обробкою інгібітором біосинтезу білка циклогексимідом, антагоністами кальцію (хлорид лантану, хлорпромазін) і антиоксидантом іонолом (Карпец, 2007). Такі результати можна розглядати як свідчення причетності білоксинтезуючої системи, а також універсальних сигнальних посередників (іонів кальцію та активних форм кисню – АФК) до підвищення теплостійкості, яке спричиняла короткочасна дія сублетальної високої температури.

Зміна про-/антиоксидантної рівноваги є однією з неспецифічних ознак стресової реакції. Причинами збільшення вмісту АФК в рослинних клітинах при гіпертермії можуть бути: підвищення активності АФК-генеруючих ферментів (НАДФН-оксидази, окремих форм пероксидази, зниження активності антиоксидантних ферментів, посилення утворення АФК в хлоропластах і мітохондріях внаслідок надмірного відновлення їх електрон-транспортних ланцюгів (Колупаєв, Карпец, 2009). Останнє пов'язане з пригніченням фіксації вуглекислого газу і зменшенням енерговитрат в умовах стресу.

Природно, що АФК є хоча і необхідними, але не єдиними учасниками передачі загартувального температурного сигналу в геном. Їх утворення, ймовірно, залежить від кальцієвого балансу рослинних клітин. Так, при обробці проростків пшениці блокатором кальцієвих каналів хлоридом лантану посилення утворення пероксидів після дії загартувальної температури не спостерігалось (Карпец, Колупаєв, 2008). Примітно, що різними авторами одержані дані про зниження ефекту теплового загартування при обробці рослин антагоністами кальцію.

Таким чином, іони кальцію і АФК, напевно, є важливими учасниками процесу передачі температурного сигналу. Цілком природно, що в цей процес можуть бути залучені й інші сигнальні посередники, а також «стресові» фітогормони і гормоноподібні сполуки – абсцизова і саліцилова кислоти, етилен тощо (Larkindale, Huang, 2004; Hu et al., 2007).

Роль гормональної системи у формуванні теплостійкості рослин

Гормональна система рослин в комплексі з сигнальними посередниками задіяна у формуванні стресових і адаптивних реакцій рослин. Більшість рецепторів фітогормонів, як і зовнішніх стресорів, міститься в плазматичній мембрані (Тарчевский, 2002). Таким чином, саме плазмалема і, можливо, деякі інші мембрани стають місцем взаємодії систем сигнальної трансдукції і гормональної регуляції. За сучасними уявленнями, сигнальні системи задіяні в передачі в геном як первинного (стресового), так і вторинного (гормонального) сигналу (Колупаєв, Косаківська, 2008). Загальновідомо, що в цілому за несприятливих умов в рослинах зменшується вміст гормонів-активаторів цитокинінів, гіберелінів, ауксинів при одночасному збільшенні продукування інгібіторів росту і метаболізму – абсцизової кислоти, етилену (Титов и др., 2006). Розглянемо окремі зміни в гормональній системі рослин, що відбуваються у відповідь на гіпертермію.

Абсцизова кислота (АБК). Одним з основних ефектів АБК на клітинному рівні є її вплив на інтенсивність біосинтезу білка. Він пов'язаний з частковим інгибуванням транскрипції і впливом на посттранскрипційні процеси (процесинг мРНК і трансляція). Результатом дії АБК є пригнічення синтезу більшості конститутивних білків та індукція синтезу стресових білків.

Значення АБК для теплостійкості рослин переконливо підтверджене в експериментах з рослинами-мутантами, дефектними за синтезом АБК. Вони відрізнялися низькою теплостійкістю (Larkindale et al., 2005).

За дії високих загартовуючих температур на рослини огірка збільшення вмісту вільної АБК починалося через 30 хвилин і продовжувалося протягом двох годин, після чого відзначалося поступове зниження вмісту АБК (Титов др., 2006). До кінця 24-годинної експозиції рослин в цих умовах рівень АБК в листках повертався до початкової величини, тоді як теплостійкість зберігалася на досягнутому рівні. В цілому схожі результати були одержані і при вивченні динаміки вмісту АБК в проростках пшениці у зв'язку з формуванням їх теплостійкості в процесі загартування. Збільшення вмісту АБК передувало підвищенню теплостійкості проростків пшениці (Титов др., 2006).

У початковий період дії ушкоджувальних температур на проростки огірка і ячменю також зафіксовано збільшення вмісту

АБК. При цьому короткочасна дія таких температур призводила до одночасного підвищення теплостійкості листків (Титов др., 2006).

Захисну дію АБК на клітинному рівні при тепловому стресі пов'язують з цілим рядом ефектів. Один з них, як уже наголошувалося, полягає у здатності АБК посилювати біосинтез стресових білків. Показана можлива причетність АБК до синтезу шаперонів (Shinozaki et al., 2007). Екзогенна АБК індукувала синтез 43 поліпептидів в клітинах *Bromus inermis*, 26 з яких відрізнялися високою термостабільністю (Robertson et al., 1994).

Вплив АБК пояснюють також стабілізацією мембран. Такий її ефект відомий досить давно (Farkas et al., 1985). Останнім часом його пов'язують з позитивною дією АБК на активність антиоксидантних ферментів, зокрема, супероксиддисмутази і каталази (Chen, Li, 2002). Крім того, АБК здатна стимулювати накопичення в клітинах низькомолекулярних протекторів з поліфункціональною, у т. ч. антиоксидантною, дією, зокрема, проліну і цукрів.

У деталях механізми трансдукції сигналу АБК при реакції рослин на гіпертермію поки що не досліджені. Значно більше відомо про дію АБК при осмотичному стресі (див. лекцію 8). Проте є підстави припускати, що в реалізації сигналу АБК, який призводить до підвищення стійкості рослин до нагріву, беруть участь основні сигнальні посередники, у т. ч. АФК та іони кальцію.

Узагальнюючи розглянуті на прикладі дії АБК дані, зв'язки між роботою сигнальних і гормональної систем при дії високотемпературного стресу можна представити у вигляді такої схеми (Колупаєв, Косаківська, 2008): взаємодія стресора з первинним рецептором → активація стартових ферментів сигнальних систем → поява внутрішньоклітинних месенджерів → зміна стану факторів регуляції транскрипції → активація генів синтезу стресового фітогормону → накопичення фітогормону → взаємодія фітогормону із специфічним рецептором → активація стартових ферментів сигнальних систем → поява внутрішньоклітинних месенджерів → зміна стану факторів регуляції транскрипції → біохімічна і фізіологічна відповідь (наприклад, посилення синтезу БТШ, новоутворення проліну).

Індолілоцтова кислота (ІОК). Відомо, що при дії багатьох стресорів вміст ІОК у рослинах знижується. У той же час теплове загартування рослин відбувається на тлі досить високого вмісту вільної ІОК (Титов и др., 2006). Більше того, в початковий період дії

гіпертермії можливе короткочасне підвищення вмісту ІОК. Вважають, що під контролем ІОК можуть перебувати деякі гени, причетні до захисних реакцій. Зокрема, підвищення вмісту ІОК в початковий період дії високих температур в рослинах пшениці може зумовлювати посилення експресії гена супероксиддисмутази – ключового ферменту антиоксидантного захисту (Веселов, 2001). Також показана індукція ауксином гена глутатіонтрансферази (Abel, Thedologis, 1996).

Етилен. Як і АБК, етилен вважається типовим гормоном стресу. Він бере участь у реакціях рослин на абіотичні і біотичні стресори. Зокрема, показана участь етилену у таких реакціях рослин на патогени, як програмована клітинна загибель і синтез PR-білків.

Збільшення продукції етилену показане за дії несприятливих абіотичних чинників різної природи: механічні пошкодження, посуха, затоплення, екстремальні температури, гербіциди. В той же час дані про характер зміни продукування етилену рослинами при високотемпературному стресі неоднозначні. Так, у рослин пшениці під дією високих температур пригнічувалося утворення етилену. У бавовника після короткочасної дії гіпертермії мало місце збільшення утворення етилену, яке потім змінювалося його зниженням. Подальше накопичення таких захисних сполук як пролін і поліаміни пов'язують з дією сигналу етилену (Кузнецов и др., 1991). Свідченням причетності етилену до запуску захисних реакцій є результати експериментів з мутантами, дефектними за синтезом цього фітогормону. Такі рослини мали низьку теплостійкість (Larkindale et al., 2005). В той же час на прикладі проростков бобів показано, що зменшення утворення етилену, що спричиняється високотемпературним стресом, попередньою обробкою інгібітором синтезу етилену хлоридом кобальту підвищувало теплостійкість рослин, сприяло збільшенню в них активності антиоксидантних ферментів і поліамінів (Jiao et al., 2006). Напевно ефекти етилену на різних стадіях стресових реакцій можуть бути різними: в одних випадках цей фітогормон може індукувати адаптивні реакції, а в інших – відображати пошкодження або бути причетним до їх розвитку, зокрема, до запуску програмованої загибелі рослинних клітин.

Молекулярні механізми підвищення теплостійкості рослин

Зміни термостабільності білків. Ефекти теплового загартування рослин, як правило, супроводжуються змінами термостабільності білків і певних функцій клітин. Підвищення термостабільності білків, в т.ч. ферментів, в результаті загартування не завжди має самостійне фізіологічне значення, оскільки температура, за якої білки зберігають функціональну активність, як правило, вища від реальної температури існування видів. В той же час підвищення термостабільності ферментів може бути відображенням змін їх конформаційної гнучкості, що розглядається як механізм адаптації функціонування каталітичних систем за високих температур (Александров, 1985). Зниження конформаційної гнучкості білків призводить до збільшення їх стійкості не лише до нагріву, але і до інших агентів, дія яких залежить від міцності системи слабких зв'язків, що підтримують просторову структуру макромолекул. Так, теплове загартування підвищувало стійкість ферментів до гідролітичного розщеплення протеазами, до крайніх значень рН (Александров, Кислюк, 1994). Підвищення стабільності білків, очевидно, має значення для їх функціонування в умовах стресу, за яких можливе неспецифічне порушення клітинного гомеостазу.

Активация синтезу білків теплового шоку та їх функції. Як правило, під впливом високих температур на тлі загального зниження інтенсивності біосинтезу конститутивних білків спостерігається різка активация утворення білків теплового шоку (БТШ), котрі беруть участь у формуванні терморезистентності.

В останні десятиліття детально вивчений спектр БТШ багатьох вищих рослин. Залежно від молекулярної маси розрізняють БТШ 100, 90, 70, 60 кД і низькомолекулярні (так звані «малі») БТШ з масою 15-30 кД (Vierling, 1991). Встановлені часові рамки синтезу БТШ у відповідь на дію високотемпературного стресу. Найчастіше синтез БТШ починається через 15 хв після дії теплового шоку і триває 6-8 год, ймовірно, до моменту формування більш специфічних механізмів пристосування. Показано, що супресія синтезу БТШ може відбуватися під впливом самих БТШ.

Нині з'ясовані конкретні функції БТШ, пов'язані із забезпеченням здатності рослинного організму витримувати високі температури. Одна з найважливіших – шаперонна – полягає у попередженні агрегації частково денатурованих молекул інших

білків, полегшенні протеолітичної деградації необоротно пошкоджених білкових молекул, транспорті білків до лізосом і протеосом. Такі функції, зокрема, виконують БТШ 70. Їх дія є АТФ-залежною. Ймовірно, БТШ 70 можуть бути задіяні в процесах репарації після теплових пошкоджень.

Деякі БТШ задіяні в аутофагії необоротно пошкоджених білків. Класичним прикладом БТШ, що забезпечує аутофагію дефектних білків, є убіквітин. Приєднання його до N-кінця перетворює поліпептид на мішень для протеаз.

В управлінні процесом деградації білків бере участь БТШ 90, експресія якого посилюється під впливом різних стресорів, в т.ч. температурного. Він здатний зв'язуватися з денатурованими білками. Є підстави вважати, що БТШ 90 бере участь в зміні стану факторів регуляції транскрипції інших БТШ. В умовах теплового шоку відбувається зв'язування частини молекул БТШ 90 денатурованими молекулами білків, при цьому через дефіцит вільного БТШ 90 відбувається «розблокування» синтезу інших БТШ (Yamada et al., 2007).

Шляхом трансгенозу доведене значення БТШ 101 для забезпечення стійкості рослин арабідопсису до різкого (раптового) теплового стресу. Цей білок, ймовірно, причетний також до відновлення функцій рослин після теплового шоку.

Відомо, що багато представників БТШ виконують значну роль в захисті клітин від окиснювальних пошкоджень. Зокрема, такі функції виконують малі БТШ, які можуть локалізуватися в мітохондріях.

Низькомолекулярні протектори. Накопичення низькомолекулярних захисних сполук, які відрізняються поліфункціональністю, вважається одним з ключових механізмів адаптації до абіотичних стресорів різної природи, в т.ч. до теплового. До таких сполук належать розчинні вуглеводи, вільні амінокислоти (зокрема, пролін), бетаїни, поліаміни. Особливе значення ці сполуки як осмоліти мають при дії стресорів, які спричиняють зневоднення рослинних клітин – посуха, засолення середовища. Проте функції низькомолекулярних сполук не обмежуються осмопротекторною дією.

Так, показана здатність цукрів підвищувати стабільність біомембран шляхом формування слабких зв'язків з кисневими атомами фосфатів фосфоліпідів. Доведено, що практично всі розчинні вуглеводи можуть виявляти антиоксидантні ефекти

(Дерябин и др., 2007; Hare et al., 1998). Продemonстровано, що трансгенні рослини з штучно підвищеною здатністю синтезувати трегалозу, фруктозу або манніт відрізнялися вищою теплостійкістю (Hare et al., 1998).

Пролін, вміст якого в рослинах за дії стресорів може збільшуватися у кілька разів, розглядається не тільки як осмопротектор, але і як сполука, що захищає білково-ліпідні комплекси, в т.ч. за рахунок знешкодження гідроксильних радикалів та інших активних форм кисню, що пошкоджують біомембрани (Saradhi et al., 1995). Показано збільшення вмісту проліну в рослинах за дії агентів окиснювального стресу, продемонстрована здатність екзогенного проліну підвищувати теплостійкість рослинних тканин.

Важливим протектором за дії теплового стресу вважається також гліцинбетаїн. В експериментах *in vitro* показана його здатність захищати деякі ферменти і білкові комплекси від денатурації. Гліцинбетаїн також бере участь в підтриманні окиснювально-відновного потенціалу рослинних клітин за дії гіпертермії.

Останнім часом як ефективні модулятори окислювально-відновної рівноваги розглядаються і поліаміни. Вони можуть здійснювати як безпосереднє «гасіння» активних форм кисню, так і брати участь в індукції синтезу ферментів антиоксидантного захисту (Oztruk, Demir, 2003; Аронова и др., 2005).

Накопичення низькомолекулярних протекторів відбувається як за рахунок активації ферментів, що забезпечують їх синтез, так і внаслідок активації катаболічного потоку. Так, збільшення кількості розчинних вуглеводів і багатьох вільних амінокислот може відбуватися в результаті активації гідролітичних ферментів (інвертази, амілази, деяких протеаз). Ці ферменти можуть бути пов'язані із специфічними білками-інгібіторами. За дії стресорів комплекс «фермент – білок-інгібітор» може руйнуватися, за рахунок чого можливе підвищення активності ферментів без участі белоксинтезуючого апарату (Вовчук и др., 1994; Колупаев, Трунова, 1992, Колупаев, 1995). Такий механізм забезпечує досить швидке накопичення протекторних речовин. В той же час значне збільшення кількості протекторів (наприклад, проліну), ймовірно, відбувається синтетичним шляхом (Кузнецов, Шевякова, 1999).

В активації процесів накопичення низькомолекулярних протекторів, очевидно, беруть участь різні сигнальні молекули, зокрема, АФК, а також комплекс стресових фітогормонів і

гормоноподібних сполук (в першу чергу абсцизова і саліцилова кислоти). Так, названі посередники задіяні в регуляції синтезу проліну (Hare et al., 1999).

Зміни складу біомембран. Гіпертермія підвищує кінетичну енергію і рух молекул упоперек мембран, послаблюючи таким чином міжмолекулярні і внутрішньомолекулярні хімічні зв'язки в сполуках, які входять до складу біомембран (Wahid et al., 2007). При потенційно летальному нагріві можливе руйнування четвертинної і третинної структур мембранних білків.

Інший механізм зміни складу і функціонального стану біомембран є вторинним і пов'язаний з пероксидним окисненням ліпідів. Процес пероксидації ліпідів може бути ферментативним і неферментативним. Перший зумовлений активацією ліпоксигеназ. В ході ліпоксигеназного каскаду утворюються різні оксигеновані похідні ліпідів – оксиліпіни. Як уже зазначалося, можуть виконувати сигнально-регуляторні функції, зокрема, активувати деякі захисні реакції клітин.

Одним з важливих адаптивних механізмів може бути зміна жирнокислотного складу біомембран. Так, показано значне збільшення вмісту насичених жирних кислот у рослин арабідопсису, вирощуваних за підвищеної температури (Somerville, Browse, 1991). Правда, подібні зміни вдається зареєструвати не на всіх об'єктах. Можна припустити, що адаптивні зміни мембран спрямовані, з одного боку, на підтримання гомеостазу, а з іншого – на забезпечення передачі стресового сигналу. Цей шлях пов'язаний з модифікацією мембранозв'язаних стартових ферментів сигнальних систем (Тарчевский, 2002).

Таким чином, високотемпературне загартування рослин насамперед характеризується комплексом процесів, спрямованих на забезпечення підтримання білково-ліпідних комплексів у функціональному стані за дії високих температур.

Способи підвищення жаростійкості рослин в експерименті і практиці

Як уже зазначалося, теплостійкість рослин може підвищуватися після дії високих температур (ефект загартування). Прийом підвищення жаростійкості дією гіпертермії на активно вегетуючі рослини використовується в лабораторній практиці, але він навряд чи може бути реалізований у виробничих умовах. Вже тривалий час для

практичного застосування пропонуються інші впливи, що до певної міри імітують загартування. Одним з них є передпосівне загартування набубнявілого насіння (Генкель, 1982). Набубнявіле насіння витримують протягом 24 або 48 год у намоченому стані, а потім підсушують на повітрі або сушарках до повітряно-сухого стану. Така «посуха» перед посівом підвищує не лише посухостійкість, а й жаростійкість та солестійкість (ефект крос-толерантності).

Інший прийом підвищення жаростійкості зернових (пшениці, проса) полягає у передпосівній обробці 25 мМ розчином хлориду кальцію (Генкель, 1982). Ефект такого прийому автор пояснював впливом солей кальцію на стан цитоплазми (підвищення в'язкості). Сучасні дослідження дають підстави припускати можливість індукування кальцієм як вторинним месенджером сигнальних мереж і відповідно активації генів, що забезпечують захисні реакції (синтез стресових білків, низькомолекулярних протекторів, активація антиоксидантних ферментів).

Як прийом пов'язаний з індукуванням експресії генів, що забезпечують захисні реакції, можна розглядати і дію саліцилової кислоти, яку пропонується використовувати для підвищення осмо- і жаростійкості рослин (Шакирова, 2001; Колупаєв, Акініна, 2005). Для практичних цілей може бути використане кількагодинне намочування насіння злаків в 0,05 М розчині саліцилової кислоти. Вважають, що ефекти саліцилової кислоти пов'язані з її здатністю спричинювати окиснювальний стрес за рахунок інгібування каталази і активації НАДФН-оксидази та форм пероксидази, що генерують активні форми кисню. Нині створюються регулятори росту зі здатністю підвищувати стійкість рослин. В основі багатьох з них такі відомі стимулятори стійкості, як саліцилова і янтарна кислоти (Тарчевский, 2002).

Методи оцінки жаростійкості рослин

Теплостійкість рослин може бути визначена прямими методами – шляхом ушкоджуючого нагріву у водному або повітряному термостаті і оцінки подальшого виживаності рослин. У разі прогріву інтактних рослин у повітряному термостаті можна оцінити стійкість, що виявляється на рівні цілого рослинного організму. Прямий тестуючий прогрів та оцінка подальшої життєздатності рослин за їх виживаністю і ростом дає змогу отримати відомості про інтегральну (загальну) стійкість.

Первинна теплостійкість може бути визначена за коагуляцією протоплазми клітин одразу після прогріву. Для цього часто використовуються висічки листків рослин (Титов и др., 2006).

Поряд з прямими методами оцінки теплостійкості, використовуються непрямі, котрі також вирізняються високою інформативністю. Одним з таких показників є стан мембран. Для його оцінки використовують вихід електролітів з тканин. Оскільки термостабільність мембран є ознакою, що добре успадковується, вона може використовуватися в селекції (Применение..., 2007). Іншим різновидом оцінки стану мембран є їх оцінка за проникністю через них кислот (метод Ф.П. Мацкова). Він може бути використаний лише для оцінки теплостійкості хлорофіловмісних частин рослин (як правило, листків). Суть методу зводиться до прогріву зразків листків у водному термостаті за певних температур і наступного їх занурення на деякий час у розчин мінеральної кислоти (частіше HCl) певної концентрації. Місця пошкоджень під впливом кислоти набувають бурого кольору через перетворення хлорофілу на феофітин. Неушкоджені мембрани непроникні (малопроникні) для кислоти, тому живі листки зберігають зелене забарвлення.

Для тестування теплостійкості також може бути використана оцінка термостабільності та ізоферментного спектра деяких ферментів, зокрема, пероксидаз. На прикладі томатів і ряду інших овочевих рослин встановлено, що жаростійкі сорти відрізнялися підвищеною термостабільністю цього ферменту (Ивакин, Грушин, 1986). Виявлені і відмінності в ізоферментному спектрі пероксидаз сортів пшениці різних екотипів (Обозный и др., 2010). Так, загартувальний нагрів проростків сортів м'якої озимої пшениці степового екотипу (Одеська 267 і Херсонська 99), які відрізнялися високою теплостійкістю, спричиняв підвищення у них активності і термостабільності пероксидази, а також появу нових молекулярних форм ферменту. У сортів лісостепового (Національна) і лісового (Волинська 2, Саскіа) екотипів, які мали низьку теплостійкість, подібних змін активності, термостабільності та ізофериментного спектра пероксидази не спостерігалось.

Лекція 8

СТІЙКІСТЬ РОСЛИН ДО ЗНЕВОДНЕННЯ

Відомо, що приблизно третина суші, потенційно придатної для вирощування сільськогосподарських рослин, не може бути використана через нестачу води, а на решті території, особливо в посушливих і напівпосушливих районах, урожайність періодично істотно знижується через посуху. Через це пізнання механізмів посухостійкості рослин має важливе прикладне значення. Посухостійкість рослин – це комплексна властивість, яка складається з чисельних фізіолого-біохімічних і анатомо-морфологічних пристосувань і змінюється протягом онтогенезу рослин.

Водний режим рослин охоплює сукупність процесів поглинання, пересування, виділення і засвоєння води рослинним організмом. Поглинання води відбувається переважно в зоні корневих волосків, що утворюють значну вбирну поверхню. Процес залежить передусім від вологоємності і водоутримуючої здатності, температури і аерації ґрунту, а також від особливостей будови кореневої системи. Надходження і переміщення води в рослині здійснюються за градієнтом водного потенціалу. Незначна частина води, поглинута кореневою системою, витрачається в процесі метаболізму і росту клітин, переважна ж її частина (до 99 %) виділяється в атмосферу в процесі транспірації і гутації, що попереджає перегрівання рослини. Співвідношення кількості поглинутої і виділеної рослиною води визначає її водний баланс.

Функції води у рослині

Тканини рослин порівняно з тканинами тваринних організмів містять більшу кількість води (80-90 % сирої маси і більше). Її функції різноманітні:

- вода виконує трофічну функцію, разом з нею в рослині надходить переважна більшість елементів мінерального живлення. При цьому вода складає основне внутрішнє середовище організму. Полярність молекул води зумовлює кращу порівняно з іншими рідинами її здатність розчиняти речовини. Розчинення кристалів

неорганічних солей здійснюється завдяки гідратації іонів, що входять до їх складу. У воді також добре розчиняються відносно полярні органічні сполуки, що мають карбоксильні, гідроксильні, карбонільні та інші групи, з якими вона утворює водневі зв'язки;

- вода бере участь в транспорті речовин судинами ксилеми і ситовидними трубками флоєми, а також при переміщенні речовин по симпласту і апопласту;

- вода входить до складу білкових молекул і ліпопротеїдів, визначаючи їх конформацію; втрата води такими молекулами призводить до порушення їх нативного стану і до втрати ними функціональних властивостей;

- вода є реагентом у найважливіших біохімічних процесах: виступає у ролі донора електронів в процесах фотосинтезу, бере участь в процесі дихання, гідролізі органічних сполук;

- завдяки незначній в'язкості вода виконує функції амортизатора при механічних пошкодженнях;

- висока теплоємність і велика питома теплота пароутворення дозволяють воді стабілізувати температуру в процесах транспірації, попереджаючи перегрів рослинного організму.

За характером регулювання водного режиму рослини поділяють на пойкилогідридні та гомогідридні. У перших кількість води в організмі повністю залежить від умов навколишнього середовища. До них належать наземні водорості, лишайники, мохи, тропічні папороті, з вищих рослин – пустельна осока. У них відсутні анатомічні пристосування для регулювання водного режиму, у тому числі продихи. Організми цих видів можуть висихати до повітряно-сухого стану, а за умов достатньої вологості – знову оживати і ставати зеленими. Гомогідридні рослини, навпаки, мають сталий водний баланс за будь-яких погодних умов і можуть його регулювати (Большакова, Мусатенко, 2010).

Відповідно до водного режиму екотопу (сукупності умов місцезростання) виділяють *гігрофіти*, *мезофіти* і *ксерофіти*. Гігрофіти характеризуються низькою посухостійкістю, у них завжди відкриті продихи, які у значній кількості розташовані на листках з обох боків. Вони мають розвинену аеренхіму. Втрата 15-20% води для гігрофітів може бути згубною. Мезофітам властива дуже висока пластичність пристосування до ступеня зволоження у середловищі. Вони можуть існувати поряд як з гігро-, так і ксерофітами. Ксерофіти

взагалі не витримують сильної вологонасиченості, але добре пристосовуються до сухого, спекотного клімату. Це рослини – представники пустель, саван, посушливих гірських схилів.

Ксерофіти, як правило, мають підвищений осмотичний тиск клітинного соку, що дозволяє їм поглинати воду навіть у разі значної водовід'ємної сили ґрунту, тобто використовувати не тільки легкодоступну, а й важкодоступну ґрунтову вологу. Значення осмотичного тиску деяких пустельних чагарників іноді надзвичайно високі – 10000-30000 кПа (Большакова, Мусатенко, 2010).

На півночі подібну до ксерофітів будову мають психрофіти, які зростають у холодних і вологих місцях, а також кріофіти, що ростуть у сухих холодних умовах (Большакова, Мусатенко, 2010).

Причини пошкодження рослин при зневодненні і механізми адаптації до зневоднення

Рослини зазнають водного дефіциту, коли швидкість транспірації перевищує швидкість поглинання води кореневою системою. Така ситуація можлива не лише при посусі, а й в умовах ґрунтового засолення, а також за низьких температур. У двох останніх випадках дегідратація є компонентом стресів неводної природи і розвивається у рослинах, коли кількість води в ґрунті може бути необмеженою, однак ця вода недоступна для рослин. Наприклад, при ґрунтовому засоленні вода не поглинається кореневою системою через високий осмотичний тиск (низький водний потенціал) ґрунтового розчину.

На клітинному рівні водний дефіцит виявляється у втраті тургору. Зниження вмісту води в клітинах при водному дефіциті і збільшення концентрації іонів в цитоплазмі, яким супроводжується зневоднення, спричиняє порушення в структурі і функціях біополімерів, передусім білків та білково-ліпідних мембранних комплексів. Деструктивні зміни в мембранах призводять до порушення внутрішньоклітинної компартментації речовин.

На рівні цілої рослини водний дефіцит виявляється в оберненні градієнта водного потенціалу в системі ґрунт – корінь – пагін та інгібуванні росту.

Розвиток стійкості може бути результатом індукції механізмів резистентності або ж механізмів уникнення водного стресу.

Більшість культурних рослин є мезофітами. Реакція мезофітів на посуху має двофазний характер. На першій фазі за дії нетривалої

посухи відбувається зниження в'язкості цитоплазми, ряд функцій може інтенсифікуватися на фоні уповільнених ростових процесів. Ці зміни, ймовірно, пов'язані з адаптаційною перебудовою метаболізму та структури протопласта, що сприяє виживанню за стресових умов. З початком другої фази порушуються ріст, процеси трансформації енергії у фізіологічних реакціях. Має місце деструктивний розпад біополімерів і окиснення важливих біологічно активних сполук, знижується енергетична ефективність дихання.

Роль абсцизової кислоти (АБК) в адаптації рослин до посухи. Накопичення АБК у рослин відбувається за дії стресорів різної природи і розглядається як універсальна неспецифічна реакція, що дозволяє «пережити» дію екстремальних факторів з найменшими втратами (Шакирова, 2001). Як уже зазначалося, одним з основних ефектів АБК на клітинному рівні є її вплив на інтенсивність біосинтезу білка. Він пов'язаний з частковим інгібуванням транскрипції і впливом на посттранскрипційні процеси (процесинг мРНК і трансляцію). Результатом дії АБК є пригнічення синтезу більшості конститутивних білків та індукція синтезу стресових білків.

Водночас за умов впливу водного стресу АБК виконує *специфічну* функцію, пов'язану із закриванням замикаючих клітин продихів. Припускають, що сигналом для посиленого утворення АБК є втрата тургору. Вона може сприйматися гіпотетичним осмосенсором або мембраною в цілому, яка зазнає конфірмаційних змін внаслідок зневоднення.

Показано, що водний стрес прямо або опосередковано впливає на мембранозв'язану фосфоліпазу С – стартовий фермент кальцієвої сигнальної системи. При гідролізі фосфоліпазою С мембранних фосфоліпідів утворюється інозитол-1,4,5-трифосфат (ІФ₃), який спричиняє відкриття кальцієвих каналів. Підвищення концентрації цитозольного кальцію призводить до збільшення активності протеїнкіназ, які фосфорилують білки – фактори регуляції транскрипції. Це викликає активацію експресії генів ферментів синтезу АБК.

Місцем синтезу АБК може бути цитоплазма, але у значних кількостях вона виявляється в хлоропластах клітин мезофілу.

За умов посухи АБК з хлоропластів переміщується з клітин мезофілу в епідерміс до замикаючих клітин продихів, спричиняючи

їх закривання. Питання щодо синтезу АБК самими клітинами продихів залишається дискусійним (Мусієнко, 2006).

АБК зв'язується із специфічними мембранними рецепторами, природа яких дотепер точно не встановлена. Ефекти АБК реалізуються через ряд вторинних месенджерів. Зокрема, під впливом АБК відбувається збільшення змісту пероксиду водню, яке є елементом реакцій, необхідних для індукції закриття продихів. Накопичення пероксиду водню зумовлене здатністю АБК підвищувати активність НАДФН-оксидази. Припускають, що підвищення активності НАДФН-оксидази під дією АБК опосередковане зміною активності протеїнкінази OST1. Підвищення вмісту АФК (перш за все, пероксиду водню) приводить до відкриття кальцієвих каналів. При збільшенні концентрації цитозольного кальцію відбувається відкриття аніон/ K^+ -каналів, які транспортують калій на зовнішній бік мембран замикаючих кліток, що і спричиняє закриття продихів.

Разом з АФК, у реалізації впливу АБК на стан продихів бере участь NO-синтазна сигнальна система. З іншого боку, показано, що оксид азоту може брати участь в індукції синтезу АБК.

Обов'язковими ланками в реалізації впливу АБК на експресію генів, що забезпечують захисні реакції, є зміна активності протеїнкіназ і протеїнфосфатаз. Ключовою протеїнкіназою, залученою в сигналінг АБК у арабідопсиса є протеїнкіназа OST1 (OST – Open Stomata 1). Ця протеїнкіназа належить до групи протеїнкіназ, здатних фосфорилувати залишки серину і треоніну в так званих С-субдоменах, що містяться в молекулах транскрипт-факторів b-ZIP (b-ZIP – Basic-Leucine Zipper), що необхідно для їх з'єднання з промотором-мішенню (Новикова и др., 2009). За допомогою такого механізму відбувається індукція експресії АБК-залежних генів, зокрема тих, які причетні до регулювання рухів продихів.

Якщо протеїнкінази розглядаються як позитивні регулятори дії АБК, то протеїнфосфатази вважаються негативними регуляторами дії цього фітогормону. На прикладі рослин арабідопсису показано, що одна з протеїнфосфатаз серин-треонінового типу PP2A негативно регулює передачу сигналу АБК. Після обробки рослин АБК активність цього ферменту швидко (вже через 10 хв.) знижувалася, збільшення ж тривалості експонування з гормоном приводило до підвищення вмісту мРНК PP2A і активності ферменту (Pernas et al.,

2007). Активація експресії гена PP2A дією АБК може бути механізмом повернення клітин до початкового стану і відновлення їх чутливості до даного фітогормону.

Значення низькомолекулярних сполук в адаптації рослин до посухи. Важливими захисними реакціями рослин на дію осмотичного стресу є накопичення ряду низькомолекулярних сполук: розчинних вуглеводів, вільних амінокислот (передусім проліну), бетаїнів і поліамінів. Ці сполуки можуть утворюватися як за рахунок індукованого стресором їх синтезу, так і внаслідок гідролізу відповідних біополімерів. В індукуванні утворення цих сполук задіяні внутрішньоклітинні посередники (зокрема, активні форми кисню та іони кальцію) і стресові фітогормони (передусім АБК).

Розчинні вуглеводи (насамперед сахароза) є важливими осмопротекторами, що роблять внесок у підвищення осмотичного тиску клітин. Їх накопичення забезпечує внутрішню регуляцію осмотичного потенціалу і зумовлює збільшення поглинання води коренями. Але це не єдина їх фізіологічна функція. Однією з важливих функцій вуглеводів, накопичуваних при стресах, є їх антиденатураційна дія на білково-ліпідні компоненти клітин, які зазнають дегідратації (Колупаєв, Трунова, 1992). Показано, зокрема, що сахароза може замінювати воду в структурі фосфоліпідів при стресових впливах, які спричиняють зневоднення клітин (Caffery et al., 1988).

Надзвичайно важливим поліфункціональним протектором також є пролін. Синтез проліну двома різними метаболічними шляхами – глутаматним і орнітиновим. Ферменти першого з них локалізовані в цитоплазмі, другого – в мітохондріях (Кузнецов, Шевякова, 1999). Накопичення проліну у рослинах у відповідь на дію стрес-факторів є досить швидкою реакцією. При цьому на першому етапі адаптаційного процесу не досягається максимальна внутрішньоклітинна концентрація проліну. Вважають, що на початкових стадіях пролін діє не як осморегулятор, а як протекторна сполука. При цьому пролін розглядається і як учасник стресової реакції (неспецифічних механізмів стійкості), і як важливий фактор спеціалізованої адаптації до стресорів, що спричиняють зневоднення клітин (Кузнецов, Шевякова, 1999).

Протекторні властивості проліну пов'язані з його впливом на макромолекули і біомембрани. Такі ефекти проліну відтворені в експериментах *in vitro*. Вважають, що пролін стабілізує гідратаційну

оболонку білків. При цьому дана амінокислота поєднує в собі певний баланс гідрофільності і гідрофобності і може зв'язуватися з поверхневими гідрофобними залишками білків.

Пролін разом з іншими вільними амінокислотами розглядається як компонент системи клітинного рН-стата, джерело енергії і запасного азоту. Також нині пролін розглядається як один з низькомолекулярних антиоксидантів.

До захисних сполук належать і бетаїни, які є четвертинними сполуками амонію. Найпоширенішим представником бетаїнів є гліцинбетаїн. Осмотичний стрес індукує експресію генів, що кодують ферменти, задіяні в синтезу бетаїнів. Бетаїни виконують функції як осмолітів, так і протекторів, що захищають білки від денатурації. Зокрема, захисну роль гліцинбетаїну пов'язують зі стабілізацією роботи фотосинтетичного апарату у несприятливих умовах. Зокрема, показано, що гліцинбетаїн більш ефективний порівняно з іншими низькомолекулярними сполуками азоту у захисті рибулозодифосфаткарбоксилази і кисень-виділювального центру фотосистеми II (Sakamoto, Murata, 2002).

Для різних видів рослин характерна стресіндукована акумуляція поліамінів. Механізми захисної дії поліамінів різноманітні. Так, є відомості про їх здатність стабілізувати клітинні мембрани, нуклеїнові кислоти, а також інгібувати протеази.

Значення накопичення поліамінів в умовах дії абіотичних стресорів підтверджується у ряді експериментів зі створення трансгенних рослин. Так, введення в геном рису гена аргиніндекарбоксилази вівса (одного з ключових ферментів синтезу поліамінів) спричиняло підвищення посухостійкості рису, правда, при цьому несприятливо впливало на ріст і розвиток рослин. Вдалішим виявилось використання цього трансгена під управлінням промотора, індукованого абсцизовою кислотою: в результаті синтез поліамінів в трансформантах активувався тільки за дії стресора. Це забезпечило підвищену стійкість рослин, а зниження біомаси в стресових умовах було виражене меншою мірою, ніж в контрольних рослинах (Титов и др., 2003).

Методи оцінки посухостійкості рослин і практичні прийоми з її підвищення

Відомо, що посухостійкість рослин пов'язана з високим відносним вмістом води і низькою відносною втратою води

ізолюваними листками. Саме ці показники часто використовують для порівняльної оцінки посухостійкості сортів різних сільськогосподарських культур (Araghi, Assad, 1998; Dhanda, Sethi, 1998). Інформативним показником стійкості також є проникність мембран після впливу посухи, яку визначають за виходом електролітів кондуктометричним методом.

Серед біохімічних показників посухостійкості рослин важливе діагностичне значення має вміст проліну. Як правило, посухостійкі форми рослин відрізняються більшим вмістом проліну та/або здатністю до його активного нагромадження за дії стресорів (Petcu, Terbea, 1995; Samaras et al., 1995). Водночас зв'язок між вмістом вільного проліну і стійкістю генотипів до водного стресу може бути неоднозначним. Частіше така неоднозначність пов'язана з тим, що у стійкіших сортів і форм стресова реакція (накопичення проліну) може спостерігатися за більш сильного навантаження, ніж у малостійких. З іншого боку, у нестійких рослин нагромадження проліну може індукуватися навіть незначним впливом посухи. Таким чином, при розробці тест-систем, що включають в себе використання вмісту проліну як маркера стійкості, необхідний коректний добір сили стресового навантаження. Крім того, необхідне врахування інших показників фізіологічного стану, зокрема, відносної втрати води рослиною після посухи.

Існує широкий спектр фізіологічно активних сполук, які використовуються з метою підвищення посухостійкості рослин. Часто ці ж сполуки дають змогу підвищити стійкість рослин до інших стресорів. Зокрема, для підвищення посухостійкості застосовуються картоліни – синтетичні препарати, дія яких схожа на ефекти екзогенних цитокінінів: вони мають здатність підвищувати активність РНК-полімераза, і, як наслідок, вміст білка в рослинах, посилювати синтез хлорофілу. Вже протягом тривалого часу у вітчизняному рослинництві використовується полістимулін К, що являє собою полімерну форму бензиламінопурина (цитокініну). У цьому препараті біологічно активна речовина зв'язана гідролітично лабільним зв'язком з нейтральним полімером-носієм. Препарати цитокінінового типу сприяють відновленню ростових процесів після припинення дії стресорів, у т.ч. посухи. Припускають, що цитокінінові препарати сприяють надходженню води і розчинних речовин до ростучих органів.

Так, вітчизняними вченими (Шматько и др., 1989) показано, що полістимулін К посилює процеси відновлення фізіологічних функцій і адаптаційну здатність фотосинтетичного апарату культурних рослин (зокрема, озимої пшениці і картоплі) до ушкоджуючої дії ґрунтової посухи.

Останніми роками для підвищення посухостійкості також пропонується використовувати препарати івін і метіур, синтезовані в Інституті біоорганічної хімії і нафтохімії НАН України.

Підвищенню посухостійкості пшениці сприяє її передпосівна обробка саліциловою кислотою (Шакирова, 2001), котра, як уже зазначалося, є одним із важливих учасників сигнальної трансдукції в рослинних клітинах і природним індуктором стійкості рослин до різноманітних стресорів.

В цілому існує досить широкий спектр фізіологічно активних сполук адаптогенів як природних, так і синтетичних, що можуть використовуватися у практиці рослинництва. Водночас доцільність їх застосування залежить від витрат на їх собівартість і додаткову обробку рослин.

Лекція 9

СОЛЕСТІЙКІСТЬ РОСЛИН

Засолення ґрунтів належить до абіотичних факторів, що чинять істотний несприятливий вплив на рослини. За даними ФАО (FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations), приблизно 22% земель, які перебувають в сільськогосподарському користуванні, є засоленими, і щороку їх площі збільшуються через застосування зрошення і добрив, а також внаслідок глобального посилення аридності клімату. Згідно з прогнозом, до 2030 року 30% земель можуть стати непридатними для сільськогосподарського використання внаслідок засолення. Проблема солестійкості рослин надзвичайно актуальна і для України, оскільки більшість зрошувальних земель, особливо на півдні країни, зазнають засолення. Навіть після меліорації ґрунтів на них мають вирощуватися стійкі до засолення сорти. Все це зумовлює необхідність вивчення механізмів ушкоджуючого впливу засолення і вдосконалення способів підвищення солестійкості рослин.

Дикорослі і культурні рослини на вплив солей реагують неоднаково. Рослини, які можуть розвиватися за високих концентрацій солей в ґрунті (понад 300 мМ), називають галофітами. Їх пристосування до життя на засолених ґрунтах відбувається різними шляхами, відповідно виділяють три групи галофітів.

До першої групи належать евгалофіти, або справжні галофіти (наприклад, солерос – *Salkornia herbacea*), які здатні накопичувати в тканинах велику кількість солей за рахунок депонування їх у вакуолях. Саме тому вони розвивають високий осмотичний потенціал, значну всисну силу, завдяки чому мають здатність поглинати воду із засолених ґрунтів.

Друга група – криногалофіти, або солевидільні галофіти (наприклад, тамарикс – *Tamarix speciosa*). Поглинуті солі вони виділяють особливими солевидільними залозами, кількість яких зростає з підвищенням засолення ґрунтів. Для солевидільних галофітів характерна несуккулентна організація, вони мають високу інтенсивність транспірації.

Третю групу складають глікогалофіти – соленепроникні галофіти (наприклад, полин – *Artemisia salina*), клітини яких підтримують високий осмотичний потенціал за рахунок органічних осмотично активних сполук.

Більшість культурних рослин не є солестійкими. Із зернових найвищу солестійкість має сорго, підвищена вона у бавовника, соняшника, кавуна. Водночас серед культурних рослин немає галофітів – рослин, які краще ростуть при засоленні, ніж за його відсутності.

Причини ушкоджуючого впливу солей на рослини

Підвищення концентрації солей у ґрунтовому розчині пригнічує життєві функції рослин ще до того, як іони надходять в рослини. Це пов'язане зі зниженням осмотичного потенціалу розчину і зменшенням доступності води (осмотичний компонент у дії засолення). Другий (токсичний) компонент пов'язаний з проникненням солей у цитоплазму клітин. Більшість рослин не здатна витримувати присутність в цитоплазмі іонів натрію в концентрації вище 100 мМ (Веселов и др., 2007). Токсичний вплив іонів натрію пов'язують передусім з тим, що вони конкурують з іонами калію, які необхідні для фотосинтезу, синтезу білка та інших ключових процесів життєдіяльності рослин. Підвищений вміст іонів хлору також чинить токсичну дію. Тому природно, що ефекти засолення вивчаються переважно на прикладі дії на рослини хлориду натрію.

Токсична дія солей на рослини помітна не одразу. Однак рано чи пізно токсичність іонів виявляється у вигляді некротичних плям. Причиною їх появи є перевищення ємності вакуолі для токсичних іонів, їх накопичення в цитоплазмі і хлоропластах і зниження концентрації іонів калію, необхідного для підтримання синтезу білка і фотосинтезу. Через це можливий розвиток різноманітних вторинних пошкоджень. Зокрема, внаслідок порушення фотосинтезу відбувається утворення активних форм кисню, що призводить до порушення цілісності мембран, структури хлоропластів, руйнування хлорофілу. Як зазначалося, окиснювальний стрес (підвищення вмісту активних форм кисню) є неспецифічною ознакою впливу на рослини й інших стрес-факторів.

Механізми адаптації глікофітів до засолення

Адаптація до засолення залежить передусім від здатності рослин підтримувати іонний гомеостаз і накопичувати різноманітні протекторні речовини, що підвищують інтенсивність поглинання води із засоленого середовища і зменшують негативний вплив солей та нестачі води на біомакромолекули і обмін речовин в цілому.

Механізми підтримання іонного гомеостазу за дії засолення. Іони натрію, як і будь-які інші іони, не можуть проникати безпосередньо через ліпідний бішар. Їх транспорт здійснюється лише через іонні канали та/або переносники. У мембранах рослинних клітин, на відміну від тваринних, Na^+ -селективні канали не знайдені. Проте в плазмалемі клітин коренів виявлений ряд іон-транспортуючих структур, здатних здійснювати перенесення натрію в клітину. Ряд дослідників відводять основну роль неселективним іонним каналам, що мають відносно низьку K^+/Na^+ -селективність і здатні пропускати багато іонів. Провідність даних каналів не залежить від змін трансмембранного електричного потенціалу. Відомо, що іони Ca^{2+} , конкуруючи з іонами Na^+ , можуть блокувати такі канали і знижувати тим самим поглинання іонів натрію коренями.

Поряд з накопиченням у рослинах іонів натрію порушення іонного гомеостазу при засоленні відбувається внаслідок зниження концентрації іонів калію в рослинах. Зазвичай у середовищі іони калію і натрію присутні приблизно в однаковій концентрації. Однак завдяки високій активності і селективності калієвих каналів концентрація іонів калію на кілька порядків перевищує концентрацію іонів натрію в цитоплазмі клітин рослин, що необхідно для нормального перебігу багатьох фізіологічних процесів. Водночас засолення створює проблеми з поглинанням калію з розчинів з його низькою концентрацією. Ряд дослідників вважає, що саме дисбаланс між концентрацією іонів калію і натрію, а не накопичення іонів натрію як таке призводить до негативного впливу засолення на рослини (Веселов и др., 2007). У транспорті іонів натрію можуть брати участь активні високоафінні переносники іонів калію, роль яких зростає за низьких концентрацій цього іона в середовищі. Вони здатні відігравати роль низькоафінних натрієвих каналів і пропускати через мембрану іони натрію у разі їх високої концентрації в середовищі. Кодуючі їх гени (НАК 1) ідентифіковані у рослин ячменю, а їх експресія у мутантів дріжджів з порушеним транспортом

калію показала здатність кодованих ними білків виступати у ролі високоафінних переносників калію і низькоафінних переносників натрію (тобто через них іони K^+ надходять з мікромолярних розчинів, а іони Na^+ – лише з мілімолярних) (Santa-Maria et al., 1997). Отже, підвищення чутливості рослин до засолення на фоні низького вмісту іонів калію у поживному середовищі можна пояснити як збільшенням здатності клітин поглинати токсичні іони натрію за допомогою даних переносників, так і конкурентним інгібуванням високими концентраціями натрію надходження калію.

При засоленні ґрунту хлоридом натрію в клітини рослин надходять також аніони Cl^- . У мембранах рослинних клітин виявлено кілька типів каналів з аніонною проникністю. На молекулярно-генетичному рівні аніонні канали ідентифіковані за їх гомологією з Cl^- -каналами тваринних клітин у рослин арабідопсису, картоплі і тютюну, однак локалізація, функціональні характеристики і фізіологічна роль таких каналів мало досліджені. Досі однозначно не встановлено, який саме тип аніонних каналів забезпечує трансмембранне перенесення хлору.

За високої зовнішньої концентрації хлориду натрію швидка дифузія Na^+ через відповідні катіонні канали спричиняє деяку деполаризацію плазматичної мембрани, що сприяє надходженню аніонів хлору в клітини кореня за градієнтом електрохімічного потенціалу через аніонні канали. Надалі, після досягнення певного нового стаціонарного стану і реполаризації плазмалеми (результат первинного надходження Cl^-), хлорид-аніон може транспортуватися в клітини проти градієнта електрохімічного потенціалу за допомогою H^+ , Cl^- -симпотрера. Необхідний трансмембранний градієнт електрохімічного потенціалу протонів генерується H^+ -АТФазою плазмалеми клітин кореня. Експорт хлорид-аніонів з цитоплазми спрямований або у вакуолю, або у зовнішнє середовище. Цей процес відбувається за участю аніонних каналів плазмалеми і/або тонопласту (Веселов и др., 2007).

Первинними сенсорами, що реагують на зміни концентрації $NaCl$ у зовнішньому середовищі і цитоплазмі, нині вважаються мембранні системи, що експортують натрій з цитоплазми. Активація таких сенсорів відбувається за участю кальцію, хоча механізм процесу залишається розкритим не повністю. Вважають, що кальцій, котрий з'являється в цитоплазмі при дії засолення, сприймається специфічним компонентом так званої системи SOS – salt over

sensitive, назва якої пов'язана з тим, що порушення її функціонування у мутантів арабідопсису призводить до підвищення чутливості рослин до засолення. Каскад SOS належить до такого типу систем, в якому сенсор зовнішнього стимулу просторово відокремлений від самого каналу. Один з компонентів системи SOS – цитозольний білок SOS3 (кальцийнейрин) є Ca^{2+} , кальмодулінзалежною протеїнфосфатазою, що складається з каталітичної (CnA) і регуляторної (CnB) субодиниць і має три EF-руки. Його повна активація відбувається у разі утворення Ca-CnB- і Ca^{2+} -кальмодулінових комплексів. Після того, як SOS3 утворив Ca^{2+} -кальмодуліновий комплекс, останній може в свою чергу активувати серин-треонінову протеїнкіназу SOS2. Вона активує SOS1 – переносник, що здійснює симпорт іонів натрію з клітин в обмін на протони. Встановлено, що трансгенні рослини арабідопсису з надекспресією генів *SOS*, відрізнялися підвищеною солестійкістю (Yang et al., 2009).

На виведення іонів натрію з клітин витрачається енергія, оскільки цитоплазма має негативний заряд, що створює електрохімічний градієнт для надходження катіонів всередину клітини і перешкоджає їх пасивному виходу з клітин.

Поряд з регуляцією надходження іонів в клітини, дієвим механізмом солестійкості є виведення токсичних фонів у вакуолю і депонування їх у цьому компартменті. У зв'язку з цим вважається, що переносники, локалізовані у тонопласті, відіграють важливу роль у солестійкості. Підвищена експресія гена вакуолярного Na^+/H^+ -антипортера підвищувала стійкість рослин арабідопсису до засолення (Веселов и др., 2007). Кодовані цим геном мембранні білки здійснюють перенесення іонів натрію проти градієнта електрохімічного потенціалу цього іона за рахунок енергії, що генерується H^+ -АТФазою тонопласту. Припускають, що накопичення іонів натрію у вакуолі дозволяє не лише звільнити цитоплазму від токсичних іонів, а й забезпечує осморегуляцію – дозволяє відновити градієнт осмотичного потенціалу між клітиною і засолим зовнішнім середовищем, що необхідно для підтримання тургору і росту клітин розтягуванням.

Таким чином, іонний гомеостаз рослинних клітин при засоленні регулюється за рахунок трьох основних механізмів (Веселов и др., 2007):

- зниження надходження іонів в клітини;

- підвищення активності виходу іонів з клітин через SOS1 канали;
- експорту іонів у вакуолю.

Накопичення осмотично активних і протекторних низькомолекулярних сполук. Реакцією-відповіддю рослин на дефіцит води є осморегуляція – накопичення осмотично активних речовин в клітинах, що дозволяє відновити між клітинами і навколишнім середовищем градієнт водного потенціалу, необхідний для підтримання надходження води в клітини. За умов засолення одним з найбільш «дешевих» осмотиків є сам хлорид натрію, а також інші мінеральні солі (Балнокин и др., 2005). Накопичення іонів у вакуолях може забезпечувати надходження води, необхідне для підтримання тургору і росту клітин розтягуванням. Так, на прикладі рослин ветивера (*Vetiveria zizanioides*) – злаку, що росте у тропічній і субтропічній Індії і відрізняється високою соле- і посухостійкістю, показано, що внесок неорганічних іонів в осмотичну регуляцію може складати 70-80% (Чжоу, Юй, 2009). Проте і солестійкі види нагромаджують солі переважно у вакуолях. Загальновідомо, що присутність високих концентрацій іонів натрію в цитоплазмі спричиняє негативний вплив на більшість білків і призводить до порушення ключових фізіологічних процесів. Тому в умовах засолення осморегуляція здійснюється переважно за рахунок накопичення органічних сполук (пролін, цукри, бетаїни тощо), а також за участю іонів калію.

Амінокислота пролін вважається одним із важливих протекторів за дії стресорів, що спричиняють зневоднення (див. лекцію 8), у т.ч. за дії на рослини засолення. Значення проліну як чинника, важливого для виживання за дії засолення, вдалося підтвердити в експериментах з трансгенними рослинами. Наприклад, рослини тютюну, які експресують ген ферменту, що каталізує синтез попередника проліну, Δ^1 -піролін-5-карбоксилатсинтази (П5КС) *Vigna aconitifolia*, накопичували в 10-18 разів більше проліну порівняно з контрольними рослинами і характеризувалися високою солестійкістю. Трансгенні рослини картоплі, трансформовані геном П5КС арабідопсису, характеризувалися підвищеним вмістом проліну і солестійкістю, тоді як у контрольних рослин в умовах засолення значно падала урожайність.

Нині пролін розглядається як один з низькомолекулярних антиоксидантів. Показано, що екзогенний пролін зменшував

інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів у культурі клітин тютюну в умовах сольового стресу (Sairam, Srivastava, 2000). Антиоксидантна дія проліну, ймовірно, пов'язана з його здатністю захищати білки і білково-ліпідні комплекси мембран шляхом інактивації гідроксильних радикалів та інших активних форм кисню.

Наскільки ймовірний механізм прямої інактивації вільних радикалів проліном в інтактних рослинах, поки що не ясно. Не виключено, що захисні ефекти проліну можуть бути пов'язані не тільки з його прямою антиоксидантною дією, але й значною мірою зі здатністю зменшувати осмотичні і токсичні ефекти сольового стресу. Водночас посилення накопичення проліну в рослинах під дією різноманітних потенційних агентів окиснювального стресу – ультрафіолету В, іонів кадмію і параквату – є непрямым свідченням його антиоксидантної ролі в рослинах.

Поряд з проліном важливим для солестійкості є гліцинбетаїн. На прикладі деяких видів показана кореляція між вмістом гліцинбетаїну і розвитком солестійкості. Так, гліцинбетаїн розглядається як достатньо надійний індикатор солетолерантності генотипів кукурудзи (Mansour et al., 2005). Екзогенний гліцинбетаїн підвищував солестійкість видів рослин, що не накопичують даний осмоліт (Sakamoto, Murata, 2002).

Значну роль при засоленні можуть відігравати і накопичувані рослинами розчинні вуглеводи. Особливе значення для розвитку солестійкості мають сахароза і фруктоза. Показаний позитивний вплив екзогенних цукрів на солестійкість рослинних тканин. Продемонстрована участь сахарози у захисті тилакоїдних мембран за умов сольового стресу.

У рослин рису при сольовому стресі крім сахарози збільшувався вміст дисахариду трегалози (Garcia et al., 1997). Припускають, що трегалоза стабілізує мембранні структури і окремі білки. В той же час у двох видів полину – *Artemisia lerchiana* і *A. pauciflora* – за дії підвищених концентрацій хлориду натрію відзначалося зниження сумарного вмісту сахарози і трегалози. При цьому в листках і коренях збільшувався вміст трисахариду рафінози (Орлова и др., 2009). Автори вважають, що рафіноза як одна з транспортних форм вуглеводів і притому більш інертна, ніж сахароза, при засоленні і посуші сприяє збереженню загального вуглеводного пулу в рослині і, перш за все, в коренях.

Оцінка солестійкості рослин і практичні прийоми з її підвищення

Як свідчить матеріал, викладений вище, солестійкість забезпечується за рахунок тонкої регуляції чисельних взаємопов'язаних механізмів, що значно ускладнює діагностику солестійкості рослин. Серед ознак солестійкості культурних рослин розглядаються такі, як здатність рослин до росту за умов засолення, підтримання низького вмісту іонів натрію і хлору в тканинах. Складність оцінки солестійкості рослин за їх ростовою реакцією на засолення полягає у тому, що токсичний ефект засолення на рівні цілих рослин виявляється, як правило, не раніше ніж через 10 днів після початку дії солей (Chen et al., 2005). Характерними ознаками токсичного впливу засолення є руйнування хлорофілу і поява некротичних плям.

Серед біохімічних показників солестійкості рослин становить інтерес вміст проліну і гліцинбетаїну. Нерідко солестійкі форми рослин відрізняються більшим вмістом проліну і гліцинбетаїну та/або здатністю до нагромадження цих сполук при засоленні, хоча вміст цих сполук є далеко не єдиним чинником, що зумовлює солестійкість рослин. Через це діагностування солестійкості рослин за вмістом низькомолекулярних органічних протекторів не завжди є успішним.

Для оцінки солестійкості нині широко використовують культуру клітин. Досить ефективною для отримання солестійких форм може бути клітинна селекція. Водночас солестійкість визначається не лише клітинними механізмами. Підвищення солестійкості транспіруючих інтактних рослин потребує тонкої вибіркової ткаанинноспецифічної регуляції експресії генів і активності значної кількості каналів і переносників (Веселов и др., 2005). Через це спроби отримати стійкі рослини шляхом відбору калусів на середовищі з високою концентрацією хлориду натрію або відбору нетранспіруючих проростків за здатністю насіння проростати на середовищі з високим вмістом солі не завжди виявляються результативними.

Одним із способів підвищення солестійкості рослин в експерименті є їх трансформація генами, що кодують ферменти, задіяні в синтезі або деградації проліну, гліцинбетаїну та інших низькомолекулярних протекторів. Так, показано, що пшениця, трансформована геном бетаїн-альдегіддегідрогенази – ферменту, що каталізує утворення гліцинбетаїну з альдегіду бетаїну, відрізняється здатністю до наднакопичення гліцинбетаїну і має високу солестійкість (Лян и др., 2009). Водночас спроби підвищувати

солестійкість рослин подібними прийомами трансгенозу поки що перебувають в основному на стадії наукових експериментів.

Для підвищення солестійкості, як і стійкості рослин до інших стресорів, використовують різноманітні регулятори росту. Зокрема, на рослинах кукурудзи показана ефективність таких вітчизняних препаратів, як івін і метіур (Палладіна, 2001).

Лекція 10

СТІЙКІСТЬ РОСЛИН ДО ДІЇ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

Важкі метали через їх цитотоксичну, мутагенну і канцерогенну дію вважають одними з найбільш небезпечних забруднювачів навколишнього середовища. Внаслідок антропогенної діяльності можуть порушуватися природні біогеохімічні цикли, що призводить до забруднення важкими металами усіх компонентів навколишнього середовища: ґрунтів, води, повітря. Термін «важкі метали» вживають щодо металів з густиною понад 5 г/см³, або з атомним номером понад 20. До дуже токсичних відносять такі хімічні елементи: Co, Ni, Cu, Zn, Sn, Se, Te, Rb, Ag, Cd, Au, Hg, Pb, Bi, Pt (Wood, 1974). Під цю категорію потрапляють і однозначно необхідні для живих організмів мікроелементи, наприклад, мідь і цинк. Зазвичай щодо них вживають термін «важкі метали», коли йдеться про вплив надлишкових кількостей цих елементів на живий організм.

Фітотоксичність важких металів залежить від їх хімічних властивостей: валентності, іонного радіуса, здатності до комплексоутворення. Оцінка токсичної дії металів на рослини дуже складна, оскільки вона залежить від великої кількості факторів, значення яких не можна порівняти в єдиній лінійній шкалі (Кабата-Пендиас, Пендиас, 1989). У більшості випадків елементи за ступенем токсичності розташовують у такий ряд: Cu > Ni > Cd > Zn > Pb > Hg > Fe > Mo > Mn (Гуральчук, 1994). Однак цей ряд може змінюватися у зв'язку з неоднаковим осадженням елементів ґрунтом і переходом їх у недоступний для рослин стан, фізіолого-генетичними особливостями самих рослин. Токсичність металів досить добре корелює з такими чинниками, як (1) електронегативність двовалентних іонів; (2) добуток розчинності сульфідів; (3) стійкість халатів; (4) біологічна доступність (Кабата-Пендиас, Пендиас, 1989).

Зазвичай найбільш доступними і токсичними для рослин є водорозчинні форми, що представлені, як правило, хлоридами, нітратами, сульфатами і органічними комплексними сполуками. Необхідно зазначити, що останні можуть бути як більш, так і менш токсичними порівняно з катіонами того ж елемента (Кабата-Пендиас,

Пендиас, 1989). Важкі метали досить швидко накопичуються і ґрунті і вкрай повільно виводяться з нього: період напіввидалення цинку становить близько 500 років, кадмію – до 1100 років, міді – до 1500 років, свинцю – до кількох тисяч років (Алексеев, 1987).

Механізми токсичної дії важких металів

Підвищені концентрації важких металів можуть призводити до загальних малоспецифічних фізіологічних змін, зокрема, інгібування фотосинтезу, змін водного балансу і гормонального статусу рослин, пригнічення росту. Такі ефекти є наслідком первинних токсичних ефектів. Водночас ці ефекти важко розмежувати з вторинними змінами практично всіх фізіологічних процесів.

Виділяють такі основні механізми токсичної дії важких металів:

- Зміна проникності клітинних мембран – Ag, Au, Cd, Cu, Hg, Pb та ін.
- Реакції тіольних (сульфгідрильних) груп білків з катіонами – Ag, Hg, Pb.
- Велика спорідненість до фосфатних груп і активних центрів в АТФ і АДФ, характерна для всіх важких металів.
- Конкуренція з життєво важливими іонами (передусім катіонами).

Вплив важких металів на біомембрани. Плазматична мембрана є першим бар'єром, який долають важкі метали при надходженні в клітину. У зв'язку з цим саме вона може бути первинною мішенню при їх дії на клітини. Одним з ефектів, який спричиняють важкі метали, є вихід калію з клітин. Вважають, що цей ефект не є наслідком загальної втрати цілісності мембран або зменшення кількості енергії, необхідної для роботи K^+/H^+ -помпи, а зумовлений прямою взаємодією іонів металів з поверхнею клітин з утворенням метал-сульфідних зв'язків (Cocucci, Morgutti, 1986).

Накопичуючись на поверхні протопластів, важкі метали спричиняють різноманітні порушення у будові і функціонуванні плазматичної мембрани, внаслідок чого їх надходження в клітини може збільшуватися за рахунок пасивного механізму. Ці зміни, поряд з інактивацією мембранних ферментів, можуть призводити до порушення іонного гомеостазу в клітинах (Серегин, Кожевникова, 2008).

Вплив важких металів на фотосинтез. Надлишок важких металів часто спричиняє хлороз листків. Зниження вмісту хлорофілу

у листках рослин може слугувати біоіндикаторною ознакою забруднення навколишнього середовища як важкими металами, так і іншими токсикантами. Зниження концентрації хлорофілу у рослин під впливом важких металів може бути наслідком інгібування процесів біосинтезу ферментів, або їх руйнування. Показано, що кадмій в концентрації 10-15 мкМ сильно інгібує синтез 5-амінолевулінової кислоти і активність її дегідратази у рослин квасолі, ймовірно, внаслідок реакції з SH-групами в активному центрі ферменту (Padmaja et al., 1990). Важкі метали можуть конкурувати із залізом за сайти зв'язування з макромолекулами, задіяними в процесі синтезу хлорофілу. У численних роботах показано, що важкі метали можуть опосередковано спричиняти деградацію хлорофілу, індукуючи пероксидне окиснення ліпідів.

Зменшення вмісту хлорофілу може бути однією з причин пригнічення фотосинтезу за дії важких металів. Водночас зменшення фіксації CO₂ рослинами під впливом важких металів може бути пов'язане з іншими причинами, такими, як закриття продихів, дефіцит АТФ, необхідного для регенерації акцептора CO₂ – рибулозодифосфату. Поряд із цим можливе інгібування важкими металами (наприклад, Cu, Pb, Cd) ключового ферменту фотосинтезу рибулозодифосфаткарбоксилази. Також встановлено пригнічення активності карбоангідрази за дії на рослини підвищених концентрацій кадмію (Гуральчук, 1994).

Вплив важких металів на водний режим рослин. Важкі метали істотно впливають на параметри рослинного організму, від яких залежить поглинання, транспорт води і транспірація. Зокрема, під впливом важких металів, як правило, зменшуються кількість і розміри листків, розміри продихів та їх рухливість. Водночас збільшуються щільність продихів, швидкість старіння і відмирання листків.

Порушення водного режиму пов'язане також зі змінами на рівні кореня. Під впливом важких металів пригнічується формування нових бічних корінців і кореневих волосків, зменшується швидкість лінійного росту коренів. При цьому зростає ступінь суберинізації і лігніфікації коренів, що зменшує надходження води (Barcelo, Poschenrieder, 1990).

Вплив важких металів на ростові процеси. Важкі метали здатні інгібувати ріст рослин, пов'язаний як з розтягуванням, так і з поділом клітин. Ріст розтягуванням може пригнічуватися за рахунок

зменшення еластичності клітинних стінок, пов'язаного з утворенням іонами важких металів поперечних зв'язків з карбоксильними групами пектинів. З пектиновою фракцією зв'язуються мідь, цинк, свинець, кадмій та інші важкі метали.

Стійкість рослин до дії ушкоджуючих агентів багато в чому визначається стійкістю їх меристем. Показано, що підвищення вмісту важких металів у навколишньому середовищі призводить до зниження інтенсивності клітинних поділів, а також до збільшення відносної кількості профаз.

Морфофізіологічні зміни кореневої системи, що відбуваються під впливом важких металів, свідчать про зміну гормонального балансу коренів, але зв'язок цих процесів поки що мало досліджений (Гуральчук, 1994).

Механізми адаптації рослин до дії важких металів

Розрізняють два типи механізмів стійкості рослин до важких металів: внутрішні і зовнішні. Внутрішні механізми зумовлюють детоксикацію металів, що надійшли в протопласти, шляхом їх хелатування органічними кислотами, білками, компартментації у вакуолі, появи стійких до металів ферментів та/або альтернативних метаболічних шляхів, менш чутливих до дії важких металів. До зовнішніх механізмів належать іммобілізація металів у клітинній стінці, виділення хелатуючих лігандів, формування редокс- і рН-бар'єрів на плазматичній мембрані. Водночас такий поділ механізмів досить умовний.

Зв'язування важких металів з клітинними стінками є одним з важливих механізмів стійкості рослин до важких металів. Клітинні стінки, зв'язуючи велику кількість іонів металів, можуть обмежувати їх надходження в цитоплазму. Зв'язування важких металів відбувається переважно стінками клітин кори кореня і розглядається як один з морфофізіологічних механізмів детоксикації, спрямований на ізоляцію металу в метаболічно малоактивному компартменті клітини. Необхідно зазначити, що внесок цього механізму у стійкість до важких металів залежить від видових особливостей рослин.

Так, клітинні стінки однодольних і дводольних рослин відрізняються за складом. Оболонки більшості злаків бідні на пектини і структурні білки, тобто мають меншу кількість сайтів зв'язування важких металів порівняно з дводольними. У більшості дводольних в клітинних стінках целюлозо-ксилогуканові ланцюги

занурені в пектиновий матрикс. Такі клітинні стінки мають високу акумулюючу здатність щодо двовалентних катіонів (Серегин, Кожевникова, 2008). Показано, що поглинання цинку і марганцю клітинними оболонками і коренями гороху значно вище, ніж у кукурудзи (Гуральчук, 1994).

Є дані, що для багатьох адаптованих видів рослин характерно значне накопичення важких металів у коренях. За високих їх концентрацій базальні частини коренів накопичують істотно більші концентрації свинцю, цинку і кадмію, ніж апікальні, особливо це характерно для стійких популяцій (Нестерова, 1989). Щоправда в літературі є і протилежні дані, які свідчать про значне накопичення важких металів у меристематичних клітинах (Гуральчук, 1994).

Виділення коренями хелатуючих агентів, які реагують з важкими металами, може бути одним з механізмів зменшення поглинання останніх рослинами. Проте поки що мало відомостей стосовно зв'язку між стійкістю рослин до токсичних металів і виділенням ними хелатних сполук.

Доступність деяких металів (особливо Fe і Mn) для рослин сильно залежить від редокс-потенціалу. Це призводить до того, що рослини, які ростуть на відновлених субстратах, часто зазнають негативного впливу надлишку заліза і марганцю (Taylor, 1987). Встановлено, що під впливом кислих кореневих виділень може відбуватися перетворення недоступних для рослин оксидів важких металів на легкозасвоювану катіонну форму (Гуральчук, 1994).

Іони важких металів, які не зв'язалися сайтами клітинних стінок і подолали бар'єр плазматичної мембрани потрапляють в цитоплазму. З цитоплазми більша частина металів надходить у вакуолу за допомогою різних механізмів, серед яких виділяють Me^{2+}/H^{+} -антипорт (його існування є предметом дискусій) і енергозалежний транспорт за участю фітохелатинів (див. нижче). У вакуолі важкі метали утворюють комплекси з органічними кислотами, що є одним з механізмів їх детоксикації (Серегин, Кожевникова, 2008).

Фітохелатини – це поліпептиди, що складаються з 1-10 лінійних ланцюгів глютамінової кислоти та цистеїну і закінчуються гліцином. Вони зв'язують важкі метали через групи залишків цистеїну в стабільні тіолоатні комплекси. Синтез фітохелатинів індукується дією на рослини важких металів.

Вважають, що утворення фітохелатинів відбувається шляхом подовження пептидного ланцюга трипептиду глутатіону і

каталізується специфічним ферментом γ -глутаміл-цистеїн дипептидтранспептидазою (фітохелатинсинтазою), КФ 2.3.2.15 (Grill, 1989). Цей фермент переносить γ -глутаміл-цистеїнову дипептидну групу глутатіону на акцептор – іншу молекулу глутатіону або на ростучий ланцюг молекули фітохелатину. Перебіг такої реакції здійснюється лише після активації ферменту важкими металами. Після комплексації фітохелатинами важкі метали можуть транспортуватися у вакуолю або вивільнятися для синтезу металовмісних апопротеїнів.

Фітохелатини відіграють важливу роль у детоксикації важких металів, але за їх участю знешкоджуються не всі важкі метали. Так, показано, що вони не беруть участі у детоксикації нікелю (Schat et al., 2002).

Поряд з фітохелатинами за дії важких металів у рослин може посилювати синтез ще однієї групи захисних поліпептидів – тіонеїнів. Це специфічні низькомолекулярні білки (до 10 kD) з високим вмістом цистеїну (30%). Більш досліджено функціонування цих білків у тваринних організмів і людини. Для перевірки можливості функціонування гена металотіонеїну у вищих рослин в геномі гірчиці польової і тютюну було перенесено ген металотіонеїну з геному китайського хом'ячка. У трансформованих рослин майже в чотири рази зросла здатність до зв'язування кадмію. Такий експеримент, за допомогою якого вдалося вперше довести можливість функціонування гена ссавців у геномі вищих рослин, був проведений у канадському Центрі дослідження рослин.

Ще одним механізмом адаптації рослин є індукований синтез стійких до дії важких металів ферментів, що регулюють звичні метаболічні шляхи. Такий механізм адаптації досліджено на прикладі пероксидази, поліфенолоксидази, карбоангідрази та ряду інших ферментів (Гуральчук, 1994).

Таким чином, виживанню рослин за умов надлишку важких металів сприяють компартментація їх іонів у клітинних стінках або вакуолях, зв'язування з тіолвмісними білками і пептидами, органічними кислотами, індукований синтез стійких ферментів. Однак кожен із цих механізмів, взятий окремо, не є універсальним. Вони фактично взаємно доповнюють одне одного залежно від виду рослин, умов їх вирощування, конкретного металу, що міститься у надлишку.

Лекція 11

СТІЙКІСТЬ РОСЛИН ДО ГІПОКСІЇ ТА АНОКСІЇ

Здатність організмів витримувати умови гіпо- і аноксії, тобто тимчасовий дефіцит або повну відсутність кисню, досить поширена в природі. Рослини (особливо їх корені) найчастіше потрапляють в умови дефіциту кисню внаслідок надмірного зволоження ґрунту. У середньому в світі близько 10% посівних площ зазнає часткового або повного затоплення (Кошкин, 2010).

Причини пошкоджень рослин за дії гіпо- і аноксії

Негативний вплив гіпо- і аноксії пов'язаний передусім з порушенням процесу дихання. Проте при гіпоксії, на відміну від аноксії, відключаються лише системи, що мають низьку спорідненість до кисню. При малому вмісті кисню флавінові ферменти дихального ланцюга, які мають низьку спорідненість до кисню, не здатні ефективно працювати, але цитохромоксидаза за таких умов перебуває в активному стані, забезпечуючи часткову роботу електрон-транспортного ланцюга (ЕТЛ). При аноксії ЕТЛ відключається повністю. За таких умов припиняється транспорт електронів і окиснювальне фосфорилування, не відбуваються реакції циклу Кребса, а йдуть лише гліколіз, спиртове і молочно-кисле бродіння. В результаті з кожної молекули гексози утворюється лише дві, а не 36 молекул АТФ. Рослина зазнає дефіциту енергії для підтримання метаболічних процесів. Одночасно накопичуються продукти неповного окиснення дихального субстрату – органічні кислоти і спирти. Вони збільшують проникність клітинних мембран, з клітин виділяються водорозчинні речовини, порушується гомеостаз.

Акумуляція лактату при гострому дефіциті кисню сприяє підкисленню внутрішньоклітинного середовища, а нестача АТФ і порушення роботи H^+ -АТФази супроводжується інтенсивним виходом протонів з вакуолі. Падіння величини рН цитоплазми називають клітинним ацитозом. Коли він настає, відбуваються необоротні порушення метаболізму і загибель клітин. Зменшення кількості АТФ приводить до погіршення поглинання солей і води. В

кінцевому підсумку клітини коренів за тривалої аноксії гинуть, загнивання коренів при затопленні призводить до загибелі пагонів.

Механізми стійкості рослин до нестачі кисню

Морфолого-анатомічні пристосування до кореневої гіпоксії. При обмеженні доступу кисню до коренів у результаті затоплення або перезволоження рослини намагаються зберегти необхідний для виживання рівень його в тканинах. Цьому сприяють різноманітні морфолого-анатомічні і фізіологічні пристосування. В умовах обмеженої аерації відзначаються певні морфологічні зміни коренів. Вони вкорочуються, потовщуються, не утворюють достатньої кількості кореневих волосків. Деякі види рослин здатні витримувати періоди затоплення завдяки поверхневій кореневій системі або додатковим кореням, що розвиваються у разі загибелі основних, занурених у воду. Для представників болотяної флори типові також глибокі структурні зміни в анатомічній будові тканин – утворення безперервної системи повітроносних порожнин (аеренхіми), за якою повітря надходить від надземних частин рослин до коренів. Формування аеренхіми при обмеженні доступу повітря до коренів відбувається не лише у водних рослин, а й у мезофітів: кукурудзи, ячменю, пшениці. Збільшення об'ємів аеренхіми спостерігається в адвентивних коренях, що утворюються додатково. У видів, стійких до нестачі кисню, порожнини міжклітинників значно більші, ніж у нестійких.

Гідрофіти найбільш пристосовані до життя в умовах затоплення. Наявність повітроносної тканини допомагає надходженню атмосферного кисню до органів, розташованих у воді. Крім того, кисень, що утворюється в процесі фотосинтезу, розширюючись при нагріванні листя сонячними промінням, накачується за цими порожнинами в корені і підтримує їх дихання. Аеренхіма дозволяє листю цих рослин плавати. У гідрофітів не розвивається механічна тканина. Відсутність механічних тканин компенсується плавучістю окремих органів, наприклад, листків. У занурених у воду рослин на поверхні не утворюються кутин і суберин, завдяки чому вони можуть поглинати поживні речовини всією поверхнею додатково до того, що поглинає коренева система. У занурених у воду листків відсутня транспірація, а у плаваючих вона інтенсивна. Висхідний тік води підтримується у цих рослин завдяки кореновому тиску і виділенню

води через гідатоди – водяні продихи. Ці рослини не витримують навіть невеликого зневоднення.

З культурних рослин дуже мало видів здатні росли на перезволожених ґрунтах. Найважливішим з них є рис. Первинна кора кореня і стебла у рису диференціюється в аеренхіму. За її міжклітинниками відбувається транспорт кисню в усі тканини. У повітряні порожнини коренів рису кисень безперервно надходить з надземних органів, зокрема, це може бути й кисень, що утворюється при фотосинтезі. Вдень, коли відбувається фотосинтез, вміст кисню у повітряних порожнинах листків завжди більший, ніж в атмосфері. Завдяки повітрю, що пересувається з листків, у повітряних порожнинах коренів підтримується достатньо висока концентрація кисню. Деяка частина кисню дифундує з кореня у ґрунт і, ймовірно, сприяє поліпшенню ґрунтових умов.

У рослин мезофітів у нормі аеренхіма відсутня. За умов нестачі кисню вона формується у стеблі та коренях. В утворенні цієї тканини в стеблі бере участь етилен, який синтезується з 1-аміноциклопропан-1-карбонової кислоти (АЦК). У кінчиках коренів гіпоксія стимулює активність ферментів АЦК-синтази і АЦК-оксидази. Перший фермент забезпечує утворення АЦК, а другий окиснює її до етилену.

Синтез етилену є сигналом для загибелі клітин первинної кори кореня і стебла, замість них утворюються порожнини, що використовуються для транспорту кисню з надземних органів у кореневу систему. Крім етилену у запуску загибелі клітин бере участь кальцій як внутрішньоклітинний месенджер. Процес загибелі клітин при цьому відбувається за принципом апоптозу.

Метаболічні і молекулярні механізми адаптації до дефіциту кисню. Природа сенсора, за допомогою якого рослини сприймають сигнал гіпоксії, залишається невідомою. Є припущення, що фактором, що реагує на дефіцит кисню, може бути несимбіотичний гемоглобін, який характеризується дуже низькою константою дисоціації за киснем (Dordos et al., 2003). Водночас механізм передачі його сигналу, що спричиняє ймовірні зміни стану транскрипт-факторів, не з'ясований. В індукуванні адаптивних реакцій на дію гіпоксії, принаймні як посередники, беруть участь іони кальцію і активні форми кисню. Зокрема, відомо, що одна з найбільш ранніх реакцій у відповідь на нестачу кисню – надходження іонів кальцію за кальцієвими каналами з мітохондрій і деяких інших органел в цитозоль. Вже за кілька хвилин після впливу аноксії в цитоплазмі

клітин кукурудзи в культурі реєструється збільшення вмісту іонів Ca^{2+} , після цього зростає вміст транскриптів одного з ключових адаптивних ферментів – алкогольдегідрогенази (див. нижче) (Sach et al., 1996).

Одним з основних метаболічних шляхів адаптації рослин до гіпо- і аноксії є якісна перебудова в процесі дихання. Вона спрямована на забезпечення збереження енергетичного балансу за умов пригнічення окиснювального фосфорилування. Як уже зазначалося, основний шлях розпаду глюкози у безкисневому середовищі – гліколіз. Однак швидкість переключення на цей шлях, його рівень і динаміка відрізняються у рослин, контрастних за стійкістю до гіпоксії. У нестійких рослин різке збільшення частки та активності гліколізу спостерігається у перші години впливу гіпоксії, але виявляється досить короткочасним. У пристосованих рослин за меншої інтенсивності цей процес здійснюється тривалий час, що зумовлює більш надійне постачання енергії.

У результаті гліколізу молекула глюкози розщеплюється на дві молекули піровиноградної кислоти. При цьому утворюється дві молекули АТФ, а НАД^+ відновлюється до НАДН. За відсутності мітохондріального дихання інтенсивність гліколізу має визначальну роль для забезпечення рослин відновними еквівалентами та енергією. Проте посилений гліколіз спричиняє підкислення клітинного середовища через нагромадження піровиноградної кислоти. Від інтенсивності її метаболізації значною мірою залежить стійкість рослин до гіпоксії.

Піровиноградна кислота може декарбоксилуватися під впливом піруватдекарбоксилази до ацетальдегіду, останній за дії алкогольдегідрогенази перетворюється на етанол. Іншим шляхом метаболізації піровиноградної кислоти є її перетворення на молочну кислоту під дією лактатдегідрогенази з участю НАДН як відновника. Ці процеси зумовлюють зміни рН за умов гіпоксії.

Згідно з гіпотезою Девіса-Робертса, регуляція рН цитозолу анаеробному метаболізмі залежить від активності лактатдегідрогенази і піруватдекарбоксилази. Лактатдегідрогеназа має оптимум рН при фізіологічних значеннях реакції середовища цитоплазми. При утворенні лактату цитоплазма підкислюється. У міру зниження рН лактатдегідрогеназа інгібується, водночас піруватдекарбоксилаза, від активності якої залежить утворення етилового спирту, активується, оскільки її оптимум зміщений у кислі

значення рН. Таким чином, акумуляція лактату стимулює перетворення піровиноградної кислоти на ацетальдегід, який далі відновлюється алкогольдегідрогеназою до етанолу. На відміну від лактату, молекула етанолу не несе заряду і здатна до дифузії через цитоплазму у позаклітинне середовище. У результаті рН цитозолу стабілізується на рівні слабо кислих значень.

Припускають, що за умов гіпоксії АТФ як енергетичне джерело може частково замінюватися пірофосфатом. Можливо, що вакуолярна H^+ -пірофосфатаза здатна виконувати функцію H^+ -АТФази тонопласту при постачанні протонів у вакуолю. Так, у проростків рису активність вакуолярної пірофосфатази збільшувалася у десятки разів, при цьому зростало і пірофосфатзалежне надходження протонів у везикули тонопласту.

За умов гіпо- і аноксії, як і за дії інших стресорів, у рослин змінюється електрофоретичний спектр білків. Зокрема, виявлено появу нових молекулярних форм ферментів гліколізу та метаболізації піровиноградної кислоти – глюкозофосфатізомерази, енолази, алкогольдегідрогенази, а також сахарозсинтетази, амілази, антиоксидантних ферментів. Такі зміни необхідні для забезпечення енергетичних потреб рослин за допомогою гліколізу за умов пригнічення аеробного дихання, а також для захисту клітинного метаболізму від надлишку активних форм кисню.

Лекція 12

СТІЙКІСТЬ РОСЛИН ДО БІОТИЧНИХ СТРЕСОРІВ

Основними біотичними стресорами для рослин є патогени і фітофаги. На різних етапах розвитку рослини зазнають нападу вірусів, бактерій, паразитичних грибів, комах, кліщів, нематод та інших патогенів і шкідників.

Для захисту від потенційних шкідників і хвороб у рослин є великий арсенал пристосувань. Хорошим бар'єром для деяких бактерій і грибів є кутикула і перидерма. Проте головною є хімічна система захисту, яка налічує тисячі різноманітних сполук вторинного походження. Саме вторинні сполуки забезпечують основний захист рослин від ураження патогенами і ушкодження комахами. Проте селекція більшості культурних рослин здійснювалася шляхом зниження вмісту речовин вторинного походження, що негативно позначалося на їх стійкості до комах і хвороб.

Хвороби рослин спричиняють паразитичні гриби, бактерії, віруси, віроїди, мікоплазми, нематоди. Нематоди і рослини-паразити можуть бути переносниками вірусів. Розрізняють такі групи патогенів:

- Факультативні (необов'язкові) паразити, які належать до сапрофітів, живуть на мертвих залишках рослин, але можуть уражувати живі ослаблені рослини.
- Факультативні сапрофіти, які ведуть в основному паразитичний спосіб життя і рідше – сапрофітний.
- Облігатні (обов'язкові) паразити, що уражують тільки живі рослини.

За характером живлення паразитів поділяють на некротрофи і біотрофи. Некротрофи (всі факультативні паразити і деякі факультативні сапрофіти) поселяються на заздалегідь убитій ними тканині. Клітини рослини-живителя гинуть і перетравлюються під дією токсинів і гідролітичних ферментів, що виділяються патогеном. Біотрофи (облігатні паразити) певний час співіснують з живими клітинами рослини-живителя.

Стійкість рослин до патогенів визначається, як було встановлено Г.Флором у 50-і роки 20 століття, взаємодією компліментарної пари генів рослини-живителя і патогена, відповідно, гена стійкості (*R*) і гена авірулентності (*Avr*).

За концепцією Флора, деякі метаболіти рослини (рецептори), синтезовані під контролем генів стійкості, впізнають чужорідні метаболіти патогенів, що контролюються компліментарними генами авірулентності, внаслідок чого індукуються захисні відповіді. Відсутність у живителя рецептора внаслідок зміни або втрати гена стійкості або відсутність у патогена метаболіту, що зв'язується з рецептором, призводять до того, що рослина перестає впізнавати патоген і імунні реакції або не активуються або активуються надто слабо і пізно.

Таким чином, у концепції Флора мають функціонувати принаймні чотири типи факторів: (1) гени авірулентності і кодовані ними сполуки, що отримали назву еліситорів; (2) гени стійкості і їх продукти – рецептори; (3) трансдуктори сигналів, що передають інформацію в геном; (4) гени імунної відповіді. Два перших фактори специфічні, тоді як два останніх – неспецифічні.

Продукти експресії деяких генів стійкості рослин (*R* генів) встановлені. Це білки і всі вони містять повтор, багатий на лейцин, а також протеїнкіназний і нуклеотидзв'язуючий домени. Домен білка, що містить повтор, багатий на лейцин, відповідає за з'єднання білка з білком, тобто за розпізнавання патогена. Протеїнкіназний і нуклеотидзв'язуючий домени беруть участь у фосфорилуванні білків і регуляції експресії захисних генів, відповідно.

З боку патогенов в процесі впізнавання беруть участь еліситори. Це речовини, що індукують у стійких рослин експресію захисних генів. Рослинні глюканази, руйнуючи полісахариди клітинних стінок грибів і бактерій, перетворюють їх на низькомолекулярні еліситори (β -глюкани і хітозан). Еліситором є і ліпоглікопротеїновий комплекс (активна частина – ненасичені жирні кислоти: арахідонова та ейкозапентаєнова).

При руйнуванні пектинових полісахаридів рослинних клітинних стінок полігалактуроназами патогенів утворюються особливі речовини («сигнали тривоги»), які мігрують в здорові клітини, де індукують захисні реакції. Ці речовини здобули назву конститутивних (ендогенних) еліситорів або олігосахаринів.

Рослина розпізнає еліситори своїми рецепторами, розташованими в клітинній стінці і плазмалемі. Утворення комплексу еліситор-рецептор активує захисні механізми рослини. Проте взаємодії грибних еліситорів з рецепторами перешкоджають супресори – низькомолекулярні глюкани, що виділяються гіфами грибів і конкурують з еліситором за з'єднання з рецептором. Якщо супресор зв'язується з рецептором, то захисні реакції не активуються.

Для грибів і бактерій відомо, що їх еліситори зв'язуються із зовнішньою (локалізованою зовні плазмалеми) ділянкою білкового рецептора, розташованого в плазмалемі. В результаті цього зв'язування відбувається автофосфорилування зовнішньої ділянки рецептора і зміна його конформації. Залишок фосфорної кислоти передається на внутрішню ділянку рецептора, що також змінює його конформацію. Результатом взаємодії рецептора з еліситором є активація каскаду передачі сигналу, що зумовлює посилення експресії захисних генів. У трансдукції сигналів біотичних стресорів задіяні всі сім нині відомих сигнальних систем (див. лекції 3, 4).

Видовий імунітет

Поняття «видовий імунітет» було вперше запропоновано М.І. Вавиловим. Видовий імунітет виявляється у тому, що кожен вид рослини має стійкість до переважної більшості потенційно небезпечних патогенів. Однак деякі види паразитів тривалим еволюційним шляхом пристосувалися долати видовий імунітет рослини і стали патогенними (вірулентними) для неї. Такі види патогенів мають здатність уражувати тільки певні види рослин. Найбільш важливим чинником для прояву патогенності є відповідність між поживними потребами патогена і складом живильних речовин рослини.

До переважної більшості патогенів рослини мають уроджений імунітет. Майже нездоланим бар'єром для багатьох патогенів, що не мають спеціальних пристосувань для активного проникнення, служать покрови і клітинна стінка рослин. Їх пошкодження може відкрити доступ патогена до внутрішніх тканин рослини.

Також причиною видового імунітету рослини може бути його поживна непридатність для патогена. Це може бути пов'язане з наявністю токсичних речовин, з відсутністю або низьким вмістом у тканинах рослин речовин, необхідних для нормального розвитку паразита.

Рослини мають великий спектр токсичних сполук, які постійно присутні в тканинах, незалежно від того, зазнавали вони інфікування чи ні. Деякі з них (наприклад, сапоніни) завжди містяться в активній формі, інші локалізовані у вигляді неактивних попередників у вакуолі (ціаногенні глікозиди, глікозинолати) і активуються тільки при пошкодженні клітин патогеном. Такі прототоксини рослин називають фітоантисипінами. Їх синтез каталізується цитоплазматичними ферментами, які активуються при пошкодженні тканин патогеном. Саме фітоантисипіни часто виступають у ролі першого хімічного бар'єра на шляху проникнення патогена.

Захисні реакції рослин на ураження патогенами

Патоген, подолавши поверхневі бар'єри і потрапивши в провідну систему і клітини рослини, спричиняє захворювання. Характер захворювання залежить від стійкості рослини. За ступенем стійкості виділяють чотири категорії рослин: чутливі, толерантні, надчутливі і вкрай стійкі (імунні). Їх можна охарактеризувати на прикладі взаємодії рослин з вірусами.

У чутливих рослинах вірус транспортується з первинно заражених клітин по рослині, добре розмножується і спричиняє різноманітні симптоми захворювання. Проте і у чутливих рослин існують захисні механізми, що обмежують вірусну інфекцію. Про це свідчить, наприклад, відновлення репродукції вірусу тютюнової мозаїки в протопластах, ізольованих із заражених листків рослин тютюну, в яких закінчилося зростання інфекційності. Темно-зелені зони, що утворюються на молодих листках хворих чутливих рослин, характеризуються високим ступенем стійкості до вірусів. Клітини цих зон майже не містять вірусних частинок порівняно із сусідніми клітинами світло-зеленої тканини. Низький рівень накопичення вірусів в клітинах темно-зеленої тканини пов'язаний з синтезом антивірусних речовин. У толерантних рослинах вірус розповсюджується по всій рослині, але погано розмножується і не спричиняє симптомів захворювання. У надчутливих рослинах первинно інфіковані і сусідні клітини некротизуються, локалізуючи вірус в некрозах. Вважається, що у дуже стійких рослинах вірус репродукується тільки в первинно заражених клітинах, не транспортується по рослині і не спричиняє симптомів захворювання. Проте був показаний транспорт вірусного антигена і субгеномних РНК у цих рослинах, а при витримуванні заражених рослин за

зниженої температури (10-15°C) на інфікованих листках з'являлися некрози (Малиновский, 2004).

Реакція надчутливості. Реакція надчутливості полягає у швидкій локальній загибелі інфікованих рослинних клітин разом з патогеном, що забезпечує стійкість всієї рослини. Така реакція є однією з найбільш ефективних способів захисту рослин від патогенних організмів. Смерть інфікованих клітин і створення захисного бар'єру навколо некрозів блокують транспорт інфекції по рослині, перешкоджають доступу до патогена живильних речовин, спричиняють елімінацію патогена, призводять до утворення антипатогенних ферментів, метаболітів і сигнальних речовин, які активують захисні процеси в сусідніх і віддалених клітинах, і зрештою, сприяють одужанню рослини. Загибель клітин відбувається шляхом запуску генетичної програми смерті і утворення сполук і вільних радикалів, токсичних як для патогена, так і для самої клітини.

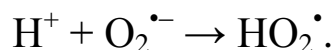
Реакція надчутливості виникає за умови розпізнавання рослиною за допомогою рецепторів, що є продуктами генів резистентності (*R*-генів) елісаторів патогена, які є продуктами генів авірулентності (*avr*-генів) (див. вище).

Як правило, вже через кілька хвилин після взаємодії елісатора з рецептором рослинної клітини змінюються іонні потоки через плазмалему. Особлива роль належить іонам Ca^{2+} . У перші хвилини після зараження відбувається різке збільшення концентрації кальцію в цитозолі за рахунок потоку через кальцієві канали і активація різних кальційзв'язуючих білків, передусім протеїнкіназ. Деякі з них активуються кальцієм безпосередньо, інші за посередництва кальмодуліну (див. лекцію 3).

Однією з мішеней кальцію є мультиферментний комплекс НАДФН-оксидази, який активується за рахунок кальційзалежного фосфорилування і каталізує утворення в плазмалемі супероксидного аніон-радикала $\text{O}_2^{\bullet-}$. Однозначних уявлень про механізми такої активації поки немає. Згідно з однією з моделей (Wong et al., 2007), первинний потік кальцію в цитозоль призводить до активації кальційзалежної протеїнкінази, яка фосфорилує N-термінальну ділянку молекули НАДФН-оксидази і викликає конформаційні зміни мембранної субодиниці ферменту Rboh (Respiratory burst oxidase homologs). Вони полегшують з'єднання з нею цитозольної субодиниці (Ror ГТФази), що призводить до підвищення активності НАДФН-оксидази і посилення утворення $\text{O}_2^{\bullet-}$. Далі супероксидний

аніон-радикал ферментативно і неферментативно швидко перетворюється на інші активні форми кисню: пероксид водню (H_2O_2), гідропероксидний радикал (HO_2^\bullet), гідроксильний радикал ($^\bullet\text{OH}$).

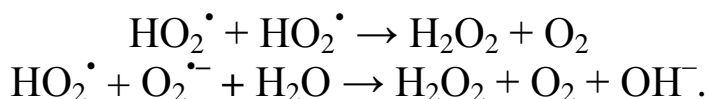
Утворення гідропероксидного радикала відбувається за рахунок протонування супероксидного аніон-радикала за низьких значень pH:



Пероксид водню утворюється шляхом дисмутації супероксидного аніон-радикала під дією супероксиддисмутази



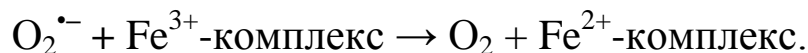
або за рахунок спонтанних перетворень як $\text{O}_2^{\bullet-}$, так і HO_2^\bullet :



Утворення гідроксильного радикала $^\bullet\text{OH}$, який є дуже сильним окисником, відбувається в реакції Фентона з пероксиду водню з участю металів зі змінною валентністю в хелатованій формі (насамперед $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$):



Fe^{3+} -комплекс може ефективно відновлюватися супероксидним радикалом $\text{O}_2^{\bullet-}$, забезпечуючи таким чином циклічність реакції Фентона:



Процес утворення великої кількості активних форм кисню називають окиснювальним вибухом. Найбільш активні форми кисню (HO_2^\bullet і $^\bullet\text{OH}$) здатні індукувати ланцюгові реакції, які призводять до утворення великої кількості вільних радикалів, що спричиняє пероксидне окиснення ліпідів, руйнування цілісності мембран, інактивацію ферментів і руйнування нуклеїнових кислот.

Активні форми кисню є необхідним, але недостатнім чинником для індукції реакції надчутливості (Дмитриев, 2003). Для розвитку такої реакції необхідні її підсилювачі. Серед них особливе значення мають саліцилова кислота і оксид азоту.

Саліцилова кислота здатна інгібувати каталазу і тим самим сприяти накопиченню більшої кількості пероксиду водню та інших активних форм кисню, необхідних для виникнення в клітинах окислювального вибуху. Крім того, на деяких видах рослин показана здатність саліцилової кислоти спричиняти активацію супероксиддисмутази, що також сприяє накопиченню в клітинах стабільної активної форми кисню – пероксиду водню. Збільшення вмісту саліцилової кислоти в клітинах надчутливих рослин індукується пероксидом водню, який нагромаджується раніше за рахунок активації НАДФН-оксидази, котра утворює супероксидний радикал, що є джерелом синтезу H_2O_2 в ферментативних і не ферментативних реакціях (див. вище).

Роль оксиду азоту у рослин в посиленні реакції надчутливості у відповідь на атаку патогенів менш досліджена. Водночас у багатьох роботах показані посилення синтезу NO в клітинах, уражених патогенами, і його участь в трансдукції сигналу, необхідного для розвитку захисних реакцій. За однією з моделей (Durner, Klessig, 1999), активація утворення активних форм кисню і оксиду азоту у надчутливих рослин створює передумови для утворення пероксинітриту ($ONOO^-$), який чинить токсичний вплив на патоген.

Реакція надчутливості закінчується появою некротичних плям, загибеллю частини клітин рослини-живителя і патогена. Велике значення в некротизації інфікованих клітин надчутливих рослин має вихід фенолів з центральної вакуолі.

Внаслідок реакції надчутливості в некротичних ділянках утворюються механічні бар'єри, що перешкоджають поширенню патогена у тканинах. Некротичні зони оточуються шаром перидерми, у самій зоні накопичуються токсичні сполуки, а у живих клітин посилюється міцність клітинних стінок. Багато видів рослин реагують на грибну або бактеріальну інфекцію активацією синтезу лігніну або каллози, які забезпечують додаткову міцність клітинних стінок, перешкоджаючи проникненню інфекції. При інфікуванні у клітинній стінці також зростає кількість екстенсинів – гідроксипролін-багатих білків. При цьому під дією пероксиду водню, що утворюється в реакції надчутливості, відбувається молекулярна

«зшивка» поліпептидних ланцюгів цих структурних білків у міцну тривимірну мережу, що зміцнює клітинну стінку. Виявлено, що індукція експресії деяких генів, що кодують екстенсини, спричиняється пораненням та/або обробкою елісаторами.

Одним з елементів відповіді рослин на ураження патогенами є зростання вмісту жасмонової кислоти в клітинах. Синтез жасмонатів може бути індукований також дією елісаторів або пораненням рослин. Жасмонова кислота активує експресію низки генів, продукти яких важливі для реалізації захисних реакцій. До них належать, зокрема, тіоніни (білки, що беруть участь у руйнуванні бактеріальних і грибних мембран, див. нижче), екстенсини, ферменти, що беруть участь в синтезі фенольних сполук і фітоалексинів. Обробка рослин жасмоновою кислотою помітно підвищує їх стійкість до біотичних і абіотичних стресорів. Жасмонова кислота, як і саліцилат, вважається одним із факторів індукції імунітету рослин до повторних заражень.

Завершальний етап реакцій-відповідей рослин на зараження несумісними патогенами пов'язаний із синтезом великої кількості білків і речовин вторинного метаболізму, що пригнічують розвиток інфекції. До таких білків належать PR-білки (*pathogenesis related proteins*). Ряд PR-білків є гідролітичними ферментами, що розщеплюють деякі полімери клітинних стінок паразитів. Наприклад, β -1,3-хітиназа руйнує хітин грибних патогенів, а β -1,3-глюканаза – глюканові полісахариди клітинної стінки грибів. Утворювані внаслідок цього олігосахариди виступають в ролі елісаторів, що індукують у рослин синтез фітоалексинів. Фітоалексини також синтезуються у відповідь на олігосахариди, що утворюються при розщепленні клітинної стінки рослини гідролітичними ферментами патогена.

Фітоалексини являють собою велику групу метаболітів вторинного походження, які швидко синтезуються у місці інфікування і пригнічують розвиток патогена. Синтез фітоалексинів є обов'язковим критерієм наявності реакції надчутливості в ході патогенезу. На відміну від фітоантисипінів, фітоалексини з'являються у рослинних тканинах тільки при їх пошкодженні. При цьому індукується експресія генів, що кодують ферменти, необхідні для синтезу фітоалексинів. Різні види рослин синтезують різні хімічні групи сполук, що виконують функції фітоалексинів. У бобових це частіше ізофлавоноїди, у пасльонових – сесквітерпени.

Крім фітоалексинів і PR-білків до хімічної системи захисту рослин відносять також токсичні для патогенів пептиди – тіоніни і дефензини. Низькомолекулярні цистеїн-багаті білки тіоніни мають велику спорідненість до фосфоліпідів, тому здатні спричиняти порушення структури і функцій біомембран. Вони токсичні передусім для бактерій і грибів, але можуть спричиняти порушення проникності мембран й інших клітин. Невеликі поліпептиди дефензини синтезуються у рослинах у відповідь на зараження бактеріями або патогенними грибами. Їх токсичність пояснюють здатністю змінювати мембранний потенціал клітини. При цьому, на відміну від тіонінів, дефензини не порушують структуру мембран.

Індукована стійкість до повторного зараження патогеном. Однією з характерних властивостей надчутливих рослин є набута (індукована) стійкість до повторного зараження патогеном. Були запропоновані терміни: системна набута стійкість (systemic acquired resistance – SAR) і локальна набута стійкість (localized acquired resistance – LAR). Про LAR говорять в тих випадках, коли стійкості набувають клітини у зоні, що безпосередньо примикає до локального некрозу (відстань приблизно 2 мм). У цьому разі вторинні некрози зовсім не утворюються. Набута стійкість вважається системною, якщо вона розвивається в клітинах хворої рослини, віддалених від місця первинного проникнення патогена.

Набута стійкість, як правило, неспецифічна. Стійкість рослин до вірусів може бути спричинена бактеріальною і грибною інфекціями і навпаки. Стійкість може індукуватися не тільки патогенами, а й різними речовинами, наприклад екзогенними саліциловою або жасмоновою кислотами.

Розвиток SAR пов'язаний з розповсюдженням у рослині речовин, що утворюються в первинно заражених листках. Було зроблене припущення, що індуктором SAR є саліцилова кислота, яка утворюється при некротизації первинно заражених клітин. Воно базувалося на таких фактах. Було встановлено, що вміст ендогенної саліцилової кислоти збільшується в 20 разів в первинно заражених і в 5 разів в незаражених листках надчутливих рослин тютюну сорту Ксанті нк порівняно з чутливими рослинами Ксанті. Зараження рослин огірків вірусом некрозу тютюну або грибом *Colletotrichum lagenarium* спричиняло підвищення концентрації саліцилової кислоти у флоемному соку. У дослідях з використанням радіоактивної мітки було встановлено, що велика частина саліцилової кислоти, що

міститься в неінфікованих листках хворих рослин, транспортувалася з первинно заражених листків. Трансгенні рослини тютюну і *Arabidopsis thaliana* з вбудованим бактеріальним геном *nahG*, що кодує фермент саліцилатгідроксилазу, який каталізує перетворення саліцилової кислоти на катехол, не накопичували саліцилову кислоту і не виявляли стійкість до зараження патогеном. Водночас не ясно, як може саліцилова кислота індукувати стійкість рослин з її високим конститутивним рівнем.

Є роботи, результати яких ставлять під сумнів припущення про те, що саліцилова кислота є індуктором SAR, специфічним для надчутливих рослин. Так, було показано, що саліцилова кислота однаково пригнічує репродукцію вірусу в клітинах чутливих і надчутливих рослин.

З іншого боку, доведено, що рослини здатні системно розвивати і не залежну від саліцилової кислоти стійкість до патогенів (Шакирова, Сахабутдинова, 2003). Крім того, у відповідь на патогенну атаку, поранення, а також екзогенну обробку жасмоновою кислотою і етиленом, але не саліциловою, в рослинах спостерігається системна індукція експресії генів низки захисних білків, що мають антимікробну і антифунгальну активності. Це свідчить про існування саліцилат-незалежних шляхів індукування системної стійкості рослин, у запуску якої ключова роль належить жасмоновій кислоті та етилену (Pieterse, van Loon, 1999). Нині вважають, що існують альтернативні шляхи індукування системної стійкості – саліцилат-залежні і саліцилати-незалежні. Це свідчить про великий регуляторний потенціал рослин, задіяний у розвитку різних (множинних) захисних механізмів, поєднання яких може забезпечувати ефективну стійкість до інфекцій.

В цілому за наявності у рослин системної стійкості у них виявляється той же комплекс захисних реакцій, який формується внаслідок реакції надчутливості: синтез фітоалексинів, утворення PR-білків, процеси, пов'язані зі зміцненням клітинних стінок тощо. Однак при повторних зараженнях ці ефекти розвиваються значно швидше. Крім того, як зазначалося, SAR зумовлює неспецифічну стійкість до різних груп патогенних організмів.

Стійкість рослин до фітофагів

Для захисту від шкідливих комах рослини мають широкий набір сполук вторинного походження. Серед цих речовин є і надзвичайно токсичні, здатні вбити будь-яку тварину. Тому тварини зазвичай уникають отруйних рослин. Деякі вторинні сполуки надають рослинам неприємного смаку, що також відлякує фітофагів. Для тварин, як правило, токсичні присутні в рослинах деякі терпеноїди та ефірні олії, ціаногенні глікозиди і окремі непротеїногенні амінокислоти. Ціаногенні глікозиди при порушенні тканин розкладаються з виділенням ціановодневої кислоти, непротеїногенні амінокислоти можуть порушувати білковий обмін.

Важливим компонентом захисних реакцій рослин є також інгібітори ферментів, що беруть участь у процесах перетравлювання їжі комахами. У більшості бобових, наприклад, є білок-інгібітор амілази – ферменту, що розщеплює крохмаль.

Найбільш вивченими компонентами захисних систем рослин, які спричиняють порушення травлення у комах-фітофагів, є інгібітори протеаз – ферментів, що розщеплюють білки в процесі перетравлювання їжі. У комах, які живляться рослинами, що містять інгібітори протеаз, різко знижуються темпи росту і розвитку, оскільки в їхньому раціоні виявляються відсутніми вільні амінокислоти. Водночас в їх травному тракті відбувається накопичення неперетравленої їжі, що активує чутливі до розтягування механорецептори і спричиняє у комах відчуття насичення.

Інгібітори протеаз зазвичай не присутні в рослинах (виняток складає насіння), а з'являються у відповідь на ушкодження. Експресія генів, що кодують інгібітори протеаз, індукується механічним ушкодженням рослин і контролюється пептидним фітогормоном системіном, що складається з 18 амінокислот, і жасмоновою кислотою. Жасмонова кислота та її метиловий ефір можуть синтезуватися при механічному пошкодженні клітин з ліноленової кислоти, що утворюється при розпаді фосфоліпідів клітинних мембран. Поряд з цим існують альтернативні шляхи синтезу цього фітогормону – з галактоліпідів та гексадекатрієнової кислоти (Huynh, Lee, 2008; Farmer et al., 2009). Жасмонова кислота транспортується у неушкоджені ділянки флоемою, а метилжасмонат, як летка сполука – через повітря.

Встановлений каскад подій, що спричиняють синтез інгібіторів протеаз. На першому етапі ушкодження рослини комахами синтезується системін. Далі він транспортується по флоемі у неушкоджені частини рослин, де взаємодіє з рецепторами та ініціює синтез жасмонової кислоти, котра активує експресію генів, що кодують синтез білків – інгібіторів протеаз. Встановлено, що у томатів системін індукує системну регуляцію понад 20 генів, які беруть участь в підвищенні стійкості до ушкодження фітофагами, патогенами, пораненням, а також абіотичними стресорами. При цьому регуляція експресії деяких генів системіном може здійснюватися у поєднанні з іншими фітогормонами – абсцизовою і жасмоновою кислотами, етиленом (Медведев, 2004).

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Александров В.Я.* (1985) Реактивность клеток и белки. – Л.: Наука. – 318 с.
- Александров В.Я., Кислюк И.М.* (1994) Реакция клеток на тепловой шок. Физиологический аспект // Цитология. – Т. 36, № 1. – С. 5-59.
- Большакова М.О., Мусатенко Л.І.* (2010) Адаптивні особливості листків ксерофітів. – К.: Фітон. – 104 с.
- Веселова Т.В., Веселовский В.А., Чернавский Д.С.* (1993) Стресс у растений. Биофизический подход. – М.: Изд-во Моск. ун-та. – 144 с.
- Гималов Ф.Р., Чемерис А.В., Вахитов В.А.* (2004) О восприятии растением холодового сигнала // Успехи соврем. биологии. – Т. 124, № 2. – С. 185-196.
- Глянько А.К., Ищенко А.А., Митанова Н.Б., Васильева Г.Г.* (2009) НАДФН-оксидаза растений // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – Вип. 2 (17). – С. 6-18.
- Гуральчук Ж.З.* (1994) Механизмы устойчивости растений к тяжелым металлам // Физиология и биохимия культ. растений. – Т. 26, № 2. – С. 107-118.
- Дмитриев А.П.* (2003) Сигнальные молекулы растений для активации защитных реакций в ответ на биотический стресс // Физиология растений. – Т. 50, № 3. – С. 465–474.
- Дроздов С.Н., Курец В.К., Титов А.Ф.* (1984) Терморезистентность активно вегетирующих растений. – Л.: Наука. – 168 с.
- Зинченко В.П., Долгачева Л.П.* (2003) Внутриклеточная сигнализация. – Пушино. – 84 с.
- Кабата-Пендиас А., Пендиас Х.* (1989) Микроэлементы в почвах и растениях. – М.: Мир. – 439 с.
- Колесниченко А.В., Войников В.К.* (2003) Белки низкотемпературного стресса растений. – Иркутск: Арт-Пресс. – 196 с.
- Колупаев Ю.Е.* (2007) Кальций и стрессовые реакции растений // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – Вип. 1 (10). – С. 24-41.
- Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В.* (2009) Активные формы кислорода при адаптации растений к стрессовым температурам // Физиология и биохимия культ. растений. – Т. 41, № 2. – С. 95-108.
- Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В.* (2010) Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров. – Киев: Основа. – 352 с.
- Колупаев Ю.Е., Трунова Т.И.* (1992) Особенности метаболизма и защитные функции углеводов растений в условиях стрессов // Физиология и биохимия культ. растений. – Т. 24, № 6. – С. 523-533.
- Колупаєв Ю.Є.* (2001) Стресові реакції рослин: молекулярно-клітинний рівень. – Х. – 171 с.

- Кордюм Е.Л., Сытник К.М., Бараненко В.В. и др.* (2003) Клеточные механизмы адаптации растений к неблагоприятным воздействиям экологических факторов в естественных условиях. – Киев: Наукова думка. – 277 с.
- Кошкин Е.И.* (2010) Физиология устойчивости сельскохозяйственных культур. – М.: Дрофа. – 638 с.
- Кузнецов Вл.В., Шевякова Н.И.* (1999) Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // Физиология растений – Т. 46, № 2. – С. 321-336.
- Лукаткин А.С.* (2002) Холодовое повреждение теплолюбивых растений и окислительный стресс. – Саранск: Изд-во Мордовского ун-та. – 208 с.
- Малиновский В.И.* (2004) Физиология растений. – Владивосток. – 118 с.
- Медведев С.С.* (2004) Физиология растений. – СПб: Изд-во Санкт-Петербург. ун-та. – 460 с.
- Медведев С.С.* (2005) Кальциевая сигнальная система растений // Физиология растений. – Т. 52, № 2. – С. 283-305.
- Мусієнко М.М.* (2006) Екологія рослин. К.: Либідь. – 432 с.
- Применение физиологии в селекции пшеницы* (2007): Пер. с англ. /Под ред. В.В.Моргуна. – Киев: Логос. – 640 с.
- Тарчевский И.А.* (2002) Сигнальные системы клеток растений. – М.: Наука. – 294 с.
- Титов А.Ф., Акимова Т.В., Таланова В.В., Топчиева Л.В.* (2006) Устойчивость растений в начальный период действия неблагоприятных температур. – М.: Наука. – 143 с.
- Титов С.Е., Кочетов А.В., Коваль В.С., Шумный В.К.* (2003) Трансгенез как способ повышения устойчивости растений к абиотическим стрессам // Успехи соврем. биологии. – Т. 123, № 5. – С. 487-494.
- Трунова Т.И.* (2007) Растение и низкотемпературный стресс: 64-е Тимиряз. чт. – М.: Наука. – 54 с.
- Туманов И.И.* (1979) Физиология закаливания и морозостойкости растений. – М.: Наука. – 359 с.
- Усманов И.Ю., Рахманкулова З.Ф., Кулагин А.Ю.* (2001) Экологическая физиология растений. – М.: Логос. – 224 с.
- Физиология растений* / Под ред. И.П.Ермакова. – М., 2005. – 680 с.
- Холл М.А., Новикова Г.В., Мошков И.Е. и др.* (2002) Протеинкиназы растений в трансдукции абиотических и биотических сигналов // Физиология растений. – Т. 49, № 1. – С. 121-135.
- Шакирова Ф.М.* (2001) Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. – Уфа: Гилем. – 160 с.
- Шакирова Ф.М., Сахабутдинова А.Р.* (2003) Сигнальная регуляция устойчивости растений к патогенам // Успехи соврем. биологии. – Т. 123, № 6. – С. 563-572.
- Шматько И.Г., Григорюк И.А., Шведова О.Е.* (1989) Устойчивость растений к водному и температурному стрессам. – Киев: Наук. думка. – 224 с.

- Яворская В.К., Драговоз И.В.* (1999) Физиологическая роль 3',5'-аденозинмонофосфата в растительной клетке. – Киев: Наук. думка. – 140 с.
- Bhattacharjee S.* (2005) Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants // *Curr. Sci.* – V. 89. – P. 1113-1121.
- Dat J.F., Vandenabeele S., Vranova E. et al.* (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses // *Cell. Mol. Life Sci.* – V. 57. – P. 779-795.
- Foyer C.H., Noctor G.* (2009) Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications // *Antioxid. Redox Signal.* – V. 11. – P. 861-906.
- Kasperska A.* (2004) Sensor types in signal transduction pathways in plant cells responding to abiotic stressors: do they depend on stress intensity? // *Physiol. Plant.* – V. 122. – P. 159-168.
- Kaur N., Gupta A.K.* (2005) Signal transduction pathways under abiotic stresses in plant // *Curr. Sci.* – V. 88. – P. 1771-1780.
- Mori I.C., Schroeder J.S.* (2004) Reactive oxygen species activation of plant Ca^{2+} channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction // *Plant Physiol.* – V. 135. – P. 702-708.
- Neill S., Bright J., Desikan R. et al.* (2008) Nitric oxide evolution and perception // *J. Exp. Bot.* – V. 59. – P. 25-35.
- Neill S.J., Desikan R., Clarke A. et al.* (2002) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants // *J. Exp. Bot.* – V. 53. – P. 1237-1247.
- Scandalios J.G.* (2002) The rise of ROS // *Trends Biochem. Sci.* – V. 27. – P. 483-486.
- Scandalios J.G.* (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses // *Braz. J. Med. Biol. Res.* – V. 38. – P. 995-1014.
- Wahid A., Gelani S., Ashraf M., Foolad M.R.* (2007) Heat tolerance in plants: An overview // *Environ. Exp. Bot.* – V. 61. – P. 199-223.

ЗМІСТ

Вступ	3
Лекція 1. Поняття про стрес, адаптацію і стійкість рослин	5
Лекція 2. Неспецифічні і специфічні механізми адаптації рослин	11
Лекція 3. Принципи передачі стресових сигналів в геном і формування відповіді на них	26
Лекція 4. Основні сигнальні системи рослинних клітин	33
Лекція 5. Холодостійкість рослин	44
Лекція 6. Морозостійкість рослин	54
Лекція 7. Жаростійкість рослин	63
Лекція 8. Стійкість рослин до зневоднення	77
Лекція 9. Солестійкість рослин	86
Лекція 10. Стійкість рослин до дії важких металів	95
Лекція 11. Стійкість рослин до гіпоксії та аноксії	101
Лекція 12. Стійкість рослин до біотичних стресорів	106
Список рекомендованої літератури	118

Колупаєв Юрій Євгенович

**ОСНОВИ ФІЗІОЛОГІЇ
СТІЙКОСТІ РОСЛИН:
Курс лекцій**

Навчальне видання

Підписано до друку 14.12.2019. Формат 60х84 1/16.
Папір офсетний. Друк РІЗО. Гарнітура Times New Roman
Ум. Друк. Арк.. 7,75. Тираж 100 прим. Зам. № 990.

Друк РІЗО ФОП Шведов А.І.
КП «Міська друкарня». 61002, м. Харків, вул.. Артема, 44.
Свідоцтво про державну реєстрацію:
серія ДК № 3613 від 29.10.2009 р.