

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«ПЕРМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

УЧЕБНАЯ ПРАКТИКА ПО ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ РАСТЕНИЙ

*Допущено методическим советом
Пермского государственного национального исследовательского
университета в качестве
учебного пособия для студентов, обучающихся
по направлению подготовки магистров «Биология»*

Пермь 2019

УДК 581.1 + 502.211
ББК 28.57 + 28.58

Составители: канд. биол. наук, доцент **О.А. Четина**
канд. биол. наук, доцент **Л.А. Чудинова**

Учебная практика по физиологии и биохимии растений: учеб. пособие /
сост. О.А. Четина, Л.А. Чудинова; Перм. гос. нац.
исслед. ун-т. – Пермь, 2018. – 94 с.

Предлагаемое издание содержит описание наиболее часто применяемых для оценки устойчивости методов, основанных на физиологических и биохимических свойствах, определяющих устойчивость растений и используемых в лабораторных работах (практикуме).

В учебном пособии представлены также теоретические основы некоторых видов устойчивости растений, что позволит студентам правильно интерпретировать результаты экспериментов, ответить на контрольные вопросы и составить заключение (выводы) по конкретной лабораторной работе.

Основная цель пособия – обеспечение фундаментальной подготовки студентов в умении организации экспериментальных исследований в области физиологии и биохимии растений.

Предназначено студентам биологического факультета университета, обучающихся по направлению подготовки магистров «Биология», по магистерской программе «Физиология и биохимия растений».

УДК 581.1 + 502.211
ББК 28.57 + 28.58

Печатается по решению редакционно-издательского совета
Пермского государственного национального исследовательского университета

Рецензенты:

ISBN

© Четина О.А., Чудинова Л.А.
(составление), 2019
© Пермский государственный
национальный исследовательский
университет, 2019

Введение

Любому живому организму, включая высшие растения, присуща способность к защите от действия неблагоприятных факторов среды. Это свойство уже первых живых организмов в ходе дальнейшей эволюции развивалось и совершенствовалось. Растения особенно подвержены влиянию ряда внешних воздействий в силу прикрепленного образа жизни. Это физические факторы: высокая и низкая температура, освещенность, повышенный уровень радиации, недостаток или избыток влаги; химические: возросшая концентрация углекислоты и солей в почве, загрязненные промышленными и бытовыми отходами воздух и вода, высокие концентрации ксенобиотиков (гербицидов, фунгицидов, инсектицидов); биологические: поражение возбудителями болезней (грибами, бактериями, вирусами). В настоящее время в результате антропогенной деятельности серьезно ухудшается экологическая ситуация на Земле.

Адаптация, т.е. приспособление организма к конкретным условиям существования, у индивидуума достигается за счет физиолого-биохимических механизмов (физиологическая адаптация), а у популяции организмов (вида) – благодаря механизмам генетической изменчивости и наследственности (генетическая адаптация). Это в конечном счете и определяет жизнедеятельность организма и его выносливость. Выяснение физиолого-биохимических механизмов адаптации растений к изменяющимся условиям окружающей среды имеет существенное теоретическое и практическое значение и является одним из важных аспектов современной экологической физиологии растений. Однако, несмотря на очевидные успехи, данная проблема все еще далека от окончательного решения.

Другой задачей физиологов стала оценка степени устойчивости растений и их адаптивных возможностей к действию различных стрессовых факторов. Это особенно важно для селекционной и агрономической практики и является обязательным условием создания новых высокоурожайных сортов для конкретных почвенно-климатических условий. Для практического

растениеводства прежде всего имеет значение агрономическая устойчивость видов и сортов сельскохозяйственных растений. Она отражает степень снижения урожайности под влиянием стрессора и может выражаться в процентах снижения продуктивности в условиях стресса по сравнению с оптимальным фоном. В этом плане наиболее надежными методами оценки устойчивости растений являются прямые полевые и вегетационные опыты. Однако большая трудоемкость и продолжительность этих методов вынуждает исследователей применять разнообразные формы ускорения, используя лабораторную или лабораторно-полевую диагностику. Среди преимуществ последней группы методов следует отметить большую производительность, моделируемость и стабильность факторов. Существенным недостатком этих методов является неполное соответствие истинной агрономической устойчивости. Сегодня достигнут значительный прогресс в создании нового гибридного материала с использованием современных методов селекции и оригинальных биотехнологических подходов, однако узким местом является ранняя быстрая оценка растений.

Основные физиолого-биохимические показатели, которые наиболее часто используются для диагностики растений на устойчивость к стрессорам в лабораторных условиях, указаны в табл. 1. Набор показателей и режимы проведения оценки подбираются конкретно для определенного вида стресса.

Предлагаемое издание содержит описание наиболее часто применяемых для оценки устойчивости методов, основанных на физиологических и биохимических свойствах, определяющих устойчивость растений, и используемых в лабораторных работах (практикуме) по данной дисциплине.

Учебное пособие ставит целью освоение методики модельного эксперимента в области физиологии и биохимии устойчивости растений. На лабораторных занятиях студенты осваивают методы выращивания растений в водной, песчаной и почвенной культуре, морфометрические методы анализа, основные лабораторные методы диагностики солеустойчивости, засухоустойчивости, жароустойчивости и морозоустойчивости растений.

Студенты учатся ставить цель и задачи исследования, обрабатывать полученные данные статистически, обосновывать результаты и подкреплять их данными из литературных источников, делать выводы.

Таблица 1

Физиолого-биохимические признаки, используемые для оценки степени устойчивости растений к неблагоприятным условиям среды
(по Г.В. Удовенко, 1995)

Уровень организации	Признак	Методический прием
<i>Клеточный и органнй</i>	Проницаемость мембран	Выход веществ из ткани (клетки) Электропроводность тканей
	Водно-осмотический статус	Водный режим ткани (засухоустойчивость)
	Образование протекторов	Содержание осморегуляторов
	Энергетический баланс	Биохемилюминесценция
	Ростовая активность	Прирост, линейные и массовые показатели
	Физиологобиохимические тесты	Аналитические оценки
	Репарационная способность	Восстановление функций и параметров
<i>Организменный</i>	Донор-акцепторные связи	Аттрагирующая сила акцептора
<i>Популяционный</i>	Отбор по устойчивости	Выживаемость в популяции после стресса Проращивание семян при давлении стрессом

В учебном пособии представлены также теоретические основы некоторых видов устойчивости растений, что позволит студентам правильно интерпретировать результаты экспериментов, ответить на контрольные вопросы и составить заключение (выводы) по конкретной лабораторной работе.

Глава 1. Физиолого-биохимические основы устойчивости растений

1.1. Общие представления о стрессе и стрессорах

Термин «стресс» (от англ. *stress* – напряжение) был предложен выдающимся канадским ученым-физиологом Хансом Селье в 1936 г. для описания реакции организма животных на любое сильное неблагоприятное воздействие. По Селье, стресс – это совокупность всех неспецифических изменений, возникающих в организме под влиянием любых сильных воздействий (стрессоров), включающих перестройку защитных сил организма. Понятие «стресс» перенесено в физиологию растений, и существует направление – стресс-физиология растений. Наблюдаемый при стрессе комплекс метаболических перестроек у растений назван **фитострессом**.

В фитофизиологии термин «стресс» используется в двух аспектах. Если отражается количественная сторона, то «стресс» служит синонимом слову «воздействие» (стрессовое воздействие, стрессовый фактор, стрессовые нагрузки, индуцированный стресс и т.д.). В других случаях, когда, например, говорят о водном, солевом или окислительном стрессе, то под стрессом понимают целый комплекс ответных неспецифических и специфических изменений.

Если повреждающее действие стрессора превосходит защитные возможности организма и ведет к гибели, то в этом случае говорят об экстремальном факторе.

По происхождению и характеру действия все экологические факторы в отношении к наземным растениям подразделяют на группу абиотических (климатические, почвенно-грунтовые, топографические) и группу биотических (связанных с влиянием живых существ). Это разделение условно, поскольку многие абиотические факторы испытывают сильное влияние жизнедеятельности живых организмов.

По физиологической классификации абиотические стрессоры делят на физические (высокая и низкая температура, освещенность, недостаток или избыток влаги, повышенный уровень радиации, механические воздействия) и химические (соли, газы, пестициды, промышленные отходы, тяжелые металлы).

Перенос теории стресса на растительные объекты требует определенных корректив, поскольку у растений нет ни нервной системы, ни тех гормонов, которые участвуют в стрессовых реакциях у животных.

Во время первой фазы стресса, которая называется первичной индуктивной стрессовой реакцией, у растений происходят следующие неспецифические «аварийные» процессы:

1. Увеличивается проницаемость мембран в результате изменения молекулярного состава их компонентов. Это приводит к обратимому выходу ионов калия из клетки и входу ионов кальция, деполаризации мембран и торможению H^+ -АТФ-азы, что ведет к закислению цитоплазмы.

2. Тормозятся процессы репликации, транскрипции и синтеза белка, изменяется конформация белковых молекул. Вместе с тем происходит экспрессия репрессированных генов и синтез ряда стрессовых белков.

3. Снижается интенсивность фотосинтеза вследствие изменений структуры белков и липидов тилакоидных мембран. Дыхание вначале активизируется, однако затем ингибируется, снижается уровень АТФ.

4. Активируются свободнорадикальные процессы и синтез протекторных низкомолекулярных соединений.

5. Накапливаются продукты распада, роль которых многообразна. В частности, они способны выполнять регуляторную функцию в последующей перестройке обмена клеток и организма в целом на новый режим в экстремальных условиях, служить субстратом для синтеза стрессовых белков, фитогормонов и др., т.е. оказывать протекторное действие.

6. Происходят сдвиги в гормональном балансе в сторону возрастания интенсивности синтеза ингибиторов роста (этилена, абсцизовой и жасмоновой

кислот) и уменьшения количества гормонов – стимуляторов (ауксина, цитокинина, гиббереллинов). Это ведет к торможению роста всего растения.

Во второй фазе стресса (фазе адаптации) у растений включаются главные механизмы адаптации, – снижение интенсивности процессов распада и усиление процессов синтеза. Происходит стабилизация мембран, в результате чего восстанавливается ионный транспорт. Повышается активность функционирования митохондрий, хлоропластов и уровень энергообеспечения. Снижается генерация активных форм кислорода. Развиваются специфические на действие конкретного стрессора реакции, которые, вероятно, представлены относительно узкой группой физиолого-биохимических изменений, детерминированных генетически (синтез изоферментов и защитных (стрессовых) белков).

В период **третьей фазы (фазы истощения)** в условиях возрастания силы воздействия и постепенного исчерпания возможностей защиты организма происходят необратимые повреждения клетки, связанные с разрушением клеточных структур.

Некоторые исследователи предлагают еще одну фазу – **регенерации** (реституции), наступление которой возможно после удаления стрессора. Однако данный этап не может быть повторением второй фазы, поскольку к этому времени организм оказывается слишком ослабленным.

Необходимо отметить, что обычно стрессоры действуют не по одному, а в комплексе. Так, повышенная температура и интенсивная инсоляция сопровождаются засухой; при затоплении проявляется не только кислородная недостаточность, но и интоксикация ядовитыми соединениями; низкой температуре сопутствует слабая освещенность и избыток влаги и т.д.

Способность растения переносить действие неблагоприятных факторов и давать в таких условиях потомство называется **устойчивостью** или **стресс-толерантностью** (лат. *tolerantia* – терпение). Выделяют также **агрономическую устойчивость**, т.е. способность организмов давать высокий урожай в неблагоприятных условиях.

Устойчивость является конечным результатом адаптации. **Адаптация** (лат. *adaptio* – приспособление) – это генетически детерминированный процесс формирования защитных систем, обеспечивающих повышение устойчивости и протекание онтогенеза растений в неблагоприятных для него условиях. Адаптация включает анатомические, морфологические, физиологические, биохимические, популяционные процессы, способствующие повышению устойчивости и выживанию конкретного вида.

Выбор растением стратегии (способа) адаптации зависит от многих факторов. Однако ключевым фактором является время, предоставляемое организму для ответа. В соответствии с этим различают три главные стратегии адаптации: эволюционные, онтогенетические и срочные.

Эволюционные (филогенетические) **адаптации** – это адаптации, возникающие в ходе эволюционного процесса (филогенеза) на основе генетических мутаций, отбора и передающиеся по наследству. Они функционируют в течение всего онтогенеза не только в стрессорных, но и в оптимальных условиях. Примером служит анатомо-морфологические особенности растений, обитающих в засушливых жарких пустынях земного шара, а также на засоленных территориях (приспособленность к дефициту влаги).

Онтогенетические, или **фенотипические адаптации** обеспечивают выживание данного индивида. Они связаны с генетическими мутациями и не передаются по наследству. Формирование такого рода приспособлений требует сравнительно много времени, поэтому их иногда называют долговременными адаптациями. Классическим примером подобных адаптаций является переход некоторых C_3 -растений на САМ-тип фотосинтеза, помогающий экономить воду в ответ на засоление и жесткий водный дефицит.

Срочная адаптация, в основе которой лежит образование и функционирование шоковых защитных систем, происходит при быстрых и интенсивных изменениях условий обитания. Эти системы обеспечивают лишь кратковременное выживание при повреждающем действии фактора, и тем

самым создаются условия для формирования более надежных долговременных механизмов адаптации. К шоковым защитным системам относятся, например: система теплового шока, которая образуется в ответ на быстрое повышение температуры; или SOS-система репарации, сигналом для запуска которой является повреждение ДНК.

Существует бесконечное множество путей адаптации растений. Тем не менее все адаптации условно можно разделить лишь на два принципиально различных типа: активную и пассивную.

Активная адаптация – формирование защитных механизмов, при этом обязательным условием выживания является индукция синтеза ферментов с новыми свойствами или новых белков, обеспечивающих защиту клетки и протекание метаболизма в ранее непригодных для жизни условиях. Конечным результатом такой адаптации является расширение экологических границ жизни растения.

Пассивная адаптация – «уход» от повреждающего действия стрессора или сосуществование с ним. Этот тип адаптации имеет огромное значение для растений, поскольку в отличие от животных они не способны убежать или спрятаться от действия вредного фактора. К пассивным адаптациям относятся, например: переход в состояние покоя; способность растений изолировать «агрессивные» соединения, такие как тяжелые металлы в стареющих органах, тканях или в вакуолях, т.е. сосуществовать с ними. Настоящим «уходом» от действующего фактора является очень короткий онтогенез растений-эфемеров, позволяющий им сформировать семена до наступления неблагоприятных условий. Однако часто растения одновременно используют как активные, так и пассивные пути адаптации. Так, например, в ответ на повышение температуры воздуха растение «уходит» от действующего фактора, понижая температуру тканей за счет транспирации, и одновременно активно защищает клеточный метаболизм от высокой температуры, синтезируя белки теплового шока.

Восприятие и проведение стрессорного сигнала в геном

Ответ на действие стрессора (адаптация) происходит, если растение распознает стрессор на клеточном уровне. Последнее приводит к активации пути передачи сигнала в геном, индуцируя или подавляя синтез тех или иных белков. В результате обмен веществ переключается на новый режим. Далее ответные реакции клеток интегрируются в ответ целого растения, который выражается, например, в ингибировании роста и развития растения и одновременно в повышении его устойчивости к действию стрессора.

Внутриклеточные системы передачи сигнала

Общая картина передачи информации внутри клетки от внешнего сигнала к эффектору пока изучена не до конца. В основе всех форм внутриклеточной регуляции лежит единый принцип – белковая молекула-рецептор «узнает» специфический для нее фактор и, взаимодействуя с ним, изменяет свою конфигурацию.

Существует 3 основных типа рецепторов, интегрированных во внешнюю клеточную мембрану: рецепторы, сопряженные с G-белками; рецепторы, ассоциированные с ферментами; рецепторы – ионные каналы.

Рецепторы, сопряженные с G-белками, представляют собой мономерные интегральные белки, полипептидная цепь которых несколько раз пересекает клеточную мембрану. Во всех случаях участок рецептора, ответственный за взаимодействие с первичным сигналом, локализован на внешней стороне мембраны, а участок, контактирующий с G-белком, на ее цитоплазматической стороне. Эти ГТФ-связывающие белки изменяют свою конформацию при связывании с ГТФ или ГДФ.

У рецепторов, ассоциированных с ферментом, имеется каталитический участок, активируемый при действии внешнего сигнала. Такие рецепторы участвуют в регуляции водно-солевого обмена. Рецепторы другой группы собственной ферментативной активностью не обладают, но способны связывать и активировать цитоплазматические (нерецепторные)

протеинтирозинкиназы, которые фосфорилируют его. В результате с рецептором связываются другие белки-мишени, которые также фосфорилируются и тем самым передают сигнал дальше.

Рецепторы – ионные каналы. Это интегральные мембранные белки, состоящие из нескольких субъединиц, полипептидная цепь которых несколько раз пересекает мембрану. Они действуют одновременно как ионные каналы и как рецепторы, которые способны специфически связывать с внешней стороны первичные сигналы, изменяющие их ионную проводимость. В отсутствие сигнала канал закрыт, он открывается при связывании с рецептором.

Таким образом, вещества, инициирующие трансмембранную передачу сигналов, активируют рецепторы, после чего активированный рецептор передает сигнал к внутриклеточным мишеням. Если мишень или эффекторный белок представлен ферментом, то сигнал увеличивает или уменьшает его каталитическую активность. Если эффекторным белком служит ионный канал, то увеличивается или уменьшается проводимость этого канала. Во всех случаях результатом будет изменение активности какой-то метаболической стадии либо концентрации в цитоплазме того или иного иона и, как следствие, возникновение клеточного ответа.

В настоящее время рассматриваются следующие пути передачи внешнего сигнала в геном.

Система передачи молекулярного сигнала гормональной или гормоноподобной природы, включающая гормон-связывающие белки, которые могут быть локализованы как на мембране, так и внутри клетки, в ядре или цитоплазме. Соединяясь с гормоном, эти белки активизируются. В активной форме они могут прямо влиять на различные геномные, мембранные и ферментативные эффекторы. Кроме того, гормон-связывающие белки могут действовать опосредованно – через вторичные мессенджеры, в результате чего происходит активация многочисленных ферментативных систем.

Вторичные мессенджеры (вторичные посредники) – внутриклеточные вещества, концентрация которых строго контролируется другими

внеклеточными сигналами – первичными мессенджерами (гормонами). Список вторичных посредников включает цАМФ, цГМФ, цГТФ, инозитол-1,4,5-трифосфат, диацилглицерин, монооксид азота (NO), фосфоинозитиды, ионы водорода, ионы кальция. Рассмотрим некоторые из них.

Аденилатциклазная система (цАМФ, цГМФ, цГТФ). Экстраклеточный сигнал (гормональной, метаболической или физической природы) меняет конфигурацию G-белка, активизирующего аденилатциклазу. Последняя синтезирует цАМФ, который, в свою очередь, активизирует циклические АМФ-зависимые киназы, фосфорилирующие пептиды. В некоторых тканях в качестве посредника передачи сигнала выступает цГМФ, который синтезируется гуанилатциклазой. Она не постоянно связана с мембраной, так что активируется не через рецепторы, а через другой посредник – ионы кальция, в силу чего цГМФ может считаться третичным посредником передачи сигнала. цГМФ в клетках часто вызывает эффекты, противоположные цАМФ (активирует G-киназу и фосфодиэстеразу, гидролизующую цАМФ).

Роль фосфорилирования белков. Протеинкиназы и фосфатазы – важные элементы регуляции внутриклеточных процессов. Поскольку белки изменяют конформацию в зависимости от фосфорилирования или дефосфорилирования, то эффективность и функциональная роль многих протеинкиназ также зависят от фосфорилирования. В регуляторных процессах протеинкиназы образуют каскад взаимосвязанных реакций. Например, MAP-киназный каскад, который состоит из трех протеинкиназ, последовательно фосфорилирующих и активирующих друг друга. Последняя стадия каскада – образование активной киназы, называемой *MAP-киназой*. Этот фермент фосфорилирует и тем самым меняет активность нескольких белков-мишеней. Каскад реакций нужен для усиления сигнала. Таким образом, в результате работы каскада в ответ на появление одной молекулы входного сигнала образуется множество молекул «сигнального» продукта, концентрацию которого можно рассматривать как выходной сигнал.

Оксид азота (NO). Он образуется при окислении аргинина или из нитрата, являясь побочным продуктом работы нитратредуктазы и является важным мессенджером при передаче сигналов и защитных реакциях. Он стимулирует высвобождение кальция из внутриклеточных депо, при этом увеличивается цитоплазматическая концентрация кальция и активируются сигнальные каскады. NO индуцирует открывание устьиц, вместе с АБК регулирует ширину устьичной щели.

Активные формы кислорода (АФК) являются одним из неспецифических признаков стрессовой реакции. Причинами увеличения содержания АФК в растительных клетках могут быть: повышение активности АФК-генерирующих ферментов (НАДФН-оксидазы, отдельных изоформ пероксидазы); снижение активности антиоксидантных ферментов; усиление образования АФК в хлоропластах и митохондриях вследствие перевосстановления их электрон-транспортных цепей. Последнее связано с угнетением фиксации углекислого газа и уменьшением энергозатрат в условиях стресса. Под влиянием АФК происходит изменение экспрессии определенных генов, которые контролируют накопление низкомолекулярных протекторов.

Основные механизмы регуляции клеточного ответа на действие стрессоров

Генетическая регуляция. Выделяют несколько уровней генетической регуляции клеточного ответа:

1. *Уровень транскрипции.* Регулируется как собственно транскрипция, так и последующий процессинг (созревание) предшественников иРНК, а также их деградация.

2. *Уровень трансляции.* Регуляции могут подвергаться собственно синтез белка и его последующий процессинг либо деградация предшественника или самого белка после завершения процессинга.

3. *Уровень зрелых белков.* Такая регуляция может реализоваться в процессах фосфорилирования-дефосфорилирования белков, а значит, в изменении их свойств, в сдвигах каталитической активности под действием вторичных мессенджеров и др. Примерами являются активирование протеинкиназы и изменения компартментации белковой молекулы при переходе из цитоплазмы в мембрану. Это ведет к нарушению свойств белков, что существенно для сигнальных функций. Наиболее часто встречается такой механизм регуляции транскрипции, как специфическое взаимодействие белковых транскрипционных факторов цитоплазмы с регуляторными участками ДНК.

Метаболическая регуляция на примере регуляции рН. Поддержание внутриклеточного рН-гомеостаза в условиях стресса приобретает особое значение, поскольку активность ферментов зависит от рН, а влияние стрессоров приводит обычно к снижению рН цитоплазмы. У растений за эту регуляцию отвечают два механизма: **биофизический** – электрогенная АТФ-зависимая протонная помпа, с помощью которой ионы водорода выводятся через мембраны наружу против электрохимического градиента, и **биохимический** – рН-чувствительные процессы карбоксилирования и декарбоксилирования органических кислот, в ходе которых продуцируется или потребляется протон.

Защеление цитоплазмы возможно не только при стрессовых воздействиях, но и в нормальных физиологических условиях, когда вход протонов преобладает над их выходом. Вероятно, поэтому растительные клетки приобрели уникальный биохимический рН-стат для поддержания протонного гомеостаза. Классический рН-стат состоит из комплекса карбоксилирующих (ФЕП-карбоксилаза) и декарбоксилирующих (НАД-малик-энзим) ферментов, различающихся по рН-оптимуму. Регуляция рН цитоплазмы происходит благодаря синтезу или распаду малата путем координации работы этих двух энзимов. Система биохимического рН-стата дополняется альтернативными путями дыхания. Например, цепь реакций от глюкозы через

ФЕП и малат до пирувата (альтернативный гликолиз) является поставщиком протонов, а дальнейший путь – до лактата или этанола (альтернативное брожение) – потребителем протонов. Их общая физиологическая функция состоит в регуляции рН и сопровождается издержками энергии.

Гормональная регуляция. Снижение уровня гормонов-стимуляторов и накопление ингибиторов роста при стрессе имеет важное адаптивное значение, поскольку приводит к снижению интенсивности обменных процессов, остановке деления и роста клеток, переходу организма в состояние покоя. В результате экономнее расходуются энергетические запасы и растение получает больше возможностей направить их на развитие адаптивных процессов. В частности, важную роль в ответе растений на многие стрессоры (обезвоживание, засоление, действие низких температур, гипо- и аноксию и др.) играет АБК. Взаимодействуя с рецептором, АБК запускает каскад трансдукционных реакций, который приводит к накоплению кальция и подщелачиванию цитоплазмы. Это, в свою очередь, активирует целый ряд протеинкиназ. В результате в цитоплазме усиливаются процессы фосфорилирования и дефосфорилирования белков. Таким образом, осуществляется регуляция активности ключевых ферментов различных метаболических путей и факторов их транскрипции. Факторы транскрипции, поступая в ядро, связываются с промоторами различных генов и приводят к их экспрессии или репрессии.

Другой гормон-ингибитор – этилен синтезируется в ответ на действие корневой гипоксии, патогенов грибкового, бактериального и вирусного происхождения, засухи, неблагоприятного температурного режима, механических повреждений, загрязнения тяжелыми металлами. Он свободно диффундирует по клеткам и быстро улетучивается. До 90% синтезированного этилена покидает растение в течение 1 минуты. Тем не менее, он успевает связаться с расположенным в цитоплазме рецептором. Система трансдукции сигнала включает ГТФ-связывающие белки, протеинкиназы и кальций. Этилен менее сильный ингибитор, чем АБК. Этилен стимулирует старение и опадание

листьев, ускоряет рост побегов при затоплении, активирует работу ферментов, участвующих в лизисе клеточных стенок и образовании аэренхимы. Этилен запускает сложную программу химической защиты растений, в частности происходит синтез фитоалексинов, играющих роль противоядия против паразитов. Таким образом, действие этилена связано с регуляцией процессов, происходящих в клеточной стенке, экспрессии генов апоптоза, стрессовых белков и взаимодействие с другими фитогормонами.

Мембранная система регуляции. Многообразные функции мембран: барьерная, транспортная, осмотическая, структурная, энергетическая, биосинтетическая, секреторная, рецепторно-регуляторная и др. – составной частью входят в регуляцию внутриклеточного обмена веществ. Мембраны, как естественный барьер, первыми подвергаются действию стрессовых факторов. Они представляют собой мишени первичного воздействия и первую линию защиты от него. Рецепторно-регуляторная функция определяется наличием в мембранах хемо-, фото-, механо- и других рецепторов белковой природы, воспринимающих сигналы из внешней среды и способствующих возникновению ответных реакций на изменение условия существования.

Сдвиги в функциональной активности мембран сопровождаются перестройками их структуры, которые в значительной мере затрагивают липиды, прежде всего жирные кислоты как наиболее лабильные компоненты. При действии стрессора могут происходить сдвиги в соотношении различных групп жирных кислот, изменяется степень их насыщенности/ненасыщенности. Возможны также изменения длины цепей жирных кислот, позиционного расположения двойных связей, количества полярных групп. Вследствие тесного взаимодействия липидных и белковых компонентов в мембранах изменения свойств липидов неизбежно должны влиять и на функции мембранных белков. Для нормального функционирования ферментных белков необходимо жидкостное состояние мембран, поэтому под влиянием липидных перестроек мембран изменяются и каталитические функции белков. Согласно жидкостно-мозаичной модели, клеточную мембрану сравнивают с "липидным

морем", в котором при различном уровне погружения, словно "айсберги", плавают белки.

Регуляторную роль в клеточном метаболизме играют и белки мембран. Помимо рецепторной функции они осуществляют регуляцию конформационных изменений мембран. С взаимодействием компонентов мембранной системы связаны межфазовые перестройки липид-белковые взаимодействия, обеспечивающие в значительной степени необходимую интенсивность метаболизма клетки и контроль за ним.

Стабилизатором клеточных мембран выступают ионы Ca^{2+} , образующие мостики между карбоксильными группами белков и полярными головками фосфолипидов. Структурные изменения в мембранах под влиянием неблагоприятных воздействий касаются освобождения связанного Ca^{2+} , что приводит к повышению проницаемости мембран при стрессовых воздействиях и влечет за собой нарушение клеточного гомеостаза.

Следовательно, мембранная система регуляции, составляющая часть комплекса систем регуляции организма, вносит свой вклад в координацию обмена веществ в условиях стресса.

Таким образом, все системы регуляции в клетке тесно взаимосвязаны. Они включаются под действием стрессовых факторов как у устойчивых, так и у неустойчивых растений. Однако у неустойчивых растений сбалансированность работы отдельных защитных реакций быстро нарушается и происходит разупорядочение обмена веществ. У приспособленных растений в процессе длительной эволюции сформировалась необходимая для выживания способность к постепенному и последовательному взаимодействию различных систем регуляции. Только согласованная работа всех систем регуляции способствует длительному существованию организма в неблагоприятных экологических условиях.

1.2. Водный дефицит и засухоустойчивость растений

Понятие о засухе и засухоустойчивости растений

Засухой обычно считается продолжительный ненормально сухой бездождный период, обусловленный высоким атмосферным давлением и сопровождающийся высокой температурой и низкой влажностью воздуха. В такой период объем испарения воды во много раз превышает количество выпавших осадков.

Часто в определениях засухи отсутствует объект воздействия засухи – само растение, которое, собственно, и является мерилем действия засушливой погоды. Правильнее называть засухой такую комбинацию атмосферных и почвенных условий, при которых происходит глубокое и длительное нарушение водного режима растений. Засуха может быть только там, где есть растения, мы познаем ее только через действие на растения. Различают атмосферную и почвенную засуху.

Атмосферная засуха возникает при недостаточной влажности воздуха и может быть вызвана сухим и горячим ветром (суховеем). Продолжительная атмосферная засуха вызывает почвенную засуху.

Причины *почвенной засухи* – длительное отсутствие дождя, испарение воды с поверхности почвы и интенсивная транспирация, сильные ветры при пониженной влажности воздуха, что приводит к обезвоживанию корнеобитаемого слоя почвы.

Есть понятие *мерзлотной засухи*, которая возникает в условиях низких температур и низкой влажности почвы и воздуха.

Как известно, разнообразные глинистые минералы и гумусовые вещества почвы – коллоиды могут удерживать значительное количество воды. Кроме того, вода входит в состав многих сложных комплексов, образующихся в почве. Такая вода называется связанной и недоступна для растений. Доступной является вода почвенного раствора, содержащаяся в капиллярах почвы, или капиллярная вода. Количество воды, которое почва способна

удержать вследствие капиллярных взаимодействий и оводнения коллоидных частиц, называется полной влагоемкостью. Она характеризует максимальное количество почвенной влаги. После атмосферных осадков в почве помимо капиллярной воды бывает много так называемой гравитационной воды. Она тоже потребляется растениями, но довольно быстро уходит в нижележащие почвенные горизонты. Почва среднего механического состава (супесчаная и суглинистая) имеет максимальную полевую влагоемкость. В глинистых почвах больше связанной воды, а в песчаных – гравитационной.

Дефицит влаги наблюдается в жаркое полуденное время, при этом увеличивается сосущая сила листьев, что активизирует поступление воды из почвы и раскрытие устьиц. Тургор листьев, потерянный днем, восстанавливается вечером и ночью. Такое состояние растений называется временным завяданием, а влажность почвы, приводящая к этому, – влажностью временного завядания. Когда запасы доступной воды в почве исчерпаны, развивается глубокое или стойкое завядание растений, в этом случае тургесцентность тканей утром не восстанавливается. Влажность почвы в этих условиях – это влажность стойкого завядания (40% от полной влагоемкости). Разность между полевой влагоемкостью и влажностью временного завядания отражает запас доступной воды в почве.

Различают 2 типа увядания – *временное* и *длительное*. Временное увядание наблюдается чаще при атмосферной засухе, когда днем транспирация увеличивается настолько, что поступающая из почвы вода не успевает восполнить ее потерю. Однако при уменьшении транспирации, например ночью, водный дефицит исчезает, тургор восстанавливается и возобновляется нормальная жизнедеятельность. Большого вреда временное завядание не приносит, но все же снижает урожай, так как какое-то время устьица были закрыты, а фотосинтез и рост останавливались.

Длительное завядание проявляется в тех случаях, когда почва не содержит доступной для растений воды. Возникший при этом в тканях растения водный дефицит не восстанавливается за ночь, и к утру клетки

растения не могут нормально выполнять свои функции. В этом случае даже низкая транспирация постепенно приводит к падению тургора во всех частях растения и уменьшению водного потенциала клеток листьев. Увядающие листья начинают оттягивать воду из верхушечных меристем побегов и корней, даже из корневых волосков, которые отмирают. В результате нарушается не только поглощение солей, но и долго не восстанавливается нормальное поступление воды после полива растений. Образование и рост органов приостанавливаются, задерживается формирование новых цветков, а имеющиеся бутоны, цветки и плоды опадают.

Влияние засухи на метаболизм растений

При недостатке воды в растениях происходят значительные изменения в обмене веществ:

- **Содержание свободной воды** в клетках уменьшается, возрастает концентрация клеточного сока и цитозоля. Гидратные оболочки белков и других полимеров утончаются или утрачиваются. Потеря гидратных оболочек у белков приводит к нарушению их третичной и четвертичной структуры и, в конечном счете, к денатурации. Активность ферментов снижается, а затем они инактивируются.

- **Проницаемость мембран возрастает.** Вследствие дегидратации мембраны утрачивают бислойные структуры и в них происходят значительные конформационные изменения. Меняется и качественный состав мембран – уменьшается количество ненасыщенных жирных кислот в составе липидных компонентов мембран. В результате уменьшается текучесть мембран и ингибируется их функциональная активность. При увеличении проницаемости плазмалемма теряет кальций, при этом улучшается ее проводимость для воды. Одновременно с транспортом воды изменяется активность цАМФ и Ca^{2+} -зависимой протеинкиназы, которые участвуют в качестве мессенджерных систем в регуляции транспорта воды. Так, для удержания воды в клетке необходимо цАМФ-зависимое фосфорилирование белков мембран, которое возможно в присутствии определенного количества кальция.

- **Преобладание гидролиза различных органических веществ над их синтезом.** В результате происходит накопление низкомолекулярных белков, усиливается гидролиз полисахаридов и увеличивается концентрация растворимых углеводов. С одной стороны, это осмотически активные вещества и увеличение их содержания способствует повышению концентрации вакуолярного клеточного сока и росту осмотического давления, а значит большему поступлению воды. С другой стороны, состав клеток меняется, значительная часть ионов выходит из клеток, что ведет к подавлению синтеза и инактивации ферментов. Гидролитические процессы активируются в первую очередь в старых листьях нижних ярусов. Интенсивный отток продуктов гидролиза в верхние более молодые листья и включение их в обмен веществ позволяют растению более экономно расходовать питательные субстраты, а опадение листьев уменьшает транспирирующую поверхность.

- **Снижается интенсивность фотосинтеза** из-за недостатка CO_2 вследствие закрывания устьиц, нарушения синтеза хлорофиллов, разобщения транспорта электронов и фотофосфорилирования, изменений в фотохимических реакциях и реакциях восстановления CO_2 , нарушения структуры хлоропластов, задержки оттока ассимилятов из листьев при длительном водном дефиците. Под влиянием засухи изменяется количественный и качественный состав пигментов. Содержание хлорофилла уменьшается, а каротиноидов, выполняющих защитную роль, может возрастать. У многих растений происходит индукция C_4 или САМ – фотосинтеза. Это обусловлено экспрессией главных ферментов альтернативных путей фиксации углекислоты: ФЕП-карбоксилазы и НАДФ-малик-энзима. Это способствует увеличению эффективности использования воды.

- **Интенсивность дыхания** значительно увеличивается, а затем снижается. Первоначальное повышение интенсивности дыхания связано с увеличением энергетических затрат на синтез осмотиков, защищающих белки

от обезвоживания. При более продолжительном воздействии происходит спад интенсивности дыхания и снижается его энергетическая эффективность в результате повреждения дыхательных систем. В начале засухи благодаря временно увеличивающейся интенсивности дыхания образуется метаболическая вода. Это один из способов приспособления к засухе.

Возрастает доля пентозофосфатного пути. Усиливается активность внемитохондриальных систем окисления в результате ослабления переноса электронов в ЭТЦ митохондрий при засухе, что связано с обеспечением детоксикации продуктов распада.

- **Изменяются соотношения гормонов** – увеличивается содержание АБК и уменьшается содержание ауксинов и цитокининов. АБК вызывает закрывание устьиц, уменьшение интенсивности транспирации, фотосинтеза. У суккулентов, наоборот, происходит увеличение содержания ауксинов и некоторое снижение содержания АБК и этилена, что позволяет растениям быстро возобновить свой рост, когда появляются дожди.

- **Тормозятся клеточное деление и особенно растяжение**, что приводит к формированию мелких клеток. Вследствие этого задерживается рост самого растения, особенно листьев и стеблей. Рост корней сначала ускоряется и снижается лишь при длительной засухе. Корни реагируют на засуху рядом защитных приспособлений: опробковением, суберинизацией экзодермы, ускорением дифференцировки клеток, выходящих из меристемы.

- **Углеводный обмен.** При затяжной и продолжительной засухе постоянный гидролитический распад приводит к истощению запаса углеводов, а в дальнейшем и макромолекул, и прежде всего белков. Поэтому возрастание количества растворимых сахаров является в известной мере индикатором, указывающим на наступление напряженного периода в жизни растений.

- **Азотный обмен.** Во время засухи происходит значительное изменение в азотном обмене растений. Установлено, что нарушения в обмене азотсодержащих веществ, связанные с распадом белка, под влиянием сильного

обезвоживания и высокой температуры, приводят к сильной дезорганизации обмена веществ в клетке. По данным многочисленных исследователей, под влиянием водного дефицита наблюдается закономерное уменьшение общего содержания азота и суммарного количества белкового азота.

Понятие засухоустойчивости и экологические группы растений с разной устойчивостью к дефициту воды

Засухоустойчивость – это способность растений в течение онтогенеза переносить засуху и осуществлять в этих условиях рост и развитие благодаря наличию ряда приспособительных свойств. По способности переносить условия засухи различают растения *гомойогидрические*, т.е. способные активно регулировать свой водный обмен, и *пойкилогидрические*, водный обмен которых определяется содержанием воды в окружающей среде. При засухе они пассивно теряют воду.

Большинство высших растений являются гомойогидрическими. Они обладают тонкими механизмами регуляции устьичной и кутикулярной транспирации, а также мощной корневой системой, обеспечивающей поставку воды. Поэтому даже при значительных изменениях влажности не наблюдается резких колебаний содержания воды в клетках.

Различают следующие экологические группы растений (по Вармингу, 1895):

1. Ксерофиты (греч. *xerox* – сухой) – растения засушливых мест – пустынь, саванн, степей, где воды в почве мало, а воздух сухой и горячий.

2. Гигрофиты (греч. *hygros* – влажный) – наземные растения, обитающие в районах с большим количеством осадков и высокой влажностью воздуха. Гигрофитам близки гелофиты – растения болот, берегов водоемов.

3. Гидрофиты (греч. *gidro* – вода) – водные растения с листьями, частично или полностью погруженными в воду или плавающими.

4. Мезофиты (греч. *mesos* – средний, промежуточный) – растения, обитающие в условиях умеренной влажности. Они более требовательны к

воде и менее устойчивы к засухе, чем ксерофиты. Эти растения оказываются в условиях засухи при длительном отсутствии дождей и могут выносить кратковременный водный дефицит и перегрев и характеризуются сбалансированным водным обменом.

По механизму приспособления к засухе ксерофиты делятся на следующие группы (по Генкелю, 1988):

1-я группа – суккуленты или псевдоксерофиты (кактусы, агавы, молодило, алоэ, очиток). Они запасают влагу в листьях, стеблях, покрытых толстой кутикулой, волосками. Эти органы становятся толстыми из-за сильно развитой водозапасающей паренхимы. После дождей в ней запасается вода, которая долгое время покрывает потребности растения. Некоторые пустынные суккуленты благодаря накопленной воде живут до 6 месяцев на полностью высохшей почве.

Другим общим признаком суккулентов является экономное расходование воды, которое достигается за счет низкой интенсивности транспирации. У кактусов небольшая интенсивность транспирации связана, во-первых, с сокращением испаряющей поверхности благодаря превращению листьев в колючки. При этом фотосинтетическую функцию листьев выполняют стебли. Во-вторых, у них не только мало устьиц, но днем они закрыты в течение длительного времени, а открываются ночью. В результате, в отличие от других растений, транспирация у суккулентов днем идет медленнее, чем ночью, тем более, что ночью температура воздуха ниже, а влажность выше, чем днем. В результате у суккулентов развивается САМ-фотосинтез, характеризующийся тем, что CO_2 поступает в листья ночью и в результате карбоксилирования ФЕП сохраняется в виде оксалоацетата, который, восстанавливаясь до малата, накапливается в вакуолях клеток листа. Использование внутренних резервов CO_2 происходит днем при закрытых устьицах. Малат из вакуоли поступает в цитоплазму, декарбоксилируется НАДФ-зависимым малик-энзимом, в результате чего образуется пируват и CO_2 . Углекислота поступает в хлоропласты и включается в цикл Кальвина. У

этих растений дыхание ночью идет до образования только органических кислот, а днем – до образования CO_2 и воды, которая получила название метаболической. Предполагают, что метаболическая вода может пополнять в тканях водные запасы суккулентов.

2-я группа – несуккулентные ксерофиты, которые по уровню транспирации делятся на 4 подгруппы:

- *эуксерофиты или настоящие ксерофиты* (полынь) с небольшими опушенными листьями. Имеют низкую транспирацию, могут выносить сильное обезвоживание, корневая система разветвлена, находится на небольшой глубине. Для них характерно экономное расходование воды благодаря регуляции работы устьиц;

- *гемиксерофиты или полуксерофиты* (шалфей, верблюжья колючка). Отличаются интенсивной транспирацией благодаря деятельности глубокой корневой системы, достигающей до грунтовых вод, и большому количеству устьиц. Транспирация способствует самоохлаждению. Полное обезвоживание без доступа корней к источнику воды гемиксерофиты переносят плохо;

- *стипаксерофиты* (степные злаки, ковыль) – быстро используют влагу кратковременных дождей, хорошо переносят перегрев, но лишь недолгое обезвоживание. У них жесткие кожистые листья с небольшим количеством устьиц. У ряда представителей этого типа сильно развита кутикула или опушение;

- *пойкилоксерофиты* (лишайники, мхи, ряд цветковых растений) не способны регулировать водный режим, поэтому теряют воду, вплоть до перехода в воздушно-сухое состояние, и при засухе впадают в анабиоз. Водный дефицит вызывает у них постепенное снижение интенсивности обмена веществ. Клетки, отдавая воду, постепенно уменьшаются в объеме.

3-я группа – эфемеры. Это растения, которые уходят от засухи. У них короткий онтогенез. Они успевают прорасти, зацвести и дать зрелые плоды в короткий дождливый отрезок времени. Некоторые эфемеры Сахары плодоносят через 8–15 дней после прорастания. Остальную часть года,

неблагоприятную для жизнедеятельности, эфемеры переносят или в состоянии зрелых семян, которым не страшно глубокое высушивание, или благодаря специальным органам, запасующим воду, – луковицам. По существу эфемеры являются мезофитами, они просто «уходят» от засухи. Например, растения степей – тюльпаны, маки, вероники.

4-я группа – эпифиты. Эти растения поселяются на стволах и побегах других растений, используя их для своего прикрепления. Они часто попадают в условия недостатка воды, потому что могут использовать только воду, стекающую по стволу, поглощать ее из влажного воздуха и собирать во время дождя в специальные органы – бульбусы. Поэтому их относят к ксерофитам. Воду они расходуют экономно.

Таким образом, эволюционные (филогенетические) адаптации ксерофитов к засухе шли по пути формирования как механизмов активной адаптации (поддержание необходимой для нормальной жизнедеятельности водности тканей; развитие приспособлений для нормального течения метаболизма в условиях деградации; эффективное восстановление (репарация) клеточных структур и функций после сильного обезвоживания), так и механизмов пассивной адаптации (быстрое завершение онтогенеза до наступления засушливого периода).

Механизмы устойчивости растений к водному дефициту

Сигнал засухи воспринимается осмосенсорами, которыми могут быть механические изменения плазмалеммы или состояния цитоскелета, накопление активных форм кислорода. Трансдукция сигнала в ядро связана с участием ионов кальция, инозитольного цикла, фосфорилированием, которое осуществляется Са- или MAP-зависимыми протеинкиназами. В результате передачи сигнала в ядро происходят изменения экспрессии генов, которые влекут за собой биохимические и физиологические изменения – синтез стрессовых белков и повышение засухоустойчивости.

Механизмы устойчивости функционируют на уровне клетки, организма и

популяции. К *клеточным механизмам* устойчивости относятся: осмотическая регуляция, стабилизация клеточных мембран, перестройки в процессе фотосинтеза и дыхания, детоксикация токсических продуктов обмена, изменение гормональной регуляции обмена веществ, перестройки в работе генетического аппарата, направленные на регуляцию синтеза стрессовых белков.

На уровне клетки большую роль в обеспечении высокого водного потенциала играет осмотическая регуляция. *Осмолиты* образуют группу химически разнообразных низкомолекулярных органических соединений (моно- и олигосахариды, аминокислоты, в первую очередь пролин, производные аминокислот – бетаины, многоатомные спирты – маннитол, пинитол, сорбитол, арабитол). Они хорошо растворяются в воде, нетоксичны и не вызывают изменений в метаболизме, поэтому получили название совместимых веществ. Совместимые вещества при физиологических значениях рН являются нейтральными. В цитоплазме они находятся в недиссоциированной форме, либо в форме молекул, несущих положительный и отрицательный заряды, которые пространственно разделены. Некоторые осмолиты являются амфифильными соединениями, т.е. имеют как неполярные (гидрофобные), так и полярные (гидрофильные) группы. Увеличение концентрации осмотически активных соединений без изменения объема клеток и падения тургора называют *осмотическим регулированием*.

Наряду с осморегуляцией совместимые вещества выполняют еще одну очень важную функцию – защитную, или протекторную по отношению к цитоплазматическим биополимерам. Поэтому осмолиты называют еще осмопротекторами. Считается, что осмопротекторы не разрушают гидратные оболочки биополимеров. Например, ионы Na^+ , Cl^- могут проникать через гидратную оболочку белков и влиять на нековалентные связи, которые поддерживают структуру белковой молекулы. Пролин и глицин-бетаин не проникают через гидратную оболочку и не вступают в прямой контакт с

белком, но создают препятствие для разрушения ионами гидратной оболочки белка и его денатурации.

Пролин называют индикатором стресса, поскольку его содержание возрастает в десятки и сотни раз в условиях засухи, засоления, действия высоких и низких температур и других повреждающих факторов. Исходными веществами для синтеза пролина являются глутамат или орнитин. Источником пролина также может быть усиленный гидролиз белков в результате освобождения протеаз от белка-ингибитора под действием стрессора. Сложилось мнение, что свободный пролин при стрессе обладает полифункциональным биологическим эффектом – осмопротектор, стабилизатор макромолекул и мембран, дополнительный источник энергии и азота, антиоксидант и др.

Глицин-бетаин образуется в клетках многих водорослей и высших растений. Он образуется в хлоропластах из холина, входящего в состав фосфолипидов. Накопление глицин-бетаина в клетках способствует повышению засухо- и солеустойчивости растений. Такие растения поддерживают относительное содержание воды и тургорное давление на более высоком уровне, а также осуществляют фотосинтез с большей скоростью, чем растения, не накапливающие глицин-бетаин.

Важную роль выполняют *растворимые сахара*. Они перехватывают ОН-радикал и тем самым снижают токсичность АФК-генерирующей системы, предотвращая повреждения биомолекул этим радикалом. Оказывают антиденатурационное действие на белково-липидный комплекс мембран, испытывающих дегидратацию, образуя связи между кислородными атомами фосфатов в составе фосфолипидов и гидроксилами сахаров, а также замещают молекулы воды в структуре фосфолипидов при стрессах, сопровождающихся обезвоживанием.

Сахароза образует комплексы с ИУК, в результате гормон теряет активность, что является одной из причин торможения роста и повышает устойчивость.

Некоторые низкомолекулярные органические соединения (диамин *путресцин* и образующиеся из него полиамины – *спермидин* и *спермин*) образуются в клетках в количествах, недостаточных для выполнения осморегуляторной функции. Они играют важную роль при стрессах как протекторы биополимеров. Они стимулируют синтез ДНК, РНК и белков. Полиамины несут положительные заряды и поэтому обладают высоким сродством к биомолекулам с отрицательными зарядами, в частности к ДНК, РНК, фосфолипидам и кислым белкам, а также к анионным группам компонентов мембран и клеточных стенок, и таким образом предотвращают повреждения биомолекул, вызываемые различными стрессорами, активируют активность индуцибельных генов многих видов стрессовых воздействий. В растениях полиамины вовлечены во многие физиологические процессы, включая клеточное деление, формирование цитоскелета, инициацию роста корней эмбриогенез и созревание плодов.

Роль стрессовых белков при засухе

В условиях водного дефицита активируется синтез различных стрессовых белков, в том числе и белков, удерживающих воду и ионы. Так, в клетках при засухе накапливается *осмотин*. Его содержание может составлять 12% общего содержания белка. Он локализован в вакуолях и везикулах тонопласта.

При обезвоживании синтезируются белки-дегидрины *семейства LEA* или *белков позднего эмбриогенеза*. Все LEA-белки локализованы преимущественно в цитоплазме и содержат гидрофильные аминокислоты, т.е. обладают повышенной способностью удерживать молекулы воды. В настоящее время выделено 5 групп этих белков, каждая из которых характеризуется определенными структурными и функциональными особенностями. Так, LEA-белки 1-й группы характеризуются высоким содержанием заряженных аминокислот и глицина, что позволяет им эффективно связывать воду. Белки 2-й группы выполняют функции

шаперонов: образуя комплексы с другими белками, они предохраняют последние от повреждений в условиях деградации клетки. LEA-белки 3- и 5-й групп участвуют в связывании ионов, которые концентрируются в цитоплазме при потере клетками воды и таким образом обезвреживают их. LEA-белки 4 группы могут замещать воду в примембранной области и этим поддерживать структуру мембран при дегидратации.

Стрессовые условия активируют в клетках биосинтез *шаперонов* – белков, предотвращающих ошибки в сворачивании полипептидов при формировании третичной структуры, а также в сборке белковой молекулы из субъединиц при формировании четвертичной структуры. Некоторые шапероны играют роль ремонтных станций, исправляющих неверное сворачивание. Одна из главных функций шаперонов – сворачивание и разворачивание белков при их транспорте через мембраны, поскольку полипептидная цепь может пройти через пору в мембране лишь в развернутом виде.

При дегидратации клеток тенденция к повреждениям и денатурации белков усиливается, поэтому защитная роль шаперонов в этих условиях возрастает. Шапероны в состоянии долгое время поддерживать целостность ДНК даже при абсолютном обезвоживании. Сохранение генетического аппарата клетки важно не только для синтеза стрессовых белков, но и успешного восстановления метаболизма после засухи.

При осмотическом стрессе происходит индукция биосинтеза *ингибиторов протеаз*, препятствующих протеолитическому расщеплению белков, которые при дегидратации клетки сохраняют свою структуру и функциональные свойства.

Протеазы и убиквитины. При обезвоживании клеток, несмотря на действие защитных низкомолекулярных соединений и шаперонов, часть клеточных белков подвергается денатурации. Денатурированные белки должны быть гидролизованы. Эту функцию выполняют протеазы и убиквитины, экспрессия генов которых также индуцируется стрессорами. Убиквитины – это низкомолекулярные (8.5 кД) высококонсервативные белки.

Присоединяясь к N- концу денатурированного белка, они делают белок доступным для действия протеаз. В результате осуществляется селективная деградация денатурированных белков.

Аквапорины – белки, образующие водные каналы, через которые происходит трансмембранное движение воды. За счет изменения числа водных каналов в мембране и их проводимости осуществляется быстрая регуляция трансмембранных потоков воды, это особенно важно при водном дефиците. Во время засухи содержание аквапоринов возрастает не только в плазматической мембране, но и тонопласте. Это способствует увеличению водной проводимости тонопласта. Изменение активности уже существующих в мембране водных каналов играет важную роль в регуляции водной проводимости мембран при стрессах. Одним из механизмов такой регуляции является фосфорилирование и дефосфорилирование аквапоринов.

1.3. Гипертермия и жароустойчивость растений

Диапазон температур, действующих в природе на растения, достаточно широк: от -77°C до $+55^{\circ}\text{C}$, т.е. составляет 132°C . Для большинства культурных растений интервал между максимальной и минимальной температурами, при которых растения способны к интенсивному росту, составляет приблизительно 30°C . Из цветковых растений наиболее устойчивы суккуленты. Некоторые кактусы и представители семейства толстянковых могут выдерживать нагревание солнечными лучами до $+55 - +65^{\circ}\text{C}$. Из культурных растений жароустойчивостью обладают теплолюбивые растения южных широт – сорго, рис, хлопчатник, клещевина. Для каждого вида имеется интервал температур, когда интенсивность физиологических процессов максимальна. Большинство растений повреждается при температуре $+35 - +40^{\circ}\text{C}$. В покоящемся состоянии клетки могут переносить экстремально высокие температуры. Так, пребывание семян несколько часов при температуре около 100°C не приводит к значительному снижению их

жизнеспособности.

Растения относят к *ограниченно пойкилотермным организмам*, поскольку они способны частично регулировать температуру своих тканей за счет транспирации. Иногда температура тканей растения может быть выше температуры окружающего воздуха. Например, днем при нагревании солнечными лучами температура листьев при безветренной погоде обычно бывает выше температуры воздуха на 4–7°C.

Под влиянием внешних факторов устойчивость растений к температурному фактору может меняться. Повреждающее действие во многом определяется не только абсолютным значением, но и продолжительностью действия высоких температур.

Устойчивость растений к высоким температурам называют *жароустойчивостью* или *термотолерантностью*. Повышенная температура особенно опасна для растений при сильной освещенности. Существует определенная связь между условиями жизни растений и их жароустойчивостью. Чем суше местообитание и чем выше температура воздуха, тем больше жароустойчивость организма. Жароустойчивость изменяется в ходе онтогенеза у растений. Молодые, активно растущие растения менее устойчивы, чем старые. Органы растений различаются по своей жароустойчивости: наиболее устойчивы побеги и почки, менее устойчива корневая система.

Влияние гипертермии на метаболизм растений

Прежде всего температура влияет на скорость диффузии и, как следствие, на скорость химических реакций (прямое влияние). Кроме того, она вызывает изменение структуры белковых макромолекул (косвенное влияние). Это приводит не только к изменению активности ферментов, но и к увеличению проницаемости мембран, нарушению гомеостаза, изменению взаимодействия между липидами, комплементарными цепями нуклеиновых кислот и белками, гормонами и рецепторами. Денатурация белков и

нарушения структуры мембран являются первыми звеньями повреждения клеток при высокой температуре.

Одним из важнейших типов приспособительных реакций организмов к изменяющимся температурным условиям является изменение *каталитических свойств ферментов* в результате модификаций их молекул. Скорость ферментативной реакции зависит от величины энергии активации субстрата. Скорость реакции тем выше, чем ниже энергия активации. Функция ферментов состоит в снижении энергии активации ферментативных реакций. Чем выше эффективность фермента, тем до более низкого значения снижается энергия активации реакции.

Конформационные изменения фермента в ходе каталитической реакции сопровождаются разрывом или образованием слабых связей (водородных, электростатических, ван-дер-ваальсовых и гидрофобных), при этом освобождается или поглощается энергия. Энергетические сдвиги, связанные с изменением конформации, лежат в основе различий в величинах энергий активации ферментативных реакций. Для конформационных изменений ферментов с более гибкой структурой при катализе требуется меньше энергии. У фермента с жесткой структурой конформационные изменения невозможны. Такой фермент был бы стабильным и долговечным, но не реакционноспособным. У функционально активного фермента должно существовать равновесие между его стабильностью и гибкостью. Ферменты организмов, приспособленных к высоким температурам, для сохранения структурной целостности и функциональной активности должны иметь более жесткую структуру, тогда как для ферментов организмов, приспособленных к низким температурам, необходима повышенная гибкость.

Стратегия приспособления к тому или иному температурному диапазону состоит в изменении числа или типа слабых взаимодействий в молекуле фермента. Приспособление к более высоким температурам связано с приобретением одной или нескольких дополнительных слабых связей. Например, увеличение числа солевых мостиков всего на одну или две

дополнительные электростатические связи служит универсальным механизмом повышения термоустойчивости фермента. Дополнительные связи повышают термостабильность белка и в то же время снижают его каталитическую эффективность (увеличивают энергию активации). Разновидности ферментов, осуществляющих эффективный катализ при изменении температурных условий, появляются в результате модификаций их первичной структуры. Это происходит в эволюционном масштабе времени в результате индукции стрессовых генов и приводит к появлению новых форм белка (изоферменты) и соответственно новых признаков (адаптация).

Многие растения способны компенсировать влияние температуры на скорость биохимических реакций путем изменения содержания ферментов в клетках. В первую очередь это относится к ферментам, лимитирующим скорость ключевых процессов метаболизма, например фотосинтеза и дыхания.

Важное значение имеет рН среды, в которой фермент функционирует. При повышении температуры в клетках растений снижается рН цитоплазмы.

Непосредственной реакцией на температурное воздействие является изменение *текучести мембран*. Под влиянием высокой температуры в мембранах увеличивается количество ненасыщенных фосфолипидов. При этом водородные и электростатические взаимодействия между полярными группами белков внутри жидкой фазы мембраны падают и интегральные белки сильнее взаимодействуют с липидной фазой. В результате состав и структура мембраны изменяются и, как следствие, происходит увеличение проницаемости мембран и выделение из клетки водорастворимых веществ. Повышенная текучесть мембранных липидов при высокой температуре может сопровождаться потерей активности связанных с мембранами ферментов и нарушением работы переносчиков электронов.

Происходит *активация гидролиза* основных полимеров органических веществ. Гидролиз оказывается более мощным, чем в условиях засухи. Поэтому распад белков, может привести к накоплению аммиака до токсичного для растений уровня. Нарушается транспорт воды, поглощение веществ

корнем, отток ассимилятов из листьев.

Тормозятся обе стадии **фотосинтеза**, как световая, так и темновая. Особенно чувствительным к высокой температуре является транспорт электронов в фотосистеме II. При гипертермии наблюдается денатурация отдельных ферментов фотосинтеза. Поскольку фотосинтез ингибируется при более низкой температуре, чем дыхание, то это приводит к дефициту субстратов для дыхания.

Наступает временная активация **дыхания**, которая быстро сменяется инактивацией. Увеличивается доля альтернативного пути дыхания, в котором энергия окисления рассеивается в виде тепла. Дисбаланс между фотосинтезом и дыханием выступает одной из основных причин повреждающего действия температурного стресса, что особенно характерно для C_3 растений.

Усиливается **микросомальное окисление**, особенно растет перекисное окисление липидов. В результате происходит расточительное расходование субстратов, еще большее нарушение целостности мембран, что в совокупности с активацией альтернативного пути дыхания усугубляет процессы деструкции.

Продолжительное действие или действие очень высокой температуры вызывает **тепловой шок**. Происходит термоинактивация ферментов. В клетках начинается плазмолиз. Клеточный сок выходит из вакуоли, что заканчивается коллапсом клетки. На листьях появляются некротические пятна – «ожоги».

Высокая температура нарушает опыление и оплодотворение, что приводит к недоразвитию семян. У многих растений высокие температуры в период цветения вызывают стерильность цветков и опадение завязей.

Механизмы приспособления растений к высоким температурам

В процессе эволюции были сформированы генетические механизмы, повышающие устойчивость растений к высоким температурам. Как и при других воздействиях, при высоких температурах работают защитные механизмы двух типов: избежание перегрева и приспособление к

существованию в условиях высоких температур. Избежание перегрева достигается:

1. Анатомические приспособления. Листья имеют ксероморфную структуру. Они могут быть свернуты, ориентированы вертикально, покрыты волосками или воском. Обычно листья кожистые, имеют мало устьиц, часто устьица погружены. В листьях много слоев палисадной паренхимы, эпидермис тоже многослойный. Все эти приспособления обеспечивают отражение интенсивной солнечной радиации и снижение потерь воды при испарении.

2. Усиленная устьичная транспирация. Растения от действия высокой температуры предохраняет интенсификация испарения воды в ходе устьичной транспирации. Растение активизирует поглощение воды, ее транспорт и испарение, в результате лист охлаждается.

3. Стабилизация мембран. Поддержание жидкокристаллического состояния имеет решающее значение для функционирования локализованных в мембране белков: ферментов, водных и ионных каналов, различного вида переносчиков, компонентов ЭТЦ и т.д. Повышение температуры приводит к сверхвысокой текучести липидов и дезинтеграции мембран, поэтому у термоустойчивых растений модификации липидов направлены на повышение структурной прочности бислоя и повышение температуры фазового перехода липидов.

Температура фазового перехода и сопровождающее его изменение вязкости зависят от длины углеводородных цепей и числа двойных связей жирных кислот, входящих в состав липидов. Наличие двойных связей уменьшает энергию стабилизации бислоя, т.е. делает мембрану более текучей.

Приспособление к повышенным температурам связано с включением в липиды жирных кислот с более длинными углеводородными цепями и с меньшим числом двойных связей. Этот процесс контролируется с помощью ряда ферментов. К ним относятся десатуразы, тиоэстеразы и элонгазы.

Десатуразы жирных кислот образуют семейство ферментов, катализирующих превращение одинарных связей в ацильных цепях жирных

кислот в двойные связи (десатурация). Десатурация требует молекулярного кислорода и протекает в аэробных условиях.

Тиоэстеразы и элонгазы, определяют число углеродных атомов в цепях жирных кислот. Тиоэстеразы отвечают за терминацию удлинения ацильной цепи и обеспечивают преимущественное накопление C_{8-10} , C_{12} , C_{14} и C_{16-18} жирных кислот. Элонгазы осуществляют удлинение цепи жирных кислот до 20, 22 и 24 углеродных атомов.

Жаростойкие растения отличаются также следующими **биохимическими особенностями**: значительным содержанием прочносвязанной воды, что приводит к высокой вязкости цитоплазмы; наличием тех же осмотически активных веществ, что и у засухоустойчивых растений: пролина, бетаинов, многоатомных спиртов, углеводов и гидрофильных олигопептидов; повышенным содержанием органических кислот, которые связывают аммиак; обезвреживанием продуктов перекисного окисления липидов с помощью системы антиоксидантов.

Белки теплового шока (БТШ)

БТШ растений, как и других организмов, множественны. Они представлены группами высокомолекулярных (60–110 кД) и низкомолекулярных (15–35 кД) белков. При двухмерном электрофорезе каждая группа БТШ делится еще на несколько представителей. Это определяется, с одной стороны, тем, что каждое семейство БТШ кодируется, как правило, несколькими генами (семейством близких генов), различающимися главным образом регуляцией их активности, а с другой стороны, модификациями БТШ после завершения их синтеза. К числу таких модификаций относится, например, обратимое фосфорилирование. В настоящее время выделяют 5 групп белков теплового шока, которые обозначаются по молекулярным массам их основных компонентов: БТШ-90, БТШ-70, БТШ-60, БТШ-20 и БТШ-8.5.

В индукции ответа растений на тепловой шок центральное место отводится фосфорилированию/ дефосфорилированию транскрипционного

фактора, воспринимающего температурный сигнал и приобретающего способность связываться с промоторными участками генов теплового шока и активировать их работу. Синтез БТШ происходит, когда температура поднимается на 8–10⁰ С выше нормальной. В клетках растений мРНК, кодирующие синтез БТШ, обнаруживаются уже через 3–5 минут после действия стрессора. Тепловой шок вызывает не только перепрограммирование генома и, следовательно, изменение состава вновь синтезируемых мРНК, но и распад тех полисом, которые синтезируют белки, типичные для нормальных условий обитания, и формирование полисом, синтезирующих БТШ.

Максимальное содержание БТШ наблюдается через 0.5–3.5 ч. При этом каждая клетка синтезирует десятки тысяч копий различных молекул белков теплового шока, затем их количество начинает уменьшаться, т.е. синтез БТШ имеет кратковременный характер.

После окончания теплового шока синтез БТШ прекращается и возобновляется синтез белков, характерных для клетки в нормальных условиях.

Длительное пребывание клеток в условиях высокой температуры обычно приводит к ослаблению или прекращению синтеза БТШ. В этом случае включаются механизмы регуляции экспрессии генов БТШ по принципу обратной связи. Накопление в клетках БТШ выключает активность их генов, т.е. клетка поддерживает количество БТШ на необходимом уровне, препятствуя их сверхпродукции.

Защитная роль практически всех групп БТШ описывается моделью молекулярного «шаперона». В соответствии с этой моделью БТШ повышают термоустойчивость клеток, обеспечивая следующие процессы:

- 1) АТФ-зависимую стабилизацию нативной пространственной структуры белков, необходимую для проявления их биологической активности;
- 2) правильную сборку олигомерных структур в условиях гипертемии;
- 3) стабилизацию при стрессе ферментов и мРНК, участвующих в

синтезе белков «нормального» клеточного метаболизма;

4) транспорт веществ через мембраны, например, хлоропластов, митохондрий;

5) дезагрегацию неправильно собранных макромолекулярных комплексов;

6) «освобождение» клетки от денатурированных макромолекул и реутилизацию входивших в них мономеров с помощью убиквитинов.

Убиквитин также относится к БТШ. После присоединения этого белка к N-концу полипептида последний становится мишенью для разрушения протеазами. Это «метка смерти» для белков, и при ее помощи происходит выбраковка поврежденных, недостроенных и функционально неактивных полипептидов. Ассоциированные с убиквитином белки подвергаются ферментативной модификации. После этого они опознаются специальными нелизосомальными протеазами и гидролизуются в особых мультикомпонентных комплексах, протеасомах.

1.4. Гипотермия и холодоустойчивость растений

Внешние проявления действия пониженных температур на растения:

1) замедление прорастания семян, так как происходит торможение поглощения воды, снижение активности ферментов и замедление развития зародыша;

2) торможение роста и развития. Замедляется скорость деления, растяжения и дифференциации клеток. При этом нарушается соотношение между ростом корней и надземных органов;

3) повреждение тканей, которое выражается в хлорозе (побелении, пожелтении) листьев, что является следствием разрушения хлорофилла. При резком и сильном охлаждении, не достигающем, однако, до замерзания, наблюдается потеря тургора и завядание.

У травянистых обычно более чувствительны к холоду старые органы, а у древесных – молодые. У некоторых растений раньше повреждаются листья (огурцы), а у других – стебель (кукуруза, гречиха).

Понятие низкотемпературного стресса включает в себя всю совокупность ответных реакций растений на действие холода или мороза, причем реакций, соответствующих генотипу растений и проявляющихся на разных уровнях организации растительного организма от молекулярного до организменного.

Холодостойчивость – способность теплолюбивых растений переносить действие низких положительных температур. Холодостойкими называются растения, которые не повреждаются и не снижают своей продуктивности при температуре от 0 до +10°C.

Для большинства сельскохозяйственных культур низкие положительные температуры почти безвредны. Отдельные органы теплолюбивых растений обладают разной устойчивостью к холоду. У кукурузы и гречихи быстрее всего отмирают стебли, у риса менее устойчивы листья, у сои сначала повреждаются черешки, а затем листовые пластинки, у арахиса наиболее чувствительна к холоду корневая система.

Влияние низких положительных температур на физиолого-биохимические процессы у растений

Повышение проницаемости мембран. Эта реакция присуща первичным механизмам воздействия холода. Изменение состояния мембран при низкой температуре в значительной мере связано с потерей ионов кальция. При этом различные ионы, в первую очередь калия, а также органические кислоты и сахара выходят из цитоплазмы в клеточную стенку или межклетники. Концентрация кальция в цитоплазме повышается, при этом активируется Н⁺-АТФ-аза. Активный транспорт протонов запускает вторичный активный транспорт, и ионы калия возвращаются в клетку. В результате увеличивается поглощение воды и тех веществ, которые вышли из клетки. При действии более низкой температуры потеря мембранами ионов кальция очень велика. В

результате сильного воздействия количество ионов кальция в цитоплазме увеличивается и мембранные структуры нарушаются, так же как и функции мембраносвязанных энзимов. H^+ -АТФ-аза инактивируется, а фосфолипиды, наоборот, активируются, что вызывает утечку ионов и стимулирует деградацию мембранных липидов. В этом случае повреждения становятся необратимыми.

Изменение проницаемости мембран связано также со сдвигами в жирнокислотных компонентах: насыщенные жирные кислоты из жидкокристаллического состояния переходят в состояние геля раньше, чем ненасыщенные. Поэтому чем больше в мембране насыщенных жирных кислот, тем она жестче, т.е. менее лабильна. При увеличении уровня ненасыщенных жирных кислот удавалось снизить чувствительность к понижению температуры.

Дезинтеграции мембран способствует и увеличение содержания свободных радикалов, свидетельствующее об усилении перекисного окисления липидов. Нарушение целостности мембран ведет к распаду клеточных структур: митохондрии и хлоропласты разбухают, в них уменьшается число крист и тилакоидов, появляются вакуоли.

Вследствие дезинтеграции тилакоидных мембран хлоропластов нарушается фотосинтез. Происходит разобщение транспорта электронов и фотосинтетического фосфорилирования, повреждаются ферменты цикла Кальвина. Снижается энергетическая эффективность дыхания, изменяется соотношение путей дыхания в пользу пентозофосфатного цикла и альтернативного пути дыхания.

При воздействии холода *усиливаются гидролитические процессы*, в результате накапливаются небелковый азот (пролин и другие азотистые соединения) и моносахара. Тормозится рост, поскольку изменяется баланс фитогормонов – содержание АБК (преимущественно у устойчивых сортов и видов) возрастает, а ауксина убывает.

Продолжительное действие низких температур приводит растение к гибели. Основные причины отмирания растений: необратимое увеличение

проницаемости мембран, повреждение метаболизма клетки, накопление токсических веществ.

Механизмы холодоустойчивости растений

Повышение устойчивости к низким температурам связано с предотвращением или устранением указанных выше причин повреждения и гибели растений. Мембраны устойчивых растений более стабильны, чем неустойчивых, поэтому потери кальция и нарушение их проницаемости меньше. За счет поддержания активности десатураз жирных кислот обеспечивается длительное поддержание ненасыщенности жирных кислот фосфолипидов и таким образом достигается защита мембран.

Ферменты холодоустойчивых растений активны в широком диапазоне температур, а оптимальная температура у них ниже, чем у ферментов теплолюбивых видов. В результате довольно долго поддерживается интенсивность синтетических процессов, в том числе и синтез ненасыщенных жирных кислот, для нормального протекания которого необходимо достаточное количество НАДФН. Роль основного поставщика НАДФН в условиях гипотермии выполняет пентозофосфатный цикл, который активируется у холодоустойчивых растений в отличие от теплолюбивых.

Повреждения фотосинтеза у холодоустойчивых растений также наблюдаются при большей продолжительности и силе воздействия. Транспорт метаболитов в листьях поддерживается в широком диапазоне температур и дольше сохраняются донорно-акцепторные отношения. Кроме того, холодоустойчивые растения имеют достаточно большой запас сахаров, что позволяет длительное время поддерживать дыхание, различные биосинтезы, а также использовать сахара для защиты от повреждения холодом.

В ходе холодового воздействия синтезируются и стрессовые белки холодового шока. К протекторным белкам относятся и десатуразы.

Устойчивые растения успешнее справляются и с детоксикацией токсических продуктов распада. Аммиак связывается у них органическими

кетокислотами, образование которых в процессе дыхания стимулируется при стрессе.

Влияние низких отрицательных температур

Гибель растений при низких отрицательных температурах связана с образованием льда внутри клеток (в цитоплазме, вакуолях) и межклетниках. Это происходит обязательно при наличии нуклеаторов любой природы. Нуклеаторы льда могут различаться по составу и изменяться в течение года, как по количеству, так и по активности, и являются результатом появления комплексов, инициирующих этот процесс. Установлено, что высоко разветвленные молекулы полисахаридов могут функционировать в качестве антинуклеаторов и снижать температуру нуклеации льда в растворах до минус 7°C.

Предполагают 3 типа образования льда: внутриклеточный, внеклеточный и внеорганный.

Внутриклеточное образование льда всегда летально для всех растений. Причиной гибели клеток является механическое разрушение под влиянием образовавшихся кристаллов льда. При длительном действии мороза кристаллы вырастают до значительных размеров и могут не только сжимать клетки, но и повреждать плазмалемму.

В природе наиболее распространено внеклеточное образование льда. Это единственно возможный путь для выживания растений после длительного зимнего периода. Внеорганный тип присущ только меристематическим тканям, не имеющим внеклеточных пространств и вакуолей. Они являются менее оводненными по сравнению с дифференцированными клетками. Все это создает условия транспорта воды из меристематических клеток к центрам кристаллизации льда в других тканях. Такой путь образования льда наиболее безопасен.

Вследствие оттягивания воды из клеток образующимися в межклетниках кристалликами льда возникает обезвоживание. Это особенно опасное при

длительном действии низких температур и сходно с обезвоживанием при засухе.

Таким образом, основные причины гибели клетки при низких отрицательных температурах состоят в обезвоживании и механическом сжатии льдом, повреждающим клеточные структуры.

Основное негативное влияние низких температур – повреждения мембранных систем активного транспорта, а также липидных компонентов мембран. Происходит денатурации мембранных белков, связанная с дегидратацией и высаливанием макромолекул, что способствует инактивации активного транспорта (АТФ-аз тонопласта и плазмалеммы). Мембранно-связанные ферментативные системы являются наиболее чувствительными в клетке. Их инактивация вызывается накоплением вплоть до токсических концентраций неорганических и органических веществ, образующихся вследствие дегидратации клеток в процессе замерзания.

Потеря мембранами свойства полупроницаемости определяет дельнейшие повреждения клеток.

Изменения в белках и липидах вызывают различного рода нарушения метаболизма, и одно из них – подавление биохимической и фотохимической активности хлоропластов. В частности, снижается скорость ассимиляции углерода (темновая стадия). Происходит также подавление фотофосфорилирования, что связано со снижением АТФ-синтазной активности, что приводит к падению уровня АТФ. Такой эффект наблюдается при отрицательных и низких положительных температурах, а также при засухе и почвенном засолении.

Ингибирование ферментов служит причиной повреждения метаболизма клеток: нарушается фото- и окислительное фосфорилирование, усиливается гидролиз фосфолипидов, повышается активность фосфолипаз.

Физиологические и молекулярные механизмы адаптации к отрицательным температурам

Морозоустойчивость – это способность растений переносить без необратимых вредных последствий отрицательные температуры. Отрицательные температуры являются мощным эволюционным фактором, выбраковывающим случайные виды и формирующим тип растительности в соответствии с определенными условиями существования.

Устойчивость к низким отрицательным температурам – это один из показателей зимостойкости, т.е. способности растений переносить неблагоприятные условия перезимовки (вымерзание, выпревание, ледяную корку, выпирание и др.). В этом случае к названным выше повреждающим факторам добавляется образование льда и вызванный им сильный дефицит воды.

Механизм устойчивости растений к низким температурам представляет собой целый комплекс адаптивных реакций, выработанных в процессе эволюции, и включает следующие процессы:

1. Накопление криопротекторов – сахаров, спиртов (глицерол, сорбитол, маннитол), аминокислот (пролин), которые способствуют снижению точки замерзания. Сахара также препятствуют образованию или уменьшают количество токсических веществ, образующихся при обезвоживании клеток из-за образования льда. Сахара являются главным дыхательным субстратом, являющимся источником энергии для синтезов, происходящих в первый период закаливания. К полимерам-криопротекторам относятся также молекулы гемицеллюлоз (ксиланы, арабиноксиланы). Накапливаясь в клеточной стенке, они обволакивают кристаллы льда и тормозят их рост.

2. Изменение состава мембранных липидов и увеличение текучести мембран. Защитной реакцией является увеличение количества ненасыщенных жирных кислот в липидах, т.е. происходит активация десатураз.

3. Ограничение роста внеклеточного льда и синтез антифризных белков, которые тормозят рост кристаллов льда, не влияя при этом на температуру замерзания раствора. Антифризные белки связываются с кристаллами льда, предотвращая или замедляя их дальнейший рост. Эти белки аккумулируются прежде всего в апопласте во время адаптации к холоду. Например, у растений озимой ржи обнаружено 6 антифризных белков с молекулярной массой от 16 до 35 кД. У чувствительных к морозу растений такие белки обычно не обнаруживаются.

4. Синтез стрессовых белков холодового ответа:

- COR-белки. Наиболее изучены COR-белки арабидопсиса, кодируемые четырьмя семействами генов. Один из COR-генов экспрессируется в ответ на низкую температуру, засуху и АБК. Кодируемый этим геном белок синтезируется в цитоплазме и затем транспортируется в хлоропласт. Этот белок повышает криостабильность плазмалеммы, а также хлоропластных мембран, но не влияет на морозоустойчивость целого растения. Повышение устойчивости к низким температурам всего растительного организма зависит от одновременной работы всех имеющихся COR-генов.

- Дегидрины – это аналоги LEA-белков. Они синтезируются в ответ на водный дефицит, который является составной частью холодового шока. Один из механизмов защитного действия дегидринов при стрессе – преимущественная гидратация макромолекул, вследствие чего предотвращается локальная дегидратация и денатурация белков. Другой путь защитного воздействия дегидринов – наличие шаперонной активности, предотвращающей денатурацию белков при действии отрицательных температур. Предполагается, что дегидрины взаимодействуют с липидами мембран, подавляя фазовый переход липидного слоя или уменьшая перекисное окисление.

- Разобщающие стрессовые белки. Эти белки разобщают окисление и фосфорилирование в митохондриях, что способствует стабилизации температурного режима в течение некоторого времени и подготовке к

действию отрицательной температуры. К ним относятся цианидрезистентная оксидаза, PUMP-белки (plant mitochondrial uncoupling proteins) – растительные митохондриальные разобщающие белки, БХШ 310.

Среди белков холодового стресса есть и ферменты антиоксидантной защиты, различные гидролазы, а также ферменты биосинтеза веществ – криопротекторов.

Таким образом, морозоустойчивость растений – состояние не постоянное, оно может изменяться в течение небольшого периода. Ее можно увеличить закаливанием, но можно и снизить действием определенных факторов (вода, температура, свет). Не все растения способны закаливаться, вследствие этого различные сорта озимых культур обладают неодинаковой морозоустойчивостью.

Морозоустойчивость зимующих растений неодинакова в течение года: она повышается в зимнее время и понижается весной и летом. Причиной этих изменений является закаливание, которое растения проходят при подготовке к зимнему периоду.

Закаливание – процесс обратимого физиологического приспособления растений к неблагоприятным условиям внешней среды. Это активный метаболический процесс, а не замедление жизнедеятельности, хотя он и связан с резким снижением темпов роста и переходом растения в покоящееся состояние. Закаливание озимых впервые было исследовано И.И. Тумановым (1940). Он выделил две его стадии. Первая протекает в период, когда дневные температуры еще относительно высоки ($+10^{\circ}\text{C}$), а ночные падают до $0 - -2^{\circ}\text{C}$. В это время в процессе фотосинтеза происходит активное накопление сахаров (до 25 – 30% на сухую массу растений). Накапливаемые сахара не расходуются при дыхании, так как ночные температуры низки для активного дыхания. Вторая стадия закаливания проходит при морозах $-2 - -5^{\circ}\text{C}$. Фотосинтез при этом прекращается, но активизируются биохимические процессы, ведущие к накоплению растворимых белков и других защитных веществ. Белковые вещества, частично гидролизуясь, переходят в аминокислоты, менее

подвергающиеся денатурации. Возрастает относительное содержание коллоидно-связанной воды и происходит частичная потеря свободной воды. В цитоплазме увеличивается число мембран. Повышаются ее эластичность и проницаемость для воды. После прохождения этой стадии закаливания морозоустойчивость возрастает очень сильно (до $-25 - -30^{\circ}\text{C}$).

Не все растения способны закаливаться, вследствие этого различные сорта озимых культур обладают неодинаковой морозоустойчивостью. Древесные растения, развивающие морозоустойчивость в состоянии покоя, проходят более сложный и длительный период закаливания.

1.5. Засоленные почвы и солеустойчивость растений

Засоленными называют почвы, содержащие в своем профиле легкорастворимые соли в токсичных для растений количествах.

Засоленные почвы занимают четверть поверхности суши и приурочены к жарким областям земного шара, где наблюдается малое количество осадков, большая сухость и высокая температура воздуха в летний период, сильное испарение, значительно превышающее количество атмосферных осадков (аридный и субаридный климат). Процессу засоления подвержены значительные площади (более 27 млн га) на территории Российской Федерации (Нижнее Поволжье, Алтай, Западная и Восточная Сибирь, Южное Зауралье, северо-восточное Прикавказье). Засоление почв занимает одно из первых мест среди стрессовых факторов, ограничивающих мировое производство продуктов питания.

Сущность процесса засоления почв заключается в том, что высокий уровень инсоляции резко усиливает испарение и транспирацию почвенной влаги, в результате чего происходит скопление легкорастворимых солей грунтовых вод в верхнем, корнеобитаемом слое почвы. Кроме того, в долинах рек засоление почвы может вызываться высоким уровнем минерализованных грунтовых вод.

В течение года общее содержание солей в верхнем горизонте почвы подвержено значительным колебаниям. Это обусловлено водным режимом почвы, наличием в верхнем ее слое нисходящих и восходящих токов воды, переносящих легкорастворимые соли. При этом хлориды передвигаются в почве быстрее, чем сульфаты, и поэтому в почвах хлоридного засоления содержание солей в верхних горизонтах колеблется с большой амплитудой.

Наименьшее содержание солей в корнеобитаемом слое почвы отмечается в зимне-весенний период, когда талые воды и обильные осадки промывают их в подпочвенные горизонты. С начала лета и до осени содержание солей в верхнем слое почвы закономерно растет.

Процесс накопления солей, или засоление, бывает двух видов: первичное и вторичное. При первичном засолении распределение солей в почве происходит в результате различных процессов, происходящих в природе. Различают континентальное и морское соленакопление. Вторичное засоление возникает в результате избыточных поливов, которые повышают уровень соленых грунтовых вод и/или из-за избыточного внесения минеральных удобрений. В процессе засоления почвы накапливаются самые разнообразные соли, которые представляют собой различные соединения катионов Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} и анионов Cl^- , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} , HCO_3^- . Чистое засоление почвы каким-либо одним видом соли в природных условиях практически не встречается. Обычно в почве присутствуют смеси хлористого и сернокислого натрия в различном отношении друг с другом; в отдельных районах к этим двум основным солям примешивается карбонат натрия.

Среди солей есть совершенно безвредные, мало вредные и оказывающие на растение сильно ядовитое действие. Наименее ядовитым является сернокислый натрий, а наиболее – углекислый натрий. Высокая ядовитость углекислого натрия объясняется тем, что эта соль разлагается и дает едкий натр (NaOH), который особенно сильно действует на растения.

В зависимости от соотношения в почве солей различают несколько типов засоления. При этом их определяют по анионному составу, поскольку, как

отмечалось, среди катионов в подавляющем большинстве случаев превалирует только натрий. В наименование типа засоления включаются те анионы, содержание которых превышает 20 % от суммы эквивалентов анионов, извлеченных из почвы водной вытяжкой; преобладающий по количеству ион ставится в названии последним. При наличии в почве соды, ввиду ее особой токсичности для растений, в названии типа солевого состава отражается ее присутствие, если содержание HCO_3^- в водной вытяжке превышает 2 м-экв/100 г почвы.

Большую роль в изменении состава солей засоленных почв играет относительная подвижность ионов в корнеобитаемом слое. Подвижность хлоридов в почве больше, чем сульфатов. Это объясняется лучшей растворимостью хлоридов в обменных реакциях. Более медленное передвижение сульфатов обусловлено способностью их взаимодействовать с кальцием поглощающего комплекса.

Степень засоления почвы определяется по сумме солей, содержащихся в почве: выделяют незасоленные почвы (содержание менее 0,1 % солей), очень слабозасоленные (0,2 – 0,25 % солей), слабо-, средне- и сильнозасоленные почвы и солончаки (0,5 – 3 % солей).

В.А. Ковда в зависимости от состава солей в почве и грунтовой воде выделил на всей территории земного шара 3 типа засоления, различающихся по своему генезису.

1-й тип – *сульфатно-хлоридное (приморское) засоление*. Оно типично для береговых низменностей зоны аридного климата – дельты рек Волги, Нила, Тигра, Евфрата, Хуанхэ, Инда, Ганга, Меконга, Ла-Платы, Рейна, полейдеров Голландии и т.д.

2-й тип – *хлоридно-сульфатное (континентальное) засоление*. Встречается на плато Центральной Азии, в Восточной Африке, Мексике, на Западно-Сибирской и Прикаспийской низменностях, а также в долинах рек Азии, Южной Европы, Северной Африки, Америки.

3-й тип – *содовое засоление* (щелочные почвы). Широко распространено на речных террасах и в муссонных тропиках Азии, в степях Австралии, саваннах Африки, пампасах Латинской Америки, в Калифорнии и некоторых других местах.

Растения засоленных местообитаний

Засоление почвы создает крайне неблагоприятные условия для произрастания и роста растений. Скопление даже безвредных солей повышает осмотическое давление почвенного раствора и затрудняет водоснабжение растений. Некоторые соли действуют на растение как специфические яды. При этом большое значение имеют и биологические свойства растений.

В настоящее время растения по их отношению к засоленности почвы подразделяют на две группы: галофиты (от греч. *galos* – соль, *phyton* – растение) и гликофиты (от греч. *glycos* – сладкий, *phyton* – растение).

Галофитами называют растения засоленных местообитаний, легко приспосабливающиеся в процессе своего индивидуального развития к высокому содержанию солей в почве благодаря наличию ряда признаков и свойств, возникших в процессе эволюции под влиянием условий существования. Гликофитами называют растения пресных мест обитания, обладающие сравнительно ограниченной способностью приспосабливаться к засолению в процессе индивидуального развития, так как условия их существования в процессе эволюции не благоприятствовали возникновению данного свойства.

Под галофитами понимают такие виды, которые переносят достаточно большие концентрации солей. Этой стойкостью они в свойственных для них местообитаниях защищены от конкуренции и благодаря этому могут здесь господствовать. Истинные галофиты не только хорошо переносят присутствие солей, но и нуждаются в них для своего нормального развития. По степени солеустойчивости галофиты иногда подразделяют на олигогалофиты, растущие

при малых содержаниях солей в почве; мезогалофиты, довольствующиеся средним их содержанием; эугалофиты – настоящие галофиты.

Галофиты и гликофиты встречаются как среди высших, так и среди низших растений. Однако в природе нет резкого деления растений на эти две группы. Существуют растения с промежуточными свойствами – факультативные галофиты.

В процессе эволюции у галофитов вырабатывались своеобразные анатомо-морфологические и физиологические свойства, позволяющие им осуществлять жизненные функции в присутствии значительного количества солей. Приспособление галофитов к значительному засолению достигается различными путями. П.А. Генкель (1982) выделяет три группы галофитов: соленакапливающие, солевывделяющие и соленепроницаемые. В настоящее время добавляют еще одну группу – солелокализирующие галофиты.

Соленакапливающие галофиты (настоящие галофиты, или **эугалофиты**) – наиболее солеустойчивые растения, концентрирующие в вакуолях значительное количество солей. Растут они на влажных засоленных почвах, обладают повышенной проницаемостью клеток для солей, которые накапливают без вреда для себя до 10 % (т.е. в растении солей может содержаться в несколько раз больше, чем в почве). Накопление солей вызывает повышение осмотического давления клеточного сока. Поглощение и накопление солей особенно сильно идет у представителей сем. *Chenopodiaceae*, что позволяет им преодолевать высокое осмотическое давление почвенного раствора, т.е. регулировать свое водоснабжение при сильном засолении. Типичные представители этой группы – солерос (*Salicornia herbacea*) и сведа (*Suaeda maritima*).

Солевывделяющие галофиты (криногалофиты) – растения, у которых наследственная потребность в солях меньше и наряду со способностью поглощать много солей имеется свойство выделять часть солей, выделяя их на поверхность своих органов. Протоплазма клеток этих растений хорошо проницаема для солей. Выделение солей на поверхность органов происходит с

помощью особых солевывделяющих железок, которые расположены на листьях. Число железок увеличивается по мере увеличения засоления почвы. Выделение солей железками осуществляется с помощью ионных насосов и сопровождается транспортом больших количеств воды. Соли оседают белыми налетами на листьях. Часть солей удаляется с опавшими листьями. Эти особенности характерны для кермека (*Statice gmelinii*), франкении (*Frankenia*) и др.

Солелокализирующие галофиты. У этих растений соли, проникающие через протоплазму, локализуются в особых пузырьвидных волосках, которые сплошным слоем покрывают верхние и нижние стороны листьев. К этой группе относятся некоторые виды полыни (*Atriplex*).

Соленепроницаемые галофиты (гликогалофиты) растут на менее засоленных почвах. У этих растений наследственная потребность в солях невелика. Они развиваются хорошо и без засоления, и на засоленных почвах, обладают весьма ограниченной солепроницаемостью плазмы, благодаря чему ограждают себя от избытка солей. Осмотический актив в них создается за счет продуктов ассимиляции (осмолитов). К этой группе относятся различные виды полыни и злаков.

Кроме того, существуют растения, как бы «уходящие» от засоления, которые хотя и могут расти на сильнозасоленных почвах, но имеют активную часть своей корневой системы в более глубоких, менее засоленных горизонтах. Это, например, кендарь (*Aposunum venetum*), тростник обыкновенный (*Phragmites communis*). Эти растения называют псевдогалофитами, так как, произрастая на засоленных почвах, они, тем не менее, не выносят сильного засоления и своеобразно уходят от него.

Характерные анатомо-морфологические изменения растений, растущих на засоленных почвах, во многом обуславливаются качеством засоления. Например, у довольно солеустойчивого хлопчатника при хлоридном засолении (по сравнению с сульфатным) обнаруживается увеличение размеров клеток эпидермиса, уменьшение числа устьиц на единицу площади листа, увеличение

мощности палисадной и губчатой паренхимы. Кроме того, при хлоридном засолении стимулируется растяжение клеток, что увеличивает толщину коры. Иначе говоря, в условиях хлоридного засоления проявляются признаки галосуккулентности, а в условиях сульфатного – галоксероморфизма. Однако суккулентность галофитов значительно отличается от суккулентности, свойственной ксерофитам – эти суккуленты имеют лишь внешние сходства.

У суккулентов-ксерофитов (кактусы и др.) основная часть воды находится в связанном состоянии за счет высокой вязкости цитоплазмы. У суккулентов-галофитов водоудерживающие силы определяются в основном высоким осмотическим давлением клеточного сока и цитоплазмы; адаптация к засолению ведет у них к увеличению размеров клеток, а не к их уменьшению, как при действии засухи. Однако у негалофитов, помещенных в условия засоления, иногда наблюдают образование суккулентности, а также уменьшение клеток. При очень высоких концентрациях солей даже у галофитов размеры клеток уменьшаются, что задерживает рост растения. К тому же очень сильное засоление помимо подавления ростовых процессов переводит растения (в особо неблагоприятные периоды) в состояние частичного или кратковременного покоя, что тоже ингибирует рост.

Существует тесная связь между характером растительности и засоленности почвы – это позволяет по составу естественной растительности с определенной точностью определить степень засоления почвы. Для этой цели используют специально разработанную пятибалльную шкалу, где содержание хлора в метровом слое почвы и виды растительности соответствуют определенному баллу, характеризующему степень засоления. Следовательно, виды являются своеобразным показателем степени засоления.

Физиолого-биохимические процессы при засолении

Основной причиной повреждения растений при засолении является осмотический стресс: накопление солей в зоне роста корней понижает водный потенциал почвенного раствора, что затрудняет поступление воды в корни,

возникает физиологическая засуха. Поэтому повреждения при засолении очень сходны с тем, что наблюдается при засухе, т.е. прежде всего повышается осмотический потенциал клетки, снижается интенсивность синтетических процессов и усиливается гидролиз. Отличие засоления от засухи состоит в том, что соли, кроме осмотического, оказывают и токсическое воздействие. Даже безвредные в малых концентрациях соли, такие как серноокислый натрий, в высоких концентрациях оказываются ядовитыми, вызывая различные нарушения нормального хода физиологических процессов.

Таким образом, неблагоприятное воздействие засоления на растения связано, прежде всего, с возникающим осмотическим стрессом, нарушением ионного гомеостаза и токсическим действием ионов солей.

Являясь осмотически активными компонентами, ионы повышают внутриклеточный осмотический потенциал до восстановления нормального осмотического градиента между растением и внешним раствором. Но поскольку засоляющие ионы являются гидрофильными и образуют вокруг себя значительную сольватную оболочку, то при увеличении их концентрации в клетке одновременно возрастает и сила осмотического связывания воды. Это ведет к увеличению водоудерживающих сил ткани и снижению подвижности воды в организме.

Преимущественное поступление в ткани растений засоляющих ионов приводит к торможению поглощения других элементов минерального питания растений, т.е. нарушается ионный гомеостаз.

Осмотический стресс приводит к водному дефициту, снижая устьичную проводимость и транспирацию. Происходящее при этом закрытие устьиц уменьшает поступление в лист углекислого газа и соответственно интенсивность фотосинтеза. Фотосинтез ингибируется, когда ионы натрия или хлора в высоких концентрациях накапливаются в хлоропластах. Поскольку фотосинтетическая ЭТЦ относительно нечувствительна к солям, их неблагоприятный эффект сказывается в основном на углеродном метаболизме и

фотосинтетическом фосфорилировании. Снижается содержание хлорофилла, ингибируется синтез крахмала.

Реакция дыхания на избыток солей неоднозначна. Чаще всего интенсивность дыхания сначала возрастает, поскольку поддержание ионного гомеостаза в условиях засоления требует значительных затрат энергии. Увеличивается доля пентозофосфатного пути. Ингибируется перенос электронов в ЭТЦ, причем NaCl выступает разобщителем дыхания и фосфорилирования. При сильном засолении энергетическая эффективность дыхания снижается.

Накопление в клетках больших количеств ионов солей, которые являются заряженными частицами, ведет к некоторым структурным изменениям молекул, молекулярных комплексов и отдельных органелл. Например, блокирование заряженных групп свободных аминокислот приведет к затруднению процесса взаимодействия последних при образовании пептидных связей белковых молекул.

Вслед за этими, так называемыми первичными, нарушениями в организме начинают развиваться обусловленные ими вторичные изменения негативного характера. Так, изменение гомеостаза в клетке является своего рода стрессорным сигналом, который передается в геном. Следствием защиты ДНК гистонами является снижение ее функциональной активности и резкое ослабление интенсивности синтетических процессов в разных звеньях обмена веществ. Другой причиной торможения реакций синтеза может быть ухудшение их энергообеспеченности. Торможение синтетических процессов, в первую очередь синтеза белка и нуклеиновых кислот, и понижение энергообеспеченности организма ведет к резкому торможению ростовых процессов, сокращению темпов нарастания биомассы растений.

При усилении засоления субстрата диспропорция между продуктами гидролиза и синтеза постепенно возрастает и организм, в конце концов, погибает. При относительно умеренном или слабом засолении растения выживают, но при этом интенсивность синтетических реакций в них

стабилизируется на новом, пониженном уровне. В дальнейшем, поскольку растительный организм является саморегулирующей системой, произойдет постепенное снижение интенсивности гидролитических процессов, что со временем приведет к нормализации соотношения реакций «синтез – гидролиз» и восстановлению обычного уровня содержания различных соединений в тканях растения.

Усиливающаяся в условиях засоления аккумуляция активных форм кислорода приводит к повреждению клеточных мембран, снижению активности различных ферментов и нарушению нормального функционирования фотосинтезирующего аппарата растений. В ответ на это увеличивается экспрессия генов, ответственных за синтез антиоксидантных ферментов, и усиливается их новообразование.

В целом, как уже отмечалось, реакция растений на воздействие засоления зависит как от его дозы (концентрации и продолжительности), так и от типа засоления. В зависимости от типа засоления определенным образом изменяется морфология растений, что обуславливает особенности физиологических процессов. Так, при хлоридном засолении растения приобретают суккулентные черты (развиваются водоносные мясистые ткани), интенсивность фотосинтеза и дыхания таких растений при расчете на единицу сырой массы снижена. При сульфатном засолении растения обнаруживают черты ксероморфности (мелкоклеточности), фотосинтез и дыхание у них становятся интенсивнее. Сульфатное засоление нарушает обмен серы: в растениях накапливается много сульфоксидов, сульфонов, сульфоновых кислот. Эти соединения легко проникают через мембраны, нарушая их целостность, а на организменном уровне способствуют увяданию растений.

Механизмы адаптации растений к засолению и солеустойчивость

Механизмы солеустойчивости галофитов генетически закреплены и являются конститутивными, т.е. проявляются в любых условиях, независимо от наличия или отсутствия засоления. Напротив, защитные системы растений –

гликофитов являются индуцибельными, т.е., хотя они и predeterminedены (детерминированы) генетически, они реализуются лишь при действии этого экстремального фактора.

Солеустойчивость, или **галотолерантность**, – это устойчивость растений к повышенным концентрациям солей в почве или воде. Среди культурных растений настоящих галофитов нет.

При засолении в первую очередь повреждаются наиболее активно растущие части растения. Устойчивость к солям изменяется в онтогенезе: во время прорастания семян она выше, у проростков резко снижается, во время вегетации увеличивается, а в период образования генеративных органов снова снижается. Важную роль играет климат. В условиях холодного климата растения более устойчивы к солям.

Адаптация растений к засолению обеспечивается целым комплексом защитно-приспособительных реакций, выработанных в процессе эволюции, и включает следующие процессы.

Поддержание ионного гомеостаза. Самыми солеустойчивыми организмами на Земле являются галотолерантные бактерии, которые обитают в соленых морях и озерах и требуют для своего существования наличия в цитоплазме очень высоких концентраций солей (от 3 до 6 М NaCl). Это единственные живые организмы, устойчивость которых к соли реализуется исключительно на уровне макромолекул. У всех остальных живых организмов ферменты и структурные белки не могут функционировать в условиях высоких внутриклеточных концентраций неорганических ионов, прежде всего ионов натрия. По этой причине солеустойчивость растительного организма зависит не от солетолерантности самих белков, а от их микроокружения, т.е. от концентрации и соотношения ионов в цитоплазме.

Выживание любого растения в условиях избыточного засоления в значительной степени зависит от способности клеток поддерживать ионный гомеостаз. Содержание ионов в цитоплазме определяются как барьерными функциями мембран, так и скоростью выделения ионов в апопласт. В условиях

солевого стресса большое значение приобретают особенности ионного транспорта. Разные группы галофитов на уровне корня создают разные по мощности ион-транспортирующие барьеры. У гликофитов таких барьеров нет. В их солеустойчивости решающую роль играют процессы водно-солевого обмена.

В условиях солевого стресса активируются системы ионного гомеостатирования. Одной из таких систем является выведение из клетки поглощенных ионов Na^+ и их компартиментация в вакуоли с участием Na^+/H^+ -антипорта плазмалеммы и тонопласта. В регуляции этого антипорта участвуют высокочувствительные к засолению SOS (salt overly sensitive) гены.

Снижение водного потенциала клеток. В условиях засоления растение должно уменьшить свой водный потенциал до таких значений, чтобы вода снова смогла поступать в корни. Это достигается за счет поглощения неорганических ионов из внешнего раствора, их последующей компартиментации в вакуоли с одновременным накоплением совместимых осмолитов в цитоплазме. В результате восстанавливается нормальное направление градиента водного потенциала между почвой и растением и поступление воды в растение.

Интенсивный синтез совместимых осмолитов (сахаров, сахароспиртов, аминокислот и др.), которые в больших концентрациях не токсичны для клеточного метаболизма. Они не только понижают водный потенциал клеток при солевом стрессе, но и защищают мембраны, ферменты, структурные и регуляторные макромолекулы. Повышение концентрации совместимых осмолитов в цитоплазме достигается преимущественно за счет двух разных процессов: активации работы генов, кодирующих ферменты синтеза этих осмолитов, и ингибирования экспрессии других генов, ответственных за их разрушение. Например, засоление влияет на экспрессию генов ключевых ферментов синтеза и деградации пролина – пирролин-5-карбоксилатредуктазы и пролиноксидазы, а, следовательно, на синтез и разрушение пролина. Защитное действие пролина на растения связано с его

способностью выступать в роли осмолита, антиоксиданта, протектора структуры белковых молекул и мембран, источника азота, углерода и энергетического субстрата, регулятора экспрессии стрессорных генов.

Снижение интенсивности ростовых процессов. Многие исследователи считают, что подавление роста при солевом стрессе вызывается не столько повреждающим действием солей, сколько адаптивным гормональным ответом растения. Ростингибирующий эффект засоления опосредован уменьшением содержания в растениях цитокинина, стимулирующего рост, а также увеличением содержания абсцизовой кислоты (АБК), которая ингибирует рост растений. Изменение в гормональном статусе растений стимулирует механизм устойчивости. Таким образом, можно сказать, что механизм реализации растением свойства солеустойчивости заключается в переходе основных реакций метаболизма на новый, менее интенсивный уровень, что обусловлено понижением функциональной активности ядерной ДНК, являющимся следствием защитной стабилизации ее гистоновыми белками.

Синтез стрессовых белков. Адаптация к условиям засоления, так же как и к другим стрессорам, в большой степени зависит от способности клеток активировать работу целого ряда **генов стрессорного ответа**. Эти гены кодируют регуляторные белки, LEA-белки, ферменты синтеза гормонов (в частности, АБК), макромолекулы с функциями шаперонов, убиквитины, ингибиторы протеаз, АТФ-азы и переносчики ионов. Важное значение имеет также регуляция экспрессии генов аквапоринов, участвующих в переносе молекул воды через мембраны и имеющих важное значение для сохранения водного статуса клеток в условиях засоления.

Всем этим механизмам предшествует восприятие осмосенсором изменения водного потенциала почвенного раствора, преобразование сигнала и его передача на внутриклеточные сигнальные цепи, компонентами которых являются ионы кальция, протеинкиназы, в том числе MAPK-каскад, а также транс-факторы, регулирующие экспрессию конкретных генов.

Глава 2. Оценка и диагностика устойчивости растений к экстремальным факторам

2.1. Оценка качества семян

Определение всхожести семян проращиванием

Определение всхожести представляет один из важнейших видов оценки качества семян, так как с различной степенью всхожести связаны, прежде всего, нормы высева, а затем и ряд биологических качеств посевного материала. Высев семян без предварительной проверки всхожести может повлечь за собой ряд непредвиденных явлений и равноценен работе, проращиваемой вслепую, наудачу.

Всхожесть семян определяют обычно в наиболее благоприятных для этого условиях, при достаточном количестве влаги и при наиболее подходящей температуре. Конечно, получаемый при этом процент всхожих семян не будет полностью совпадать с процентом семян, взошедших в полевых условиях. Обычно полнота всходов в полевой обстановке ниже всхожести, определенной в условиях лаборатории. Но полученный при проращивании в наиболее благоприятных условиях процент всхожих семян показывает количество проростков, какое может быть в хороших условиях получено из семян. Этим самым устанавливается весьма важное качество посевного материала.

Для определения всхожести семян необходимо иметь либо термостат, подогреваемый до нужной температуры, либо специально выделенное для этого чистое помещение, в котором можно поддерживать нужную температуру.

Для определения всхожести используются семена исследуемой культуры, выделенные при установлении чистоты семян. Из этих чистых семян культуры отсчитывается подряд, без какого-либо выбора, четыре пробы, по 100 семян в каждой. Эти четыре пробы и ставятся каждая в отдельности для определения всхожести.

При проращивании семян в качестве подстилки используется чаще всего песок или фильтровальная бумага. Песок должен быть кварцевым, мелким. Его

предварительно нужно просеять через тонкое сито с отверстиями диаметром 1 мм. Для обеззараживания и очистки песок необходимо тщательно промыть, а затем прокалить. Фильтровальная бумага также должна быть чистой, не окрашенной ядовитыми составами.

При повторном использовании песка, бывшего в употреблении, его необходимо снова промыть и прокалить. Шкаф, помещение для проращивания и растильни перед каждой новой закладкой на проращивание необходимо дезинфицировать раствором формалина (1 часть 40%-ного формалина на 8 частей воды). Шкафы и помещение, где производится проращивание, надо регулярно проветривать.

Перед проращиванием семян песок и фильтровальную бумагу увлажняют. Однако в них не должно быть избытка воды. Лишней воде следует дать стечь с бумаги. Песок увлажняют до 60% от его полной влагоемкости.

Если семена проращивают в песке, то его помещают в растильню, разравнивают поверхность, увлажняют в нужной степени и затем аккуратно, рядами, на небольшом расстоянии друг от друга, раскладывают на него семена одной пробы. Для правильного раскладывания семян на поверхности песка пользуются специальными маркерами. Разложив семена, их вдавливают каким-либо плоским предметом вровень с поверхностью песка.

Если семена проращивают на фильтровальной бумаге, то их таким же образом раскладывают на смоченную фильтровальную бумагу, положенную на дно растильни. Сверху семена прикрывают другим листом увлажненной фильтровальной бумаги.

Растильни должны быть сверху прикрыты стеклянными пластинками. Но если растильни одного размера и одна может стать на борта другой, то их так и расставляют, прикрывая стеклянной пластинкой только самую верхнюю. В каждую растильню на поверхность песка или верхнего листа фильтровальной бумаги кладут этикетку, написанную простым (не чернильным) карандашом. В этикетке должны быть указаны номер образца, номер пробы и дата постановки семян на всхожесть.

При проращивании семян необходимо следить за температурой шкафа или помещения, проверяя ее не менее трех раз в сутки. Подстилку, на которой проращиваются семена, нужно регулярно смачивать, не допуская ее подсыхания.

Кроме указанных простых способов для проращивания семян существуют разнообразные аппараты и приспособления. Большинство из них описано в специальной семеноводческой литературе.

Пшеницу, рожь, ячмень и овес проращивают при постоянной температуре в 20°C.

Кукурузу, просо, сорго и рис проращивают при переменной температуре в 20-30°C, причем в первые 6 часов температура должна держаться на уровне 30°C, а в течение остальных 18 часов – на уровне 20°C.

Подсчет проросших семян производят в два срока: первый раз – через установленное число дней для определения энергии прорастания; второй раз – через число дней, установленное для определения всхожести. Под энергией прорастания следует понимать способность семян прорасти дружно, почти одновременно или в короткий срок. Высокая энергия прорастания в дальнейшем сказывается на дружном появлении всходов при посеве и одновременном развитии и созревании растений. Энергию прорастания выражают в процентах семян, проросших в установленное для этого число дней.

Проросшими семенами считают такие, у которых корешки развились нормально, а один главный корешок имеет длину не менее длины семени. У ржи, пшеницы и кукурузы при этом обращают внимание и на росток, который должен достигнуть, по крайней мере, половины длины семени.

Некоторые семена, особенно у бобовых культур (клевер, люцерна, люпин и др.), ко времени подсчета всхожести остаются ненабухшими. Такие семена называются твердыми. Эти семена из-за плотной оболочки не набухли и не проросли, но они могут прорасти со временем. Поэтому их подсчитывают отдельно и у клевера красного, люцерны синей и гибридной 75% этих семян

прибавляют к проросшим, а у клевера белого и розового к проросшим причисляют лишь 50% твердых семян (табл. 2).

Таблица 2

Срок для определения энергии прорастания и всхожести у некоторых культур

Культура	Температура при проращивании, °С	Срок для определения, сут.	
		энергия прорастания	всхожесть
Кукуруза	20-30	3	7
Овес	20	4	7
Пшеница мягкая	20	3	7
Пшеница твердая	20	4	8
Рожь	20	3	7
Ячмень	20	3	7
Горох	20	3	7
Фасоль	20	4	8
Клеверина	20-30	5	10
Ежа сборная	20-30	7	14
Костер безостый	20-30	4	10
Тимофеевка	20-30	4	8
Овсяница луговая	20-30	5	10

Примечание: 20–30 °С – переменная температура: 6 часов – при температуре 30° С и 18 часов – при 20° С

Непроросшими семенами считаются такие, у которых росток состоит из одного стебелька, а корешок не развился до конца испытания всхожести или развился больным, уродливым, загнившим и вместо него не образовалось здоровых добавочных корешков или, наоборот, совершенно не образовалось ростка.

Загнившие семена относят к непроросшим (даже если они проросли) и количество их учитывают отдельно.

По окончании испытания всхожесть и энергию прорастания вычисляют в процентах как среднее из всех параллельных проб.

Отклонения данных проращивания отдельных проб должны быть возможно малыми и не превышать следующих величин.

При среднем проценте всхожести	Допустимое отклонение (латитуда)
от 99,5 до 100	±1,4
от 98,0 до 98,99	±2,0
от 97,0 до 97,99	±2,4
от 96,0 до 96,99	±2,8
от 95,0 до 95,99	±3,0
от 94,0 до 94,99	±3,4
от 93,0 до 93,99	±3,6
от 92,0 до 92,99	±3,8
от 91,0 до 91,99	±4,0
от 90,0 до 90,99	±4,2
от 89,0 до 89,99	±4,4
от 87,0 до 88,99	±4,7
от 85,0 до 86,99	±5,0
от 83,0 до 84,99	±5,3
от 81,0 до 82,99	±5,5

Если при одной пробе оказалось отклонение более допустимого, то процент энергии прорастания и всхожести устанавливается по трем пробам. Если же отклонения более допустимых обнаружены у двух проб, то энергия прорастания и всхожесть устанавливаются по данным повторного проращивания.

Определение жизнеспособности семян ускоренными способами

Метод А.А. Гуревича. Этот метод основан на восстановлении динитробензола в процессе дыхания. Дыхание же семян связано с их жизнеспособностью.

Две пробы чистых семян (по 100 штук в каждой) помещают в стаканчики с раствором динитробензола (0,7–1 г на 100 мл воды), приготовленным непосредственно перед закладкой семян.

Помещенные в раствор зерна выдерживают в нем различное время, в зависимости от температуры. При комнатной температуре (16°C) необходимо выдерживать зерна 5 часов, при температуре 30°C – 3 часа, а при температуре 40°C – 1 час.

По прошествии указанного времени зерна вынимают из раствора динитробензола и на 10 или 15 минут помещают в стаканчики с водой, куда

добавляют несколько капель аммиака (12–15 капель на 10 мл воды), вызывающего пурпурную окраску продуктов восстановления динитробензола. Окраска эта образуется вокруг корешков и при производстве в дальнейшем среза через зародыш отчетливо видна вокруг них в виде кругов.

Затем каждое зерно вынимают из раствора аммиака и острой бритвой делают поперечный разрез через зародыш. Правильно произведенный разрез должен пройти через главный корешок и задеть боковые корешки. У зерен с жизнедеятельными зародышами на разрезе вокруг корешков образуется фиолетово-пурпурный кружок, отчетливо видный в лупу 20-кратного увеличения. Такие семена должны быть отнесены во фракцию жизнеспособных. У мертвых и, следовательно, нежизнеспособных зародышей окраски корешков не происходит.

К техническим трудностям метода следует отнести определение окраски зародышей со слабой жизнеспособностью (дыханием). Окрашивание корешков происходит у них слабо, и отнесение их в ту или иную группу требует известных навыков.

Подсчитав жизнеспособные зерна в обеих пробах, выводят средний процент для исследуемого образца.

Определение жизнеспособности по методу Гуревича пригодно для зерен всех хлебов первой группы, в том числе и для пленчатых (овес и ячмень). Однако у пленчатых хлебов перед погружением в раствор динитробензола с зерен должны быть сняты пленки. У овса снятие пленок не вызывает затруднений, у ячменя же можно ограничиться освобождением от пленок только зародыша, что может быть осуществлено и на сухих зернах. При снятии пленок необходимо остерегаться повреждения зародыша.

Метод Д.Н. Нелюбова. Этот метод основан на способности мертвой клеточной плазмы подвергаться окрашиванию, тогда как плазма жизнеспособного зародыша не окрашивается.

Определение жизнеспособности этим методом производят преимущественно у семян зерновых бобовых растений.

При определении жизнеспособности по методу Нелюбова берут две пробы, по 100 семян в каждой. Семена намачивают в воде, в зависимости от температуры, различное время:

при температуре 30° 3 часа

при температуре 20° 15 часов

У люпина предварительно делается осторожный надрез оболочки семян со стороны, противоположной корешку.

После этого с набухших в воде семян снимают оболочку и освобожденные от оболочки зародыши заливают раствором индигокармина концентрации 0,2%. В растворе индигокармина семена выдерживают при температуре течение 3–4 часов.

Вынутые из раствора зародыши слегка споласкивают чистой водой и просматривают. Зародыши, окрашенные полностью или с окрашенным корешком или семядолями, относят к числу нежизнеспособных. Зародыши, совершенно не окрашенные или только с частично окрашенными семядолями, считаются жизнеспособными. Подсчет их позволяет вычислить средний для обеих проб процент жизнеспособности семян.

Метод В.И. Иванова. Этот метод сходен с методом Нелюбова, но окрашивание зародышей производится кислым фуксином. Он применяется для определения жизнеспособности семян пшеницы, ячменя, ржи и овса.

С этой целью берут 200 зерен испытуемого образца и намачивают в воде при комнатной температуре в течение 10–11 часов (или при температуре 30° в течение 3 часов). Зерна овса предварительно освобождают от пленок. Время намачивания таких зерен овса может быть сокращено до 4–6 часов.

Набухшие семена слегка обсушивают на фильтровальной бумаге. Затем острым лезвием бритвы каждое зерно разрезают по продольной оси на две половинки. Чтобы не получилась рваной поверхности разреза, его делают скользящим движением лезвия со спинной стороны зерна. Бороздка зерна служит ориентиром разреза.

Для окрашивания от каждого семени берут одну половинку и сразу ее помещают в стаканчик с водой, не допуская подсыхания.

По окончании разрезания одной сотни половинки зерен дважды промывают водой для удаления остатков разорванных тканей с поверхности разреза. После этого их заливают 5 мл 0,1%-ного раствора кислого фуксина, осторожно встряхивают для удаления пузырьков воздуха и оставляют на 10–15 минут. Затем красящий раствор сливают и половинки зерен промывают в воде до исчезновения окраски в промывных водах. Промытые половинки зерен помещают на фильтровальную бумагу и просматривают.

К жизнеспособным зернам относят все половинки с неокрасившимися зародышами, а к нежизнеспособным – зерна с полностью окрасившимися зародышами или частично окрасившимися корешками. Процент жизнеспособности устанавливается как среднее арифметическое из двух сотен проанализированных зерен.

Для определения жизнеспособности зерен по методу Иванова раствор кислого фуксина готовится заранее – растворением 1 г фуксина в 1 л дистиллированной или свежeproкипяченной воды. Полученный раствор достаточен для обработки 100 образцов семян зерновых хлебов.

Окрашивание солями тетразола. В зарубежной практике семенного контроля наибольшее применение из ускоренных методов имеет окрашивание семян с помощью солей тетразола. С этой целью обычно применяется 2-, 3-, 5-трифенилтетразолийхлорид. Тетразольный метод основан на том, что бесцветные соли тетразола, восстанавливаясь в живых семенах, переходят в красные формазаны.

Техника проведения анализа такова: две пробы семян по 100 штук предварительно замачивают в воде (разное время в зависимости от влажности семян и температуры). Семена зерновых хлебных культур разрезают острой бритвой на две половинки (или целиком выделяют зародыш), а у зерновых бобовых, масличных и других культур семена освобождают от оболочек.

Подготовленные таким образом половинки или зародыши семян помещают в 1%-ный раствор реактива и выдерживают в темноте (раствор чувствителен к свету) в течение одного часа при комнатной температуре или 30–40 минут при 30°C. Если картина окрашивания недостаточно ясная (бледная окраска), семена снова помещают в раствор на некоторое время.

Вынув половинки семян или их зародыши из раствора, подсчитывают окрашенные (т.е. жизнеспособные) и определяют их средний процент.

2.2. Определение солеустойчивости растений

С необходимостью оценки степени солеустойчивости растений исследователи сталкиваются весьма часто при разном характере работы. Наиболее правильным количественным показателем степени солеустойчивости растений является уровень изменения их продуктивности под влиянием засоления. Однако определение этой величины – задача трудоемкая, длительная. Поэтому на практике часто применяются другие лабораторные методы диагностики солеустойчивости, основанные на многих закономерностях, обнаруженных при исследовании солеустойчивости растений.

Опыт 1. Одним из методов оценки степени солеустойчивости растений является проращивание семян в солевых растворах, который дает представление лишь о солеустойчивости растений в начальные фазы их развития.

При определении солеустойчивости растений данным методом показателем устойчивости является количество проросших семян в растворах соли по сравнению с дистиллированной водой.

Ход работы. Подбирают здоровые, нормально выполненные семена разных культур и сортов, желательно одной репродукции. Отобранные семена каждого вида и сорта отдельно помещают в марлевые мешочки с этикеткой внутри и обрабатывают раствором формалина (1 мл на 300 мл воды) в течение 3 – 5 мин. Затем промывают дистиллированной водой, слегка просушивают и

раскладывают в чашки Петри по 25 – 50 шт. Предварительно чашки Петри и фильтровальную бумагу прокаливают в термостате при 150°C в течение 1 часа. На дно чашки укладывают слой фильтровальной бумаги, в каждую чашку наливают требуемое количество 1–1,4 %-ного раствора NaCl, а для контрольного варианта – дистиллированную воду. На каждый вариант берут по 2 чашки (табл. 3).

Затем семена в чашках Петри помещают в термостат для проращивания. На дно термостата ставят кювету с водой.

Таблица 3

Условия проращивания семян различных культур

Культура	Число семян на 1 чашку	Количество раствора на 1 чашку, мл	Концентрация р-ра NaCl, %	Время проращивания, сут.	Температура, °С
Ячмень	50	6-7	1,4	5-6	22±2
Кукуруза	25-50	8-10	1,0	6-7	22±2
Кормовые злаки	50-100	4-7	1,0	6-7	22±2

По окончании проращивания по каждому варианту определяют число проросших семян (среднее из двух повторностей). Число проросших семян в дистиллированной воде принимают за 100%, а в растворах соли – вычисляют в процентах от контроля. Результаты опыта записывают по следующей схеме.

Культура, сорт	Число проросших семян, % от контроля	Выводы о солеустойчивости

Опыт 2. Метод, предложенный А.А. Рихтером, основан на определении чувствительности устьичного аппарата к действию солей, главным образом катиону натрия. Катион обладает свойством способствовать распаду крахмала в замыкающих клетках, вследствие чего осмотическое давление в них повышается, вызывая тем самым широкое раскрытие устьичных щелей у неустойчивых растений.

Ход работы. Листья для исследования берут в вечернее время, когда устьица плотно закрыты и переполнены крахмалом. Срезы эпидермиса с нижней стороны листа (традесканции, герани, бегонии и др.) погружают в 0,5; 1 и 2 %-ные растворы NaCl и начинают рассматривать под микроскопом. Меньшая скорость раскрывания устьиц при определенной концентрации NaCl является показателем солеустойчивости растений.

Опыт 3. П.А. Генкель разработал новый микроскопический метод оценки степени солеустойчивости, основанный на прямом определении токсического действия солей на растения.

Ход работы. Срезы верхнего эпидермиса листа погружают на 2 часа в 1 М раствор NaCl, а затем под микроскопом изучают и подсчитывают число плазмолизированных клеток (живых), которое является показателем степени солеустойчивости растений. Для опыта берут 5 срезов, в каждом из которых по 10 полей зрения.

Опыт 4. Б.П. Строгонов и Л.А. Остапенко предложили метод определения солеустойчивости растений по показателям интенсивности разрушения хлорофилла у отрезанных листьев, помещенных черешками в раствор соли. Этот метод основан на наличии устойчивой системы хлорофилл-белок у растений, обладающих повышенной солеустойчивостью.

Ход работы. Листья растений (2–3 видов), срезанные под водой, черешками помещают в 4%-ные растворы NaCl и Na₂SO₄. Для предохранения листьев от увядания опыт проводят на рассеянном свете в течение 7 суток.

Показателем степени солеустойчивости растений является скорость появления пятен вследствие разрушения хлорофилла под влиянием солей. У солеустойчивых растений разрушение хлорофилла начинается обычно значительно позднее и идет менее интенсивно, чем у несолеустойчивых. Изменение окраски листьев отмечают на 3-й и 7-й день. Результаты опытов записывают по следующей схеме:

Вид растения	Изменение окраски листьев		Выводы о солеустойчивости
	3-й день	7-й день	

Опыт 5. Б.П. Строгонов и сотрудники (1970) разработали метод определения степени солеустойчивости растений по количеству альбуминов в зеленых листьях. Большее содержание альбуминов является показателем большей солеустойчивости растений.

Ход работы. Навеску свежих листьев исследуемых растений (2 г) растирают в 10 мл воды, гомогенат очищают от взвесей фильтрованием. Затем 5 мл вытяжки вносят в градуированную центрифужную пробирку и добавляют в нее сухой сернокислый аммоний до полного насыщения (примерно 15 г). Через 15 мин после растворения соли, выпавшие в виде геля альбумины, центрифугируют 3 мин при 4000-5000 об/мин и учитывают объемное (по делениям пробирки) количество альбуминов. Результаты записывают по следующей схеме:

Вид растения или сорт	Содержание альбуминов, мг	Выводы о солеустойчивости

Физиологические изменения у растений, находящихся в условиях засоления

Засоление почвы создает неблагоприятные условия для произрастания и роста растений. Скопление даже безвредных солей повышает осмотическое давление почвенного раствора, что затрудняет водоснабжение растений. Некоторые соли действуют на растения как специфические яды, нарушая физиологические процессы. При этом происходит образование промежуточных продуктов обмена в таких концентрациях, которые не свойственны нормально функционирующему организму. Одни из этих веществ (аммиак, сульфоксиды, сульфоны, фенилаланин и др.) оказывают токсическое действие, другие (альбумины, нуклеотиды, сахароза, каротиноиды и др.) выполняют защитные функции. Клетка максимально мобилизует свои возможности на образование защитных соединений. Степень солеустойчивости выживаемости определяется

направленностью биохимических реакций, количественным соотношением токсичных и защитных веществ.

Опыт 6. Аммиачное отравление как одна из причин повреждения растений при засолении

Чрезмерно высокая концентрация в клетках засоляющих ионов (Na^+ , SO_4^{2-} , Cl^-) вызывает нарушения в азотном обмене растений. В результате усиления протеолиза белков в растительном организме накапливается аммиак, который оказывает сильное токсическое действие.

Ход работы. Навеска (2,5 г) свежего растительного материала (листья и корни растений, выращенных в нормальных условиях и при засолении NaCl или Na_2SO_4) растирается в ступке с 4 мл 10 %-ного уксуснокислого свинца, добавляется 1 мл 5 %-ного раствора NaOH . Полученный гомогенат переносится в мерную пробирку. Ступка и пестик споласкиваются 4 мл воды, которые также сливаются в пробирку. В пробирку прибавляют 1 мл насыщенного раствора Na_2SO_4 , встряхивают и затем отфильтровывают. К 2,5 мл фильтрата приливают 1 мл 10 %-ной эмульсии фенола и 5 мл свежеприготовленной хлорной воды, перемешивают и оставляют на 30 мин. При наличии аммиачных солей или аммиака растворы окрашиваются в синий цвет. Разница в окраске контрольного и опытного растворов указывает на степень разрушения азотистых веществ. Разбавляя более яркий раствор определенным количеством воды, необходимо рассчитать, на сколько увеличилось при засолении количество аммиака.

Опыт 7. Влияние засоления на содержание белка в органах растений

Образование белка является завершающим этапом в цепи синтетических реакций метаболизма азота. От уровня синтеза белка в прямой зависимости находится интенсивность ростовых процессов.

Ход работы. Навеску (100 мг) свежих растительных тканей растирают в фарфоровой ступке с 1 мл дистиллированной воды в течение 10 мин. Затем

количественно переносят гомогенат в мерную пробирку, объем доводят до 10 мл и отфильтровывают через бумажный фильтр. Фильтрат спектрофотометрируют при 230 нм и 260 нм. Концентрацию белка рассчитывают по следующему уравнению:

$$\text{Белок (мкг/мл)} = 183 * D_{230} - 75,8 * D_{260},$$

где D_{230} – оптическая плотность раствора при 230 нм;

D_{260} – оптическая плотность раствора при 260 нм.

Исходя из концентрации белка рассчитывают содержание белка в мг на 1 г сырой массы.

2.3. Определение степени засухоустойчивости растений

Проблема засухоустойчивости растений является актуальной проблемой для многих регионов нашей страны с аридным климатом.

Физиология засухоустойчивости складывается из способности растений переносить обезвоживание и действие высоких температур (жароустойчивость). Засухоустойчивыми являются растения, способные в процессе онтогенеза приспособляться к действию засухи и осуществлять в этих условиях рост, развитие и воспроизведение.

Для диагностики засухоустойчивости используют как прямые (непосредственно связанные с засухоустойчивостью), так и косвенные методы (определения по ростовым реакциям). Косвенные методы определения засухоустойчивости часто используются для массового анализа.

Опыт 1. Определение засухоустойчивости растений по ростовым процессам

Определяя количество проросших семян на растворах с высоким осмотическим давлением, имитирующим условия физиологической сухости, представляется возможным на ранних этапах онтогенеза определить относительную засухоустойчивость видов и сортов растений.

Ход работы. Отобранные семена (по 50 шт) разных сортов и культур помещают в марлевые мешочки, снабженные этикетками, и стерилизуют раствором формалина (1 мл на 300 мл воды) в течение 5 минут, промывают дистиллированной водой и раскладывают на фильтровальной бумаге в чашках Петри (в 3 повторностях). Фильтровальную бумагу и чашки Петри предварительно прокаливают в термостате при 150°С в течение 1 часа. Фильтровальную бумагу увлажняют 0,4 М раствором сахарозы с осмотическим давлением 10 атм. Подсчет проросших семян проводят на 3-й и 7-й день. Результаты опыта записывают по следующей схеме.

Культура, сорт	Число семян, проросших на 3-й день	Число семян, проросших на 7-й день	Вывод о засухоустойчивости

Опыт 2. Определение засухоустойчивости растений по содержанию прочносвязанной фракции хлорофилла «а» и «в»

Устойчивость растений к засухе тесно связана с состоянием пигментного комплекса (ПК). При повышении температуры, ухудшении водообеспеченности повышается активность хлорофиллазы, что ведет к разрушению ПК. Обнаруживая эти изменения, представляется возможным определить относительную устойчивость растений к засухе. Метод основан на определении прочносвязанной фракции хлорофилла «а» и «в», которая экстрагируется ацетоном.

Ход работы. Листья или проростки разных культур (2 г) выдерживают в теплой камере при 50–60° С до появления признаков увядания. Затем навески (0,2 г) растительного материала опытного (подвергнутого увяданию) и контрольного вариантов в 2-кратной повторности растирают в 80%-ном ацетоне в ступке до гомогенной консистенции. Гомогенат количественно переносят в фильтр Шота № 3 или № 4 и фильтруют при помощи вакуумного насоса в колбу Бунзена. Осадок на фильтре тщательно промывают ацетоном. Затем фильтрат из колбы Бунзена переносят в мерную колбу на 50 мл и

доводят до заданного объема. Определяют величину экстинкции на СФ-16 при 663 и 645 нм. Расчет проводят по формулам

$$\text{Хлорофилл «а»} = 12,7 \cdot E_{663} - 2,69 \cdot E_{645},$$

$$\text{Хлорофилл «в»} = 22,9 \cdot E_{645} - 4,63 \cdot E_{663}.$$

Определяют концентрацию хлорофилла в мг/л. Для расчета количества пигментов на 1 г сырой массы используют формулу

$$\text{Хлорофилл (мг/г сырой массы)} = \frac{K \cdot V}{P \cdot 1000},$$

где K – концентрация хлорофилла, мг/л;

V – объем разведения, мл;

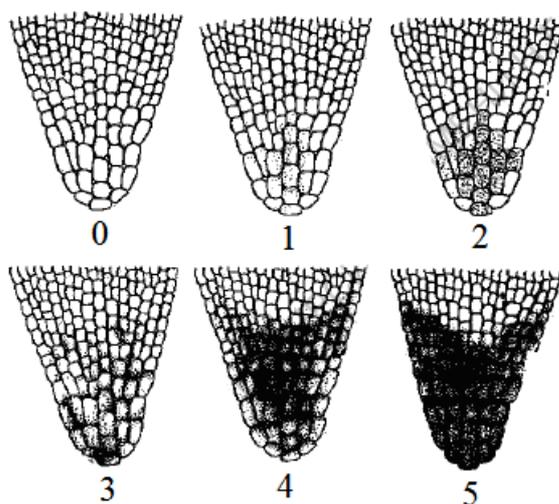
P – навеска растительного материала, г.

Опыт 3. Диагностика засухоустойчивости растений по изменению содержания статолитного крахмала

Метод определения устойчивости по изменению содержания статолитного крахмала нашел применение в селекционной практике. Статолитный крахмал, находящийся в корневом чехлике, почти не расходуется в процессе жизнедеятельности растительного организма, и в связи с этим содержание его в растении довольно постоянно. Однако было обнаружено, что при воздействии повышенной температуры или обезвоживания происходит его гидролиз (в большей степени у менее устойчивых растений). Определяя количество оставшегося крахмала, можно судить об устойчивости сорта.

Ход работы. Семена проращивают на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри при 25°C. Для определения засухоустойчивости растений проростки выдерживают в воде при 37°C в течение 1 часа. По окончании прогрева у главного корня бритвой срезают кончики 2–3 мм и окрашивают их раствором Люголя (1%-ный раствор йода в йодистом калии) в течение 30 секунд на предметном стекле. Затем краситель собирают фильтровальной бумагой, наносят каплю дистиллированной воды, накрывают покровным стеклом и прижимают. В качестве контроля окрашивают кончики корней растений, не подвергшихся действию нагрева. После окраски корни сразу же

просматривают под микроскопом. Чем меньше устойчивость, тем больше крахмала гидролизовалось. Оценку дают в баллах или в процентах к контролю (рисунок). Образцы по устойчивости разделяют на три группы: высокоустойчивые – гидролиз крахмала до 35%; среднеустойчивые – гидролиз крахмала 36-50%; неустойчивые – гидролиз крахмала более 50%.



Содержание крахмала в корневом чехлике (0 – 5 баллов)

2.4. Диагностика жароустойчивости растений

Опыт 1. Определение жаростойкости растений по Ф.Ф. Мацкову

При повышении температуры выше оптимальной в растениях нарушается обмен веществ и, как следствие, накапливаются ядовитые вещества. При более высоких температурах резко повышается проницаемость цитоплазматических мембран, а затем наступают коагуляция белков и отмирание клеток.

Если подвергнуть лист действию высокой температуры, а затем погрузить в слабый раствор соляной кислоты, то поврежденные и мертвые клетки побуреют вследствие свободного проникновения в них кислоты, которая вызовет превращение хлорофилла в феофитин, тогда как неповрежденные клетки останутся зелеными. У растений, имеющих кислый клеточный сок, феофитинизация может произойти и без обработки соляной кислотой, так как при нарушении полупроницаемости тонопласта органические

кислоты проникают из клеточного сока в цитоплазму и вытесняют магний из молекулы хлорофилла.

Ход работы. Нагреть водяную баню до 40°C, погрузить в нее по 5 листьев, скрепленных скрепкой (4 вида комнатных растений), выдержать листья в воде в течение 30 минут на уровне 40°C. Затем взять первую пробу: вынуть по одному листу каждого вида растений и поместить их в чашку Петри с холодной водой (на чашке необходимо сделать соответствующую надпись). Поднять температуру на водяной бане до 50°C и через 10 мин после этого извлечь из бани еще по одному листу и перенести их в новую чашку с холодной водой. Так постепенно довести температуру до 80°C, беря пробы, чтобы через каждые 10 минут при повышении температуры на 10°C заменять воду в чашках 0,2 н HCl и через 20 мин учитывать степень повреждения листа по количеству появившихся бурых пятен. Все действия совершать, не допуская механических повреждений листа (они тоже вызывают побурение). Результаты записать в таблицу, обозначив отсутствие побурения «—», слабое побурение «+», побурение на площади 50% «++» и сплошное побурение «+++».

Объект	Степень повреждения листьев при температуре, °C				
	40	50	60	70	80

Опыт 2. Определение температурного порога коагуляции цитоплазмы

Клетки разных растений имеют разную жаростойкость. Температура, при которой в течение 10 минут происходит полная коагуляция белков цитоплазмы, считается условной границей жаростойкости растений. Гибель клеток устанавливается при потере ими способности плазмолизироваться.

Ход работы. Приготовить 12 срезов эпидермиса элодеи и поместить по 2 среза в пробирки с небольшим количеством водопроводной воды. Нагреть в большой колбе воду. Смешивая горячую воду с холодной, приготовить в химических стаканчиках водяные бани с температурами 48, 50, 52, 54 и 58°C (сделать на стаканах надписи карандашом). Погрузить в водяные бани

пробирки со срезами, поддерживая определенную температуру путем подливания в стаканы горячей воды. Через 10 минут извлечь срезы из пробирок и перенести на предметные стекла, снабженные соответствующими надписями. Если клетки не содержат пигмента, окрасить их в растворе нейтрального красного в течение 5–10 мин, затем собрать раствор краски фильтровальной бумагой, нанести на срезы по капле 1М раствора сахарозы, закрыть покровным стеклом и через 15–20 минут рассмотреть под микроскопом. Записать результаты в таблицу, обозначая знаком «+» – плазмолиз, знаком «-» – отсутствие плазмолиза.

Каждый студент исследует один объект, а затем данные, полученные всей группой, записываются в таблицу и делаются выводы путем сопоставления температурного порога коагуляции белков цитоплазмы разных растений.

Название растения	Температура, °С					
	48	50	52	54	56	58

2.5. Диагностика морозоустойчивости растений

Физиология морозоустойчивости

На подавляющей территории нашей страны наиболее губительными для растений являются низкие температуры воздуха и почвы. Для хорошей перезимовки растений важен нормальный рост и развитие их в летний период.

В течение осеннего, зимнего и весеннего периодов года древесные растения подвергаются влиянию неблагоприятных климатических условий, которые вызывают ряд ответных защитно-приспособительных реакций растений. Комплекс ответных приспособительных реакций растений в зимний период получил в литературе наименование состояния покоя. Впавшие в зимний покой растения приобретают высокую устойчивость к действию отрицательных температур, а также и к другим неблагоприятным условиям

перезимовки. Кроме того, пониженные температуры стали для растений необходимым фактором, обуславливающим их нормальный рост весной.

Изучение физиолого-биохимических процессов, происходящих у растений при переходе в состояние покоя, дает возможность понять, объяснить и определить пути, позволяющие управлять этими процессами, с целью углубления и продления состояния покоя и повышения морозоустойчивости растений.

О глубине покоя растений и соответственно их морозоустойчивости можно судить по следующим показателям:

- 1) динамика превращений запасных веществ;
- 2) процесс обособления протоплазмы;
- 3) характер плазмолиза в растворе сахарозы;
- 4) время наступления колпачкового плазмолиза;
- 5) устойчивость липоидов к температурным воздействиям (у тех растений, у которых липоиды образуются).

Опыт 1. Показатели глубины покоя и морозоустойчивости растений

Ко времени окончания ростовых процессов в растении в большом количестве накапливается крахмал. В дальнейшем происходит превращение крахмала в сахара у большинства травянистых растений, в жиры и липоиды – у древесных пород. Наблюдение за этими превращениями проводится с помощью микрореакций.

Реакция на крахмал. Крахмал обнаруживается по йодной реакции в растворе Люголя: в 10 мл воды растворяют 2 г КJ, затем 1 г металлического йода, после чего раствор в мерной колбе доводят до 100 мл. В раствор помещают срез на 5 мин, крахмал окрашивается в фиолетовый цвет. Если окраска крахмала получается черная, то необходимо раствор Люголя разбавить водой до такой концентрации, при которой крахмал будет окрашиваться в фиолетовый цвет. Обычно концентрацию раствора Люголя удобно

устанавливать по окраске крахмальных зерен на срезах с клубней картофеля, где крахмала очень много.

Реакция на сахара. Проводится следующим образом: срезы побегов или почек на предметном стекле или в бюксе смачивают 2%-ным спиртовым раствором α -нафтола, затем туда же добавляют 1–2 капли концентрированной серной кислоты. В присутствии сахара получается темно-малиновое окрашивание. В плодово-ягодных породах большое количество сахаров удается наблюдать в стеблях малины и вишни, где ткани древесины и лубяных пучков окрашиваются в интенсивно-малиновый цвет.

Реакция на жиры и липиды. Реакция с суданом III и шарлахом является наиболее специфической для определения жиров.

Реакция на белки. Биуретовая реакция – готовят 2 раствора: 40 %-ный раствор КОН или NaOH и 1%-ный раствор CuSO_4 . К капле первого раствора на предметном стекле добавляют немного второго раствора, туда же помещают срез и слегка подогревают в течение 10 мин. Срез окрашивается в фиолетово-голубой цвет, на фоне которого обнаруживаются включения, имеющие светлую середину и темные края.

Ксантопротеиновая реакция: в крепкую азотную кислоту помещают срез и нагревают слегка в течение 10–15 мин, после чего добавляют 1–2 капли 10%-ного раствора NH_4OH . Весь срез окрашивается в желтый цвет, на этом фоне обнаруживаются включения, середина которых окрашена в красно-оранжевый цвет, а края – в желтый.

Опыт 2. Защитное действие сахара на цитоплазму при замораживании

При замерзании растительных тканей в межклетниках образуются кристаллы льда, которые оттягивают воду из цитоплазмы. Если цитоплазма не обладает достаточной морозоустойчивостью, то она, не выдержав обезвоживания, а также механического давления кристаллов льда, коагулирует. О степени повреждения цитоплазмы можно судить по ее способности удерживать клеточный сок. Устойчивость коллоидов цитоплазмы может быть

повышена защитными средствами, среди которых важная роль принадлежит растворимым сахарам.

Ход работы. Из очищенного корнеплода красной свеклы сделать 12–15 одинаковых по размеру, не очень тонких срезов (1 мм). Поместить срезы в фарфоровую чашку и тщательно промыть водой для удаления сока, вытекшего из поврежденных клеток. Перенести по 4–5 срезов в 3 пробирки, снабженные этикетками. В первую пробирку налить $\frac{1}{4}$ воды, во вторую – столько же 0,5 М раствора сахарозы, в третью – 1,0 М раствора сахарозы.

Подготовить охлаждающую смесь: к 3 частям снега или битого льда прибавить 1 часть поваренной соли и тщательно перемешать (температура должна быть около -20°C). Погрузить все пробирки в охлаждающую смесь на 15–20 мин, после чего поставить в стакан с водой комнатной температуры. После оттаивания отметить окраску жидкости в пробирках и окраску срезов. Результаты записать в таблице.

Вариант	Окраска наружного раствора	Окраска среза

Опыт 3. Превращение запасных веществ в побегах древесных растений

В течение вегетационного периода продукты фотосинтеза откладываются в запасующих тканях стеблей древесных растений. Зимой некоторые запасные вещества подвергаются гидролизу, в ходе которого накапливаются соединения, повышающие устойчивость клеток к низким температурам. Таким образом они выполняют роль криопротекторов.

Целью работы является наблюдение за изменением качественного состава и локализации запасных веществ в тканях стеблей древесных растений в осенне-зимний период. В качестве объекта исследования берут зафиксированные в парах спирта побеги дуба и липы, срезанные в сентябре и январе и поставленные в вертикальном положении в плотно закрытые банки, на дно которых налит 96 %-ный спирт.

Ход работы. На поперечных срезах стебля на срединной и верхней частях побега проводят реакции для обнаружения крахмала, жиров и редуцирующих сахаров и сравнивают их содержание в осенних и зимних образцах побегов.

1. Обнаружение крахмала. Делают тонкий поперечный срез стебля (достаточно получить сектор, включающий все части стебля – сердцевину, древесину и кору).

Помещают срез на предметное стекло в каплю раствора йода (раствор J в KJ, концентрированный раствор, приготовленный по прописи, разбавить в 3 раза), закрывают покровным стеклом и рассматривают в микроскоп сначала при малом, а затем при большом увеличении. Крахмальные зерна выглядят черными гранулами.

2. Обнаружение жиров. Помещают тонкий срез в каплю раствора красителя Судан III, накрывают его покровным стеклом и выдерживают в растворе не менее 10 мин. Затем срез промывают водой и помещают в каплю глицерина. Рассматривают в микроскоп при большом увеличении основную паренхиму коры и сердцевины, древесную и лубяную паренхимы и паренхиму лубодревесных лучей. Капли жира окрашиваются в оранжевый или красный цвет.

3. Обнаружение редуцирующих сахаров. Отрезок побега длиной в несколько сантиметров разрезают вдоль и помещают в концентрированный раствор CuSO_4 на 5 минут, после чего промывают водой и помещают в пробирку с кипящим щелочным раствором сегнетовой соли, кипятят 2 минуты. Обработанные таким способом кусочки побега промывают водой, делают тонкие поперечные срезы, помещают их на предметное стекло в каплю воды, которую затем заменяют на глицерин, срезы накрывают покровным стеклом и рассматривают под микроскопом. Кристаллы Cu_2O при малом увеличении кажутся черными, а при большом увеличении имеют красный оттенок. Более грубый метод заключается в том, что не очень тонкий срез помещают на предметное стекло в большую каплю феллинговой жидкости и, держа

пинцетом за край стекла, нагревают до кипения. Образующийся при этом осадок Cu_2O распределяется по всему препарату, что не дает возможности судить о количестве сахара в отдельных тканях.

Результаты опыта записать в таблицу, отметив, в каких тканях обнаружены те или иные запасные вещества, и дать оценку их количества (по пятибалльной шкале). Для каждой древесной породы запись начинают с результатов анализа осенних проб. Зарисовать препараты, раскрасить их цветными карандашами, сделать подписи к рисункам.

Растение	Дата взятия пробы	Локализация запасных веществ в тканях побега	Крахмал	Жир	Сахар

Опыт 4. Действие криопротекторов на жизнеспособность клеток растительных тканей при замораживании

Целью работы является наблюдение, что защитное действие смеси глицерина и сахарозы, используемых в качестве криопротекторов, выше, чем действие их чистых растворов.

Ход работы. Из корнеплода столовой свеклы пробочным сверлом диаметром 8 – 10 мм вырезают цилиндр и разрезают его на диски толщиной 2–3 мм. Все диски (общее число – 105) должны быть одинаковыми. Затем их помещают в химический стакан и тщательно промывают водой, чтобы удалить клеточный сок, вытекающий из поврежденных клеток.

Отмытые кружочки по 5 штук помещают в 7 пробирок, в каждой из которых находится по 5 мл следующих жидкостей: дистиллированной воды; 2М раствора сахарозы; 1М раствора сахарозы; 12%-ного раствора глицерина; 12%-ного раствора глицерина и 2 М раствора сахарозы в соотношении 1:1 (по 2,5 мл); 12%-ного раствора глицерина и 1М раствора сахарозы в соотношении 1:1 (по 2,5 мл); 12%-ного раствора глицерина и 0,5М раствора сахарозы в соотношении 1:1 (по 2,5 мл).

Опыт проводится в трехкратной повторности. Состав смесей растворов сахарозы и глицерина можно менять (в таком случае заполняют

дополнительные пробирки), что может быть особенно необходимо при смене объекта, так как каждый новый объект требует индивидуального подбора криопротекторов и их смесей.

Все пробирки помещают в охлаждающую смесь, состоящую из трех частей снега и одной части поваренной соли (температура -21°C). Пробирки выдерживают в ней до полного замерзания содержимого.

После этого пробирки переносят в водяную баню с температурой $25\text{--}30^{\circ}\text{C}$ для размораживания. После оттаивания растворы тщательно перемешивают и сравнивают интенсивность их окрашивания. Расположить пробирки в ряд по мере увеличения интенсивности окрашивания растворов. Установить связь между интенсивностью окрашивания растворов и составом смесей, находящихся в этих пробирках. Сделать выводы о роли криопротекторов (сахарозы и глицерина) и их смесей в сохранении жизнеспособности клеток растительных тканей при их замораживании.

Опыт 5. Определение морозоустойчивости растений на проростках

Ход работы. Каждый образец опытных семян насыпают отдельно в кристаллизатор, заливают водой на 4–6 см выше поверхности семян и ставят в термостат при 15°C на сутки для набухания. Затем воду сливают и семена оставляют при той же температуре для прорастания на 2 суток. Перед закаливанием из каждого образца отбирают по 50–100 семян приблизительно одного размера, заворачивают с этикеткой в хорошо отжатый от воды кусочек марли и помещают на вкладыш в эксикатор для закаливания. Эксикатор ставят в холодильник на 7 суток при температуре $0\text{--}+2^{\circ}\text{C}$. За это время проростки проходят первую фазу закаливания. Затем обеспечивают им условия для прохождения второй фазы (температура составляет $-4,5^{\circ}\text{C}$ в течение 1–3 суток). Третья фаза закаливания – промораживание при $-10\text{--}-15^{\circ}\text{C}$ в течение 1–3 суток. Промороженные проростки оттаивают в течение суток при 2°C . Затем на дно эксикатора наливают воду для создания влажной атмосферы и выдерживают еще двое суток при $20\text{--}25^{\circ}\text{C}$. После этого проростки переносят в

растительные. Через 7 суток отращивания в растительные при 20–25° С проводят учет выживших растений и делают вывод о степени морозоустойчивости сорта или вида.

Результаты опыта записывают в таблицу.

Вариант	Количество выживших проростков, % общего числа	Вывод о степени морозоустойчивости
1		
2		
3		

Опыт 6. Определение морозоустойчивости с использованием экзогенных сахаров

Для прохождения первой фазы закаливания растениям необходимо хорошо освещенное помещение, температура в котором поддерживается около 0°С. В условиях достаточного освещения в результате фотосинтеза в клетках накапливаются сахара. Для упрощения методики разработан метод закаливания в темноте. В этом случае накопление сахаров идет за счет поглощения их из растворов при низкой положительной температуре.

Ход работы. Растения разных сортов выращивают в оптимальных условиях до фазы кущения. Затем их помещают по 20–25 шт. в стаканчики объемом 50 мл, которые до 1/3 заполнены раствором сахарозы (должны быть погружены корни и узлы кущения). Для закаливания растения последовательно помещают в 5, 10, 15 %-ные растворы сахарозы, в каждом из которых выдерживают по 4–5 суток. При этом поддерживают температуру, близкую к 0°С. Затем растения вынимают из раствора, ополаскивают водой, заворачивают в бумагу и промораживают по следующей схеме: 3 дня при -5°С, 1 день при -16°С, 1 день при -25°С. После промораживания растений оттаивают при 2°С (бумагу не разворачивать, чтобы избежать быстрого оттаивания). Оттаявшие растения отращивают. Живые растения учитывают через 1–2 недели после высадки. Результаты опыта записать в форме таблицы.

Вариант	Количество отросших растений после промораживания при температуре, ° С				Вывод о степени морозоустойчивости
	-5	-10	-16	-25	

Опыт 7. Определение степени закалки озимых хлебов

Важной биологической особенностью озимых является их способность к закаливанию, что позволяет растениям переносить неблагоприятные условия зимнего периода. О степени закаленности растений позволяет судить метод, основанный на определении жизнеспособности эпидермиса нижней стороны листа после закаливания. Во время закалки клетки эпидермиса нижней стороны листа приобретают повышенную прочность к механическим повреждениям. У незакаленных растений клетки эпидермиса повреждаются и теряют способность к плазмолизу.

Ход работы. У закаленных и незакаленных растений с нижней стороны средней части первого листа срывают эпидермис. Удобнее всего лист положить на указательный палец левой руки, затем сделать бритвой неглубокий поперечный разрез и осторожно снять эпидермис вдоль листа. Изолированный эпидермис помещают для окрашивания на несколько минут в 0,05%-ный раствор нейтрального красного. Окрашенные срезы переносят на предметное стекло в каплю 0,75 М раствора сахарозы и накрывают покровным стеклом. Через несколько минут живые клетки плазмолизируют. По каждому варианту делают 2–3 среза эпидермиса. Клетки просматривают в 2–3 полях зрения микроскопа.

Опыт 8. Диагностика устойчивости озимых к физиологическому выпреванию

Выпревание наблюдается, главным образом, на тяжелых почвах с плохой водопроницаемостью. Чаще всего этот процесс происходит под глубоким снегом в темноте при отсутствии фотосинтеза, когда наблюдается слабый рост, постепенное углеводно-белковое истощение и гибель растений. Для оценки

устойчивости растений к выпреванию на ранних этапах онтогенеза можно моделировать выпревание.

Ход работы. Семена различных сортов озимых высевают в кюветы в почву или песок (по 50–100 семян в трехкратной повторности). На второй день после появления всходов растения помещают в камеры с условиями, близкими к тем, которые наблюдаются под глубоким снежным покровом: темнота, температура – 0–2°C, влажность воздуха и почвы – 90 – 93 %. Через 15 – 30 дней пребывания в камере растения выносят для отращивания. Отращивание проводят при 20 – 26°C с продолжительностью освещения 16 часов. На 10-й день отращивания подсчитывают число нормально отросших растений. Результаты опытов записывают в форме таблицы.

Вариант	Сроки выпревания, сут.	Количество выживших растений, % числа всходов	Выводы

Список литературы

1. *Алехина Н.Д., Балнокин Ю.В., Гавриленко В.Ф. и др.* Физиология растений: учебник для студ., вузов. М.: Изд. центр «Академия», 2005. 640 с.
2. *Альтергот В.Ф.* Действие повышенной температуры на растение в эксперименте и природе// 40-е Тимирязевское чтение. М.: Наука, 1981. 57 с.
3. *Генкель П.А.* Физиология жаро- и засухоустойчивости растений. М.: Наука, 1982. 280 с.
4. *Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е.* Ответ растений на гипертермию: молекулярно-клеточные аспекты// Вестник Харьковского национального аграрного университета. Серия: Биология. 2009. Вып.1 (16). С. 16–38.
5. *Кулаева О.Н., Микулович Т.П., Хохлова В.А.* Стрессовые белки растений// Современные проблемы биохимии. М.: Наука, 1991. С.174–190.
6. *Кулаева О.Н.* Белки теплового шока и устойчивость растений к стрессу// Соросовский образовательный журнал. 1997. № 2. С. 5–13.
7. *Кузнецов Вл.В., Шевякова Н.И.* Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция// Физиология растений. 1999. Т. 46, № 2. С. 321–336.
8. *Кузнецов Вл.В., Дмитриева Г.А.* Физиология растений: учебник. М.: Высш. шк., 2006. 742 с.
9. *Косулина Л.Г., Луценко Э.К., Аксенова В.А.* Физиология устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды. Ростов н/Д.: Изд-во Рост. ун-та, 1993. 238 с.
10. *Клышев Л.К. и др.* Биохимические механизмы интоксикации растений при засолении среды. Алма-Ата: Наука, 1980. 171 с.
11. *Лось Д.А.* Молекулярные механизмы холодоустойчивости растений// Вестник Российской академии наук. 2005. Т. 75, № 4. С. 338–345.
12. *Медведев С.С.* Физиология растений: учебник. СПб.: Изд-во СПбГУ, 2004. 336 с.
13. *Практикум по физиологии растений.* М.: Колос, 1982. 271 с.
14. *Полевой В.В.* Внутриклеточные и межклеточные системы регуляции у

- растений// Соросовский образовательный журнал. 1997. № 9. С. 6-11.
15. *Регуляция* адаптивных реакций растений. Казань: Изд-во Казан. ун-та, 1990. 126 с.
 16. *Рекославская Н.И.* Адаптационные изменения в белковом и аминокислотном обмене у растений в условиях водного стресса// Стрессовые белки растений. Новосибирск: Наука, 1989. С.113–142.
 17. *Тарчевский И.А.* Катаболизм и стресс у растений// 52-е Тимирязевское чтение. М.: Наука, 1993. 80 с.
 18. *Тарчевский И.А.* Метаболизм растений при стрессе. Казань: ФЭН, 2001. 448с.
 19. *Тарчевский И.А.* Сигнальные системы клеток растений. М.: Наука, 2002. 294 с.
 20. *Титов А.Ф., Акимова Т.В., Таланова В.В., Топчиева Л.В.* Устойчивость растений в начальный период действия неблагоприятных температур. М.: Наука, 2006. 143 с.
 21. *Трунова Т.И.* Растение и низкотемпературный стресс// 64-е Тимирязевское чтение. М.: Наука, 2007. 54 с.
 22. *Удовенко Г.В.* Солеустойчивость культурных растений. Л: Колос, 1977. 215 с.
 23. *Удовенко Г.В.* Устойчивость растений к абиотическим стрессам// Физиологические основы селекции. Теоретические основы селекции. СПб.: Изд-во ВИР. 1995. Т. 2, ч. 1. С. 293–352.
 24. *Чиркова Т.В.* Физиологические основы устойчивости растений. СПб.: Изд-во СПбГУ, 2002. 244 с.
 25. *Чудинова Л.А., Орлова Н.В.* Физиология устойчивости растений: учеб. пособие/ Перм. ун-т. Пермь, 2006. 124 с.
 26. *Чудинова Л.А., Филатова Л.А.* Физиология устойчивости растений к экстремальным факторам: метод. указ. к лабораторным работам/ Перм. ун-т. Пермь, 1991. 24 с.

27. *Шакирова Ф.М.* Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. Уфа: Гилем, 2001. 160 с.
28. *Растение и стресс: курс лекций/ Урал. гос. ун-т.* Екатеринбург, 2008.
29. URL: http://elar.urfu.ru/bitstream/10995/1580/4/1333214_lectures.pdf.

Оглавление

Введение.....	3
Глава 1. Физиолого-биохимические основы устойчивости растений.....	6
1.1. Общие представления о стрессе и стрессорах.....	6
1.2. Водный дефицит и засухоустойчивость растений.....	19
1.3. Гипертермия и жароустойчивость растений.....	32
1.4. Гипотермия и холодоустойчивость растений.....	40
1.5. Засоленные почвы и солеустойчивость растений.....	49
Глава 2. Оценка и диагностика устойчивости растений к экстремальным факторам.....	62
2.1. Оценка качества семян.....	62
2.2. Определение солеустойчивости растений	70
2.3. Определение степени засухоустойчивости растений.....	75
2.4. Диагностика жароустойчивости растений.....	78
2.5. Диагностика морозоустойчивости растений.....	80
Список литературы	90

Учебное издание

Составители Оксана Александровна Четина, Лариса Алексеевна Чудинова

Учебная практика по физиологии и биохимии растений

Учебное пособие

Редактор *Л.В. Хлебникова*
Корректор *М.Н. Демидова*
Компьютерная вёрстка

Подписано в печать Формат 60×84 ¹/₁₆
Усл. печ. л. Тираж экз. Заказ .

Издательский центр Пермского государственного национального исследовательского
университета
614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15

Типография ПГНИУ
614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15