

О. В. Молчан
С. Н. Филиппова

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ
И КЛЕТочНЫЕ ОСНОВЫ
РЕГУЛЯЦИИ ПРОДУКТИВНОСТИ
КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ**

*Рекомендовано
Учебно-методическим объединением
по естественно-научному образованию в качестве
учебно-методического пособия для студентов
учреждений высшего образования, обучающихся
по специальности 1-31 01 01 «Биология
(по направлениям)», направление специальности
1-31 01 01-03 «Биология (биотехнология)»*

УДК 631.524.84(075.8) + 606:631.52(075.8)

ББК 41.31я73

М76

Рецензенты:

кандидат биологических наук *И. А. Жарина*;
кандидат биологических наук *Ж. Н. Калацкая*

Молчан, О. В.

М76 Молекулярные и клеточные основы регуляции продуктивности культурных растений : учеб.-метод. пособие / О. В. Молчан, С. Н. Филиппова. – Минск : БГУ, 2021. – 119 с. : ил.
ISBN 978-985-881-087-0.

Учебно-методическое пособие является составным элементом учебно-методического комплекса по курсу «Молекулярные и клеточные основы регуляции продуктивности культурных растений». Представлены теоретические сведения и практические методики, даны задания для самостоятельной работы и контроля знаний студентов.

Предназначено для студентов учреждений высшего образования, обучающихся по специальности 1-31 01 01 «Биология (по направлениям)», направление специальности 1-31 01 01-03 «Биология (биотехнология)».

УДК 631.524.84(075.8) + 606:631.52(075.8)

ББК 41.31я73

ISBN 978-985-881-087-0

© Молчан О. В.,
Филиппова С. Н., 2021
© БГУ, 2021

ПРЕДИСЛОВИЕ

Представленное учебно-методическое пособие входит в состав учебно-методического комплекса по специальному курсу «Молекулярные и клеточные основы регуляции продуктивности культурных растений». Оно включает методические рекомендации и вводные пояснения к лабораторным занятиям, задания для самостоятельной работы и контроля знаний студентов.

Цель данной учебной дисциплины — освоение студентами теоретических основ и методических принципов управления продукционным процессом растений на основе знания внутриклеточных регуляторных механизмов и ознакомление с фундаментальными и прикладными аспектами регуляции продуктивности культурных растений.

Тематика предлагаемых лабораторных работ подобрана согласно программе учебного курса, а их выполнение позволит закрепить полученные теоретические знания. Задания для самостоятельной работы и контроля знаний помогут студентам расширить представление об изученных процессах. Использование рекомендуемой литературы будет способствовать углублению полученных теоретических и практических знаний.

В результате изучения учебной дисциплины студент должен **знать:**

- основные современные направления и перспективы повышения продуктивности культурных растений;
- закономерности и способы регуляции роста и развития растений внешними факторами;
- механизмы процессов трансдукции эндогенных и экзогенных сигналов в растительной клетке;

- молекулярные внутриклеточные мишени управления продуктивностью растений;

уметь:

- использовать биохимические и физиологические методы для исследования функциональной активности процессов формирования элементов продуктивности;

- использовать методические приемы прогнозирования и определения продуктивности растений;

- оптимизировать условия внешней среды для управления процессами роста и развития растений в соответствии с целями культивирования;

- выявлять молекулярные мишени и составлять алгоритм действий по регуляции процессов формирования конкретного элемента продуктивности, прогнозировать результат;

владеть:

- навыками проведения физиолого-биохимических исследований растительного организма.

Данное учебно-методическое пособие предполагает:

- ознакомление учащихся с рядом методов управления продуктивностью растений и оценки эффективности продукционного процесса;

- практическое освоение физиолого-биохимических методов анализа продуктивности растений;

- формирование навыков выбора методов, которые больше всего соответствуют выдвигаемым задачам и имеющимся возможностям при выполнении магистерских и кандидатских диссертаций, реализации студенческих научных проектов, а также целевым задачам производства;

- приобретение навыков анализа данных, полученных при проведении научных исследований;

- самостоятельную работу по поиску, изучению, анализу и обобщению специальной научно-методической литературы.

Оценка качества выполнения лабораторной работы будет формироваться на основе правильности и корректности интерпретации полученных результатов, развернутости описания всех этапов выполнения задания, полноты ответов на контрольные вопросы.

При оценивании реферата будет обращать внимание на содержание и полноту раскрытия темы, структуру и последова-

тельность изложения, качество и количество использованных источников, корректность оформления.

Тесты будут оцениваться по доле правильно выполненных заданий.

Оценка за письменную контрольную работу будет выведена на основе полноты раскрытия вопроса, логичности и грамотности изложения материала.

Студент допускается к сдаче зачета по учебной дисциплине при условии отработки всех лабораторных занятий и защите отчетов по лабораторным работам, получения положительных оценок по контрольным работам и тестам.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК	— активные формы кислорода
БАВ	— биологически активные вещества
ВЭЖХ	— высокоэффективная жидкостная хроматография
ГК	— гибберелловая кислота
ГТФ	— гуанозинтрифосфат
ГХ	— газовая хроматография
ДАГ	— диацилглицерин
ДФ	— диацетат флуоресцеина
ДГ	— диацилглицерол
ИУК	— индолилуксусная кислота
ИФ ₃	— инозитол-1,4,5-трифосфат
МС	— масс-спектрометрия
НАДФ	— никотинамидадениндинуклеотидфосфат
РЦ	— реакционный центр
РФК	— реактивные формы кислорода
ССК	— светособирающий комплекс
ТСХ	— тонкослойная хроматография
ТТХ	— 2,3,5-трифенилтетразолийхлорид
ФАВ	— физиологически активные вещества
ФАР	— физиологически активная радиация
ФСА	— фотосинтетический аппарат
ФС	— фотосистема
ЭПР	— эндоплазматический ретикулум
цАМФ	— циклический аденозинмонофосфат
цГМФ	— циклический гуанозинмонофосфат
EGTA	— ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (хелатор кальция)
HEPES	— 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота

- LED – Light Emission Diodes (светоизлучающие диоды)
- L-NNA – N(G)-nitro-L-arginine (N(G)-нитро-L-аргинин) – ингибитор NO-синтазы
- NO – оксид азота
- NOS – Nitric oxide synthases (NO-синтаза)
- PAM – Pulse-Amplitude-Modulation (амплитудно-импульсная модуляция)
- cPTIO – 2-Phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide potassium salt (нейтрализатор радикалов оксида азота)
- SNP – Sodium nitroprusside (нитропруссид натрия)

ВВЕДЕНИЕ

В связи с острой необходимостью повысить продуктивность растениеводства и резко увеличить продукцию зеленой растительной биомассы сегодня актуальным является переход на новые сверхэффективные технологии. Они уже развиваются на стыке биологических, информационных и технических наук, создается новая индустрия — сельскохозяйственная биотехнология, главная задача которой — повышение продуктивности культур, получение функционально важных для здоровья пищевых, лекарственных и технических продуктов.

Насущными остаются также задачи совершенствования имеющихся и разработки новых технологий и подходов к культивированию растений, поскольку повышение продуктивности растительного организма возможно только в результате реализации его генетической программы развития в конкретных условиях.

Ключевым направлением в повышении продуктивности культур являются исследования молекулярных и клеточных механизмов управления процессами роста и развития растительного организма, формирования элементов продуктивности в соответствии с целевыми задачами производства, разработка подходов и методов на их основе.

В ряд важнейших задач учебного процесса также входит изучение методов и подходов, используемых при оценке физиолого-биохимических параметров роста, развития и стрессоустойчивости культурных растений; исследование молекулярных и клеточных механизмов экзогенной регуляции физиологических процессов при формировании различных элементов продуктивности культурных растений.

РАЗДЕЛ 1

ЛАБОРАТОРНЫЕ ЗАНЯТИЯ

Лабораторная работа 1

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ РАСТЕНИЙ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОФИЛЛА В ЛИСТЬЯХ

Цель работы: изучение изменения эффективности фотохимических реакций под действием неблагоприятных факторов окружающей среды (дефицит минерального питания, избыточная или недостаточная инсоляция) и физиологически активных веществ (диурон, фторид натрия) по интенсивности флуоресценции хлорофилла.

Материалы и оборудование: свежие листья растений, выращенные при различных условиях, мел, кварцевый песок, NaCl, сахароза, *трис*-(оксиметил)-аминометан, HCl, KOH, диурон, NaF, ножницы, ступки фарфоровые, пинцеты, пробочное сверло, капроновая ткань, центрифужные и микроцентрифужные пробирки, пробирки стеклянные, штативы для пробирок, мерные цилиндры, мерные колбы, дозаторы, весы, центрифуга, спектрофотометр, спектрофлуориметр Varian Cary Eclipse.

Вводные замечания

Характер изменения первичных стадий фотосинтеза непосредственно отражается в изменении флуоресценции хлорофилла в фотосинтетических мембранах хлоропластов.

При поглощении кванта света молекула хлорофилла переходит из основного синглетного состояния (S_0) в одно из возбужденных син-

глетных состояний (S_1 или S_2). Такой переход сопровождается изменением внутренней энергии молекулы и деформацией ее электронного облака.

Снятие возбуждения (деактивация) молекулы может происходить несколькими способами (рис. 1.1) в результате:

1) внутримолекулярных безызлучательных процессов, включающих колебательную релаксацию и внутреннюю конверсию. При этом избыток энергии рассеивается в виде тепла или перераспределяется между соседними молекулами;

2) флуоресценции. При этом молекула переходит из возбужденного состояния (S_1 или S_2) в основное синглетное состояние (S_0). Избыток энергии излучается в виде кванта света;

3) фосфоресценции. При этом молекула переходит из возбужденного состояния (S_1) в триплетное состояние (T_1) в результате безызлучательных переходов, а затем из (T_1) в основное синглетное состояние (S_0) с излучением энергии в виде кванта света;

4) первичных фотохимических реакций. Энергия возбужденного состояния молекулы расходуется на выполнение химической работы. Первичная фотохимическая реакция заключается в донировании электрона окисленной молекуле акцептора в окислительно-восстановительной системе.

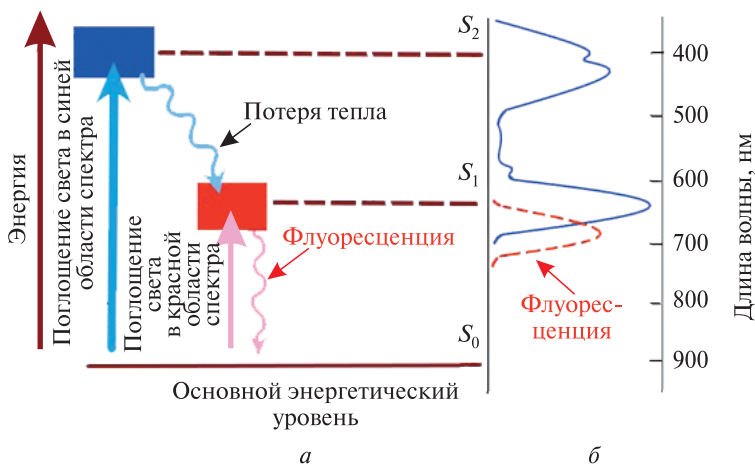


Рис. 1.1. Схема основных электронных переходов (а) и спектр поглощения и флуоресценции (б) молекулы хлорофилла

In vivo все указанные выше процессы могут протекать одновременно. Чем ниже эффективность первичных фотохимических реакций и расход энергии на внутримолекулярные безызлучательные процессы, тем выше интенсивность флуоресценции. Первичные процессы фотосинтеза высших растений осуществляются при участии двух ФС, функционирующих последовательно. ФС II разлагает воду с выделением свободного кислорода и отдает электрон через цепь переносчиков на ФС I, которая восстанавливает НАДФ. В клетке в основном флуоресцирует хлорофилл, принадлежащий ФС II, и именно изменение его флуоресценции свидетельствует о состоянии РЦ этой ФС.

При активном фотосинтезе, если все РЦ фотосистем находятся в открытом рабочем состоянии, в условиях слабого освещения почти вся поглощенная хлорофиллом энергия света используется в процессе первичных химических реакций. Поэтому интенсивность флуоресценции хлорофилла в клетке очень низкая. Однако и в таком случае небольшая часть поглощаемой энергии (не более 3 %) трансформируется в энергию флуоресценции, при этом регистрируется так называемая фоновая флуоресценция (F_0). Поскольку величина F_0 зависит от количества хлорофилла в клетках, ее можно также использовать для характеристики его концентрации. Как правило, в нормальных условиях величина F_0 достаточно низкая, что говорит об активном использовании клетками энергии поглощенного света для образования органического вещества в процессе фотосинтеза. Но если при каких-либо воздействиях нарушается состояние фотосинтетических мембран, РЦ переходят в неактивное (закрытое) состояние, поток электронов в первичных процессах фотосинтеза прекращается. В этих условиях поглощенная энергия света уже не может эффективно использоваться в фотосинтезе, поэтому и флуоресценция хлорофилла возрастает. Можно ингибировать работу электрон-транспортной цепи фотосинтеза, например, воздействием диурона. В этом случае флуоресценция сильно возрастает и приближается к своим максимальным значениям F_{\max} . Известно, что закрыть РЦ можно, также создавая избыточную освещенность клеток, т. е. при световом насыщении фотосинтеза. И в этом случае большая часть поглощенной хлорофиллом энергии света трансформируется во флуоресценцию.

Разницу между интенсивностями флуоресценции хлорофилла при закрытых и открытых РЦ ($F_v = F_{\max} - F_0$) называют переменной флуоресценцией (F_v) хлорофилла. Величина F_v соответствует той части

энергии света, которая используется открытыми РЦ в фотосинтезе, т. е. может характеризовать активность начальных стадий фотосинтеза. На практике часто оценивают отношение F_v/F_{\max} . Как оказалось, этот параметр хорошо коррелирует с фотосинтетической эффективностью (продуктивностью), определенной классическими методами по восстановлению CO_2 с помощью изотопов углерода (^{14}C).

Еще одним источником информации о характере функционирования ФСА является процесс замедленной флуоресценции и оценка его параметров. Явление замедленной флуоресценции состоит в том, что после светового возбуждения в фотосинтезирующих клетках наблюдается слабое, длительно затухающее свечение, испускаемое хлорофиллом. Это свечение возникает уже после прекращения флуоресценции (F_0) за счет энергии, выделяемой в ходе темновых реакций первичных фотопродуктов фотосинтеза в РЦ.

Среди неблагоприятных факторов среды, влияющих на фотосинтетическую продуктивность при культивировании растений, наибольшее значение имеют свет повышенной интенсивности, неблагоприятные температуры, недостаток минерального питания.

При избыточной инсоляции в результате процессов фотоингибирования фотосинтеза развиваются длительные и глубокие перестройки ФСА, проявляющиеся в снижении фотосинтетической активности и увеличении флуоресценции (рис. 1.2). Механизм этого явления также связан с тем, что в условиях блокирования переноса электронов из-за образования их избытка в цепи фотосинтеза происходит генерация АФК, приводящая к окислительному стрессу и разрушению клеточных мембран в процессе перекисного окисления липидов. В качестве защитного механизма в клетке происходит распад белков РЦ, который приводит к прекращению фотосинтеза. Распад РЦ происходит в результате протеолитического расщепления белка D_1 РЦ ФС II. Для реактивации РЦ необходимы повторный синтез белка D_1 и его встраивание в РЦ ФС. В условиях оптимальной освещенности устанавливается равновесие между процессом фотоингибирования с распадом D_1 -белка и процессом реактивации с его ресинтезом. Однако при длительном интенсивном освещении могут происходить уже необратимые повреждения РЦ, сопровождающиеся глубокой фотодеструкцией мембран вследствие развития перекисного окисления липидов. Показано, что под действием света повышенной интенсивности снижается фотосинтетическая эффективность (F_v/F_{\max}) как реакция клетки на световое воздействие. Фотоингибирование РЦ сначала но-

сит обратимый характер, а клетки сохраняют свою жизнеспособность. Однако при дальнейшем освещении ФСА уже не справляется с фотоингибированием, происходит накопление продуктов перекисного окисления липидов, что видно по росту темновой люминесценции. Именно в этот период и происходит гибель клеток.



Рис. 1.2. Свет повышенной интенсивности снижает фотосинтетическую активность и увеличивает флуоресценцию

Таким образом, обратимое падение активности РЦ происходит до появления продуктов перекисного окисления липидов и не сопровождается гибелью самих клеток. Снижение эффективности первичных стадий фотосинтеза в принципе может иметь регуляторный характер и являться защитной адаптивной реакцией ФСА на начальных этапах высокоинтенсивного освещения.

Сигналом для возникновения флуоресценции могут служить некоторые продукты метаболизма, появляющиеся в клетке в условиях недостатка элементов минерального питания. Например, при дефиците азота, когда скорость роста и, следовательно, потребность в продуктах фотосинтеза и световой энергии снижены, адаптивные реакции приводят к уменьшению фотосинтетической активности РЦ, что проявляется в снижении параметра F_v / F_{max} . Это одна из наиболее ранних регуляторных реакций ФСА на дефицит минерального питания. Она направлена на то, чтобы предотвратить транспортировку избыточного количества электронов, возникновение повышенного электронного возбуждения в цепи переносчиков и, таким образом, генерации АФК.

Как уже отмечалось, в обычных световых условиях в клетке устанавливается динамическое равновесие между процессом фотоингибирования РЦ с распадом D₁-белка и его ресинтезом. Под действием неблагоприятных факторов среды замедляются процессы восстановления белка, что приводит к уменьшению активности РЦ и снижению фотосинтетической продуктивности. Динамику этих репарационных процессов (ресинтеза белка) можно проследить по изменениям величины F_v/F_{max} при восстановлении активности фотосинтеза после повреждения. Это значит, что флуоресцентные методы могут использоваться в качестве интегрального показателя для состояния процессов ресинтеза белка РЦ и степени восстановления активности фотосинтеза.

Таким образом, функционирование РЦ фотосинтеза направленно изменяется под действием внешних факторов, и это непосредственно отражается на фотосинтетической продуктивности растений. Развитие и использование флуоресцентных методов является перспективным направлением в прогнозировании состояния и продуктивности растений.

Изучение флуоресценции хлорофилла может быть использовано для неинвазивного исследования физиологического состояния растений. Измерить различные параметры флуоресценции хлорофилла в живом листе можно с помощью РАМ-флуориметра (рис. 1.3). Эмиттер в таком приборе предназначен для генерации возбуждающего света длиной волны 650 нм, а детектор — для регистрации излучаемой листом флуоресценции длиной волны более 700 нм. Кроме того, в приборах РАМ предусмотрена возможность освещения листа импульсным (с высокой частотой) и постоянным светом высокой интенсивности.

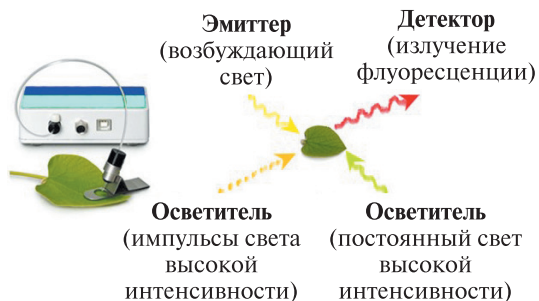


Рис. 1.3. Общая схема работы РАМ-флуориметра (по Гавриленко, 2003)

С помощью РАМ-флуориметра можно определить фоновый уровень флуоресценции (F_0) и максимально возможную флуоресценцию при неработающей электрон-транспортной цепи в хлоропластах (F_{\max}).

Для оценки функционального состояния ФСА проводят измерения флуоресценции и анализ индукционных кривых флуоресценции хлорофилла интактных листьев.

1. Измеряют параметры индукции флуоресценции хлорофилла (F_0 и F_{\max}) у адаптированного к темноте листа, вычисляют

$$F_v = F_{\max} - F_0,$$

где F_v – переменная флуоресценция, т. е. флуоресценция в ответ на освещение высокой интенсивности (при неработающей электрон-транспортной цепи), коррелирует с общим содержанием хлорофилла, излучается хлорофиллом ФС II; F_{\max} – максимальный уровень флуоресценции хлорофилла, который регистрируется при освещении мощной насыщающей вспышкой; F_0 – постоянный фоновый уровень флуоресценции, который излучается хлорофиллом до передачи энергии в РЦ, зависит от доли хлорофилла, не передающего энергию в РЦ.

Показатель F_v/F_0 отражает функциональную активность (A_{Φ}) ФС II:

$$A_{\Phi} \text{ ФС II} = \frac{F_{\max} - F_0}{F_{\max}}.$$

2. Определяют стационарный уровень флуоресценции хлорофилла F_s (после затухания флуоресценции, вызванной мощной насыщающей вспышкой) при различных вариантах интенсивности света и уровня флуоресценции F_{\max} после освещения дополнительной насыщающей вспышкой.

Также с помощью РАМ можно рассчитывать скорость возрастания интенсивности флуоресценции и скорость тушения флуоресценции, которая отражает индуцируемую светом активацию ферредоксин-НАДФ⁺-оксидоредуктазы и другие параметры.

Данный метод исследования, несмотря на трудности в интерпретации индукционных кривых флуоресценции, сегодня активно используется для оценки функционального состояния ФСА и процессов фотосинтеза при решении многих фундаментальных и прикладных задач.

Спектры флуоресценции тканей, клеток и экстрактов растений при комнатной температуре характеризуются двумя максимумами в интервале длин волн 680–690 нм (F_{685}) и 730–750 нм (F_{740}). Предполагают, что F_{685} – это флуоресценция хлорофилла ФС II,

а F_{740} – ФС I. Соотношение максимумов в спектре флуоресценции, параметр $\omega = F_{740}/F_{685}$, определяется степенью агрегированности форм хлорофилла и реабсорбцией излучения, обусловленной перекрытием коротковолновой области спектра флуоресценции хлорофилла с длинноволновой областью его спектра поглощения. Жизненный цикл фотосинтезирующего листа связан с возрастом и последующим спадом длинноволновой флуоресценции, т. е. у молодых и стареющих тканей снижены и уровень флуоресценции в области 730–750 нм, и значение параметра ω . Величина параметра ω также видоспецифична и зависит от уровня и сбалансированности минерального питания, концентрации CO_2 , освещенности и длительности светового дня, влажности почвы и воздуха. При оптимальных условиях роста растения регистрируют максимальные значения как параметра ω , так и относительной скорости прироста биомассы.

Форма спектров флуоресценции хлорофилла *in vivo* также определяется условиями проведения эксперимента: оптической плотностью и светорассеивающими свойствами образца, концентрацией хлорофилла, реабсорбцией, длиной волны и интенсивностью возбуждающего света, длительностью освещения листа и скоростью развертки спектра. Поэтому для сравнительного анализа физиологического состояния листьев всегда важно соблюдать одинаковые условия проведения экспериментов.

Ход работы

1. Получение листовых дисков и суспензии хлоропластов.

Листовые диски получают из листьев (обработанных и необработанных ФАВами, см. п. 2). Пробочным сверлом вырезать диски диаметром 5 мм (10 шт. на каждый вариант эксперимента).

Суспензии хлоропластов получают методом дифференциального центрифугирования в водных растворах, что позволяет сохранить фотохимическую активность хлоропластов. *Перед началом работы обязательно включить центрифугу в режиме охлаждения! Все растворы, посуду и принадлежности, необходимые для приготовления суспензии, охладить и хранить при 4 °С.*

Приготовить 50 мл среды выделения, содержащей 0,4 М сахарозу, 0,01 М NaCl, 0,07 М фосфатный или *трис*-буфер (рН 7,9–8,0).

Навеску листьев (10 г) охладить в течение 20 мин в полиэтиленовом пакете в холодильнике. Растительный материал измельчить нож-

ницами и гомогенизировать в охлажденной фарфоровой ступке в среде выделения при соотношении ткань/среда, равном 1/5. Тщательно растертый материал отфильтровать через два слоя капроновой ткани и отжать пинцетом. Полученный фильтрат центрифугировать при 100 g и 4 °С в течение 5 мин. Супернатант центрифугировать 15 мин при 1000 g и 4 °С. Полученный супернатант слить, а осадок, содержащий хлоропласты, промыть средой выделения и снова центрифугировать. Осадок ресуспендировать в среде выделения, объем гомогената довести до 10 мл.

Для спектрофотометрического определения хлорофилла аликвоту суспензии хлоропластов каждого варианта растереть в охлажденной ступке в 96%-м этаноле до полного обесцвечивания растительного материала, отфильтровать и измерить объем экстракта. С помощью спектрофотометра установить величину поглощения A экстракта при 665 и 649 нм (в диапазоне 0–1 отн. ед.). Определить концентрацию хлорофилла (мг/л) по формуле

$$C_{a+b} = 6,1 \cdot A_{665} + 20,04 \cdot A_{649}.$$

Рассчитать содержание хлорофилла в суспензии хлоропластов в каждом варианте.

Хранить полученную суспензию хлоропластов следует при 0–3 °С. Для обработки ФАВАми и определения интенсивности флуоресценции использовать суспензии хлоропластов с равной концентрацией хлорофилла.

2. Обработка листовых дисков и хлоропластов физиологически активными веществами — блокаторами первичных этапов фотосинтеза.

При обработке можно использовать следующие препараты:

- диурон — гербицид, применяемый для уничтожения однолетних и двудольных сорных растений. Препарат нарушает первичные процессы фотосинтеза, блокируя электрон-транспортную цепь после первичного акцептора ФС II;
- фторид натрия препятствует дефосфорилированию ССК2, блокируя фермент фосфатазу. Таким образом, в ФС I поступает больше энергии, чем в ФС II, поэтому повышается уровень длинноволновой флуоресценции.

Обработку листовых дисков провести двумя способами.

Способ 1. Водные растворы диурона (0,01 %) или фторида натрия (10^{-2} М) ввести в лист через жилку с помощью медицинского шприца и через 1–1,5 ч инкубации использовать листья для получения ли-

стовых дисков и суспензии хлоропластов (см. п. 1) и измерения флуоресценции, как описано в п. 3.

Способ 2. Инкубировать листовые диски в водных растворах диурона (0,01 %) или фторида натрия (10^{-2} М) в течение 1 часа, после чего провести измерение флуоресценции в обработанных и необработанных дисках, как описано в п. 3.

Обработать хлоропласты. Для этого добавить к суспензии хлоропластов (1 мл) 10 мкл раствора диурона или фторида натрия (конечные концентрации веществ – 0,01 % и 10^{-2} М соответственно) и инкубировать в течение 1 часа. Затем определить интенсивность флуоресценции, как описано в п. 3.

3. Определение флуоресценции хлорофилла.

А. Регистрация спектров флуоресценции после обработки NaF.

Суспензию хлоропластов (100 мкл) и/или листовые диски, полученные из растений различных вариантов, обработанные и необработанные фторидом натрия, поместить в лунки тест-планшета для измерения интенсивности флуоресценции. Выдержать в темноте в течение 5 мин, затем провести измерение и анализ спектров флуоресценции при длине волны возбуждения 550 нм. Записать и проанализировать форму спектра флуоресценции хлорофилла различных объектов исследования.

Оценить величины и отношение длинноволновой и коротковолновой интенсивности флуоресценции (F_{740} и F_{685}) с использованием статистической обработки результатов (см. п. 4).

Определить величину параметра $\omega = F_{740}/F_{685}$.

Заполнить табл. 1.1.

Таблица 1.1

Условия культивирования растений	Объект исследования	F_{740}	F_{685}	$\omega = F_{740}/F_{685}$	F_{740} NaF	F_{685} NaF	$\omega = F_{740}/F_{685}$ NaF
Контроль – оптимальные условия культивирования	Суспензия хлоропластов						
	Листовые диски						
Недостаток элементов минерального питания	Суспензия хлоропластов						
	Листовые диски						

Условия культивирования растений	Объект исследования	F_{740}	F_{685}	$\omega = F_{740}/F_{685}$	F_{740} NaF	F_{685} NaF	$\omega = F_{740}/F_{685}$ NaF
Недостаточное освещение	Суспензия хлоропластов						
	Листовые диски						
Избыточное освещение	Суспензия хлоропластов						
	Листовые диски						

Б. Регистрация спектров флуоресценции после обработки диуроном.

Суспензию хлоропластов (100 мкл) и/или листовые диски, полученные из растений различных вариантов, обработанные и необработанные диуроном, поместить в лунки тест-планшета для измерения интенсивности флуоресценции. Выдержать в темноте в течение 5 мин, затем провести измерение и анализ спектров флуоресценции при длине волны возбуждения 550 нм. Определить интенсивность флуоресценции, соответствующей максимуму спектра испускания (F_0 , F_d), с использованием статистической обработки результатов (см. п. 4).

Результаты записать в табл. 1.2.

Таблица 1.2

Условия культивирования растений	Объект исследования	$\omega = F_{740}/F_{685}$	F_0	F_d	$F_v = F_d - F_0$	F_v/F_d
Контроль – оптимальные условия культивирования	Суспензия хлоропластов					
	Листовые диски					
Недостаток элементов минерального питания	Суспензия хлоропластов					
	Листовые диски					
Недостаточное освещение	Суспензия хлоропластов					
	Листовые диски					

Окончание табл. 1.2

Условия культиви- рования растений	Объект исследования	$\omega =$ $= F_{740}/F_{685}$	F_0	F_d	$F_v =$ $= F_d - F_0$	F_v / F_d
Избыточное освещение	Суспензия хлоропластов					
	Листовые диски					

4. Статистическая обработка результатов.

Статистическую обработку результатов провести с использованием программы Microsoft Office Excel. Результаты в табл. 1.1, 1.2 представить как средние значения и их стандартные отклонения.

Контрольные вопросы

1. Какая величина характеризует активность начальных стадий фотосинтеза?
2. Какой параметр флуоресценции хлорофилла коррелирует с фотосинтетической продуктивностью, определенной классическими методами с помощью радиоактивных изотопов ^{14}C ?
3. Как изменяется эффективность фотохимических реакций при дефиците минерального питания, избыточной или недостаточной инсоляции?
4. От каких факторов зависит величина параметра $\omega = F_{740}/F_{685}$?

Лабораторная работа 2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФИТОГОРМОНПОДОБНОЙ АКТИВНОСТИ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПРЕПАРАТОВ С ПОМОЩЬЮ БИОТЕСТОВ

Цель работы: определение фитогормонподобной активности, идентификация механизма действия и оценка качества коммерческих регуляторов роста растений с помощью биотестов.

Материалы и оборудование: семена пшеницы (*Triticum aestivum* L.), ячменя (*Hordeum vulgare* L.) и салата (*Lactuca sativa* L.); 3-дневные этиолированные проростки пшеницы (30–40 шт.); 10-дневные зеленые проростки ячменя (30–40 шт.); 3-дневные проростки салата (50–60 шт., семена салата проращивают 24 ч при 20–22 °С и постоянном освещении и еще 48 ч в термостате при 24 °С в темноте).

Коммерческие препараты – регуляторы роста растений 2,4–Д, кинетин, ГК₃; этанол, NaOH, агар, микроцентрифужные пробирки, пробирки 10–15 мл, штативы для пробирок, фильтровальная бумага (лист), чашки Петри, стаканы химические, ступки фарфоровые с пестиком, воронка стеклянная, мерные цилиндры, пинцеты, скальпели, ножницы, шпатели, пипетки, дозаторы, весы, плитка электрическая, спектрофотометр, хлорофилломер «Дуалекс».

Вводные замечания

Среди известных механизмов стимуляции роста растений различными регуляторными препаратами одним из наиболее действенных является экзогенное применение фитогормонов (ауксинов, цитокининов, гиббереллинов, абсцизовой кислоты, этилена и др.) или изменение их эндогенного содержания в растительном организме. Лучшие стимуляторы роста, представленные в Беларуси, часто содержат синтетические аналоги природных фитогормонов (рис. 1.4). Самые популярные препараты – «Корневин» (стимулятор корнеобразования и роста растений), «Атлет» (вызывает утолщение стебля, стимулирует рост корней), «Бутон» (стимулирует образование завязей и рост плодов), «Экопин» (стимулятор роста) и др.

Фитогормонподобное действие регуляторов роста можно определять с помощью целого ряда тестов, используя в качестве биообъектов проростки (в большинстве случаев злаковых культур), ткани и органы растений, лишенные способности синтезировать фитогормоны и требующие их экзогенного введения.

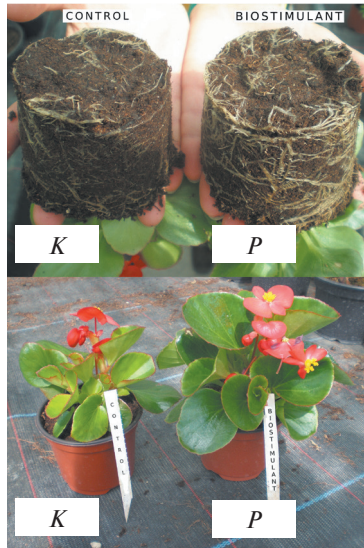


Рис. 1.4. Влияние препарата – стимулятора роста
(*K* – растения обработаны водой, *P* – регулятором роста)
(по Paradiković N. et al., 2019)

Например, ауксинподобное действие препаратов можно оценивать с помощью классического теста на отрезках coleoptилей пшеницы двумя способами. В первом отрезки coleoptилей проростков пшеницы обрабатывают регулятором роста рекомендуемой концентрации. В качестве отрицательного контроля используют дистиллированную воду, положительного – раствор ИУК. Во втором способе обрабатывают тестируемым препаратом или дистиллированной водой (контроль) семена пшеницы и проращивают. Отрезки coleoptилей проростков инкубируют определенное время в дистиллированной воде (в дополнительном контрольном варианте – в растворе ИУК) в темноте при 25 °С, после чего измеряют длину отрезков и оценивают прирост.

Рост отрезков может быть вызван ауксинподобной активностью препарата либо изменением под его влиянием эндогенного уровня ауксина в растении. Увеличение содержания ауксина в проростках при обработке регулятором роста должно приводить к разрыхлению клеточных стенок и активации роста клеток растяжением. Кроме того, снижение ригидности клеточных стенок может облегчать проникновение препарата в ткани.

Определение цитокининподобной активности проводят с использованием тканей и органов растений, лишенных способности синтезировать цитокинины. Часто используют в качестве тест-системы отрезки листьев проростков ячменя. При первом способе отрезки листьев проростков ячменя обрабатывают тестируемым препаратом. В отрицательном контроле — дистиллированной водой, в положительном — раствором цитокинина. При втором семена, обработанные тестируемым препаратом или водой (контроль), проращивают, отрезки листьев проростков помещают в дистиллированную воду и инкубируют на свету. В качестве контрольного варианта отрезки листьев необработанных растений помещают в раствор цитокинина. Затем из отрезков листьев экстрагируют хлорофилл и определяют его содержание.

Увеличение содержания хлорофилла может быть вызвано наличием цитокининов в составе препарата либо изменением под его влиянием эндогенного уровня цитокинина в растении. Цитокинины воздействуют на ультраструктуру хлоропластов. Многочисленные эксперименты показывают, что обработка, например, кинетином ускоряет дифференциацию пластид, образование в них мембран и формирование гран. Цитокинины также увеличивают содержание хлорофилла, ускоряя образование его предшественника — протохлорофиллида. Под влиянием цитокининов усиливается интенсивность фотофосфорилирования, возрастает активность АТФ-синтазы в хлоропластах, активируется синтез Рубиско (рибулозобисфосфаткарбоксилаза). В результате интенсивность фотосинтеза у обработанных цитокинином листьев возрастает, также отмечается задержка пожелтения листьев при старении. Эффекты проявляются как на изолированных листьях, так и на интактных растениях. Минимальная действующая концентрация цитокинина в этой группе тестов составляет 1–5 мг/л.

Вторая группа тестов основана на эффектах индукции цитокинином деления клеток в культуре изолированных стерильных тканей (каллуса) при добавлении в среду исследуемых препаратов (элюатов с хроматограмм) или кинетина в различных концентрациях. Чувствительность метода — от 1 до 100 мкг/л цитокинина.

В основе третьей группы тестов лежит способность цитокининов стимулировать рост растяжением клеток листа. Используются высечки из зеленых листьев редиса, фасоли, тыквы. После 3-дневной инкубации с цитокининсодержащим препаратом определяют диаметр и сырую массу высечек. Однако тесты этой группы требуют также одновременной проверки активности ауксина и гиббереллина.

Определение гиббереллинподобной активности можно провести с использованием проростков салата. Регуляторный препарат наносят на точку роста проростков. В качестве контроля используют дистиллированную воду и раствор ГК₃. Растения выращивают при постоянном освещении и комнатной температуре, измеряют длину гипокотилей.

Гиббереллин может влиять на длину стебля, стимулируя как деление клеток, так и их рост растяжением. При этом гиббереллин часто не влияет на рост корня, а в повышенных концентрациях в водной культуре даже может ухудшать состояние корневой системы. ГК активирует прорастание семян, рост плодов, используется для повышения урожайности бессемянных сортов винограда. Известно, что спящие почки и семена ряда видов выводятся из состояния покоя обработкой гиббереллином. Под влиянием гиббереллина растения длинного дня цветут в условиях короткого, а нуждающиеся в яровизации нормально цветут и плодоносят без нее.

Несмотря на то что биотесты разработаны достаточно давно, они не потеряли своей актуальности и сегодня широко применяются. Можно утверждать, что система биотестов является ключевым критерием для оценки гормональной активности различных препаратов и природных соединений. Биотесты используют и для первичного скрининга синтетических аналогов, и для подтверждения наличия фитогормонов в растительной ткани. Однако при проведении тестов важно учитывать также способность гормона проникать в клетки и скорость его инактивации. Поэтому для надежного скрининга лучше использовать одновременно несколько биотестов.

Таким образом, с помощью биотестов можно выявить ауксин-, цитокинин- и гиббереллинподобную активность, причем результат будет зависеть от способа проведения эксперимента. В итоге можно определить, какие из обнаруженных под влиянием препарата изменений гормонального статуса являются одним из механизмов стимуляции роста растений. Также вышеописанные биотесты можно использовать для оценки качества препаратов.

Использование разных биотестов позволяет получить данные о фитогормонподобной активности тестируемых регуляторных препаратов и оценить их качество. В данной работе требуется с помощью биотестов выявить ауксин-, цитокинин- и гиббереллинподобную активность препаратов и определить зависимость результата от способа проведения эксперимента.

Ход работы

1. Приготовление растворов регуляторов роста.

Для проведения биотестов необходимо:

а) приготовить маточные растворы 2,4–Д, кинетина и ГК₃ концентрацией 1 мг/мл. Для этого навески (2–5 мг) 2,4–Д и ГК₃ растворить в нескольких каплях 96%-го этанола, навеску (2–5 мг) кинетина растворить в нескольких каплях 1 М NaOH или 96%-го этанола;

б) приготовить водные рабочие растворы фитогормонов (10 мг/л) и тестируемых регуляторов роста растений рекомендуемой концентрации.

2. Оценка ауксинподобного действия препаратов.

Ауксинподобное действие препаратов оценивают, используя в качестве тест-системы отрезки coleoptiles 3-дневных этиолированных проростков пшеницы.

Отрезки coleoptiles (10 шт. по 10 мм) 3-дневных проростков, выращенных в воде, поместить в чашки Петри с регуляторным препаратом рекомендуемой концентрации. В качестве отрицательного контроля использовать дистиллированную воду, в качестве положительного – раствор 2,4–Д (10 мг/л). Чашки Петри выдержать 18 ч в темноте при 25 °С, после чего измерить длину отрезков.

Оценить прирост, используя статистическую обработку результатов (см. п. 6).

Заполнить табл. 1.3.

Таблица 1.3

Обработка coleoptiles	H ₂ O	2,4–Д	Препарат 1	Препарат 2	Препарат 3	Препарат 4
Длина coleoptiles, мм						

3. Оценка цитокининподобного действия тестируемых препаратов.

Цитокининподобное действие препаратов оценивают, используя в качестве тест-системы отрезки листьев 10-дневных зеленых проростков ячменя.

В чашки Петри на фильтровальную бумагу, смоченную достаточным количеством препарата рекомендуемой концентрации, разложить отрезки листьев (6 шт. по 20 мм). В отрицательном контроле бумагу смочить дистиллированной водой, в положительном – раствором кинетина (10 мг/л).

Чашки Петри с отрезками листьев плотно закрыть и поместить под люминесцентные лампы, круглосуточно освещать в течение недели.

Отрезки листьев из каждой чашки промокнуть фильтровальной бумагой и взвесить.

Определить содержание хлорофилла в отрезках листьев с использованием портативного хлорофилломера «Дуалекс» или спектрофотометрически после экстракции этанолом.

Для спектрофотометрического определения хлорофилла отрезки листьев каждого варианта растереть в охлажденной ступке в 96%-м этаноле до полного обесцвечивания растительного материала, отфильтровать и измерить объем экстракта. С помощью спектрофотометра установить величину поглощения (A) экстракта при 665 и 649 нм (в диапазоне 0–1 отн. ед.). Определить концентрацию хлорофилла (мг/л) по формуле

$$C_{a+b} = 6,1 \cdot A_{665} + 20,04 \cdot A_{649}.$$

Рассчитать содержание хлорофилла в отрезках листьев в каждом варианте, используя статистическую обработку результатов (см. п. 6).

Заполнить табл. 1.4.

Таблица 1.4

Обработка отрезков листьев	H ₂ O	Кинетин	Препарат 1	Препарат 2	Препарат 3	Препарат 4
Масса, г						
Объем экстракта, мл						
Концентрация хлорофилла, мг/л						
Содержание хлорофилла, мкг/г (мкг/см ²)						

4. Оценка гиббереллинподобного действия тестируемых препаратов.

Приготовить чашки Петри с твердой агаризованной средой (1,5 % агара).

Проростки салата длиной 6–8 мм поместить по 10 шт. в чашки Петри на твердую агаризованную среду корнями к центру и накрыть корни отрезками фильтровальной бумаги.

Регуляторный препарат нанести на точку роста проростков. В качестве контролей использовать дистиллированную воду и раствор ГК₃ (10 мг/л).

Чашки выдержать двое суток при постоянном освещении и комнатной температуре, затем измерить длину гипокотилей.

Оценить пророст, используя статистическую обработку результатов (см. п. 6).

Заполнить табл. 1.5.

Таблица 1.5

Обработка проростков	H ₂ O	ГК ₃	Препарат 1	Препарат 2	Препарат 3	Препарат 4
Длина проростков, мм						

5. Статистическая обработка результатов.

Статистическую обработку результатов провести с использованием программы Microsoft Office Excel.

Построить гистограммы с использованием программы Microsoft Office Excel.

Результаты в таблицах и на рисунках представить как средние значения и их стандартные отклонения.

6. Анализ полученных результатов.

Проанализировать выявленные изменения гормонального статуса растений и сделать вывод о механизме стимуляции препаратом роста растений и/или о качестве препарата.

Заполнить табл. 1.6, отметив значком «x» препараты, обладающие ауксин-, цитокинин- и/или гиббереллинподобной активностью.

Таблица 1.6

Вид активности	Препарат			
	1	2	3	4
Ауксинподобная активность				
Цитокининподобная активность				
Гиббереллинподобная активность				

Контрольные вопросы

1. Какие растительные объекты подходят для использования в биотестах на фитогормональную активность?
2. Какие классические тесты используют для оценивания ауксинподобного действия препаратов?
3. При определении цитокининподобной активности содержание каких веществ в образцах тканей и органов растений рекомендуется анализировать во время проведения эксперимента?
4. Каким образом проводится определение гиббереллинподобной активности тестируемых препаратов?

Лабораторная работа 3

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИТОКИНИНОВ В КОРНЕ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ГИПОТЕРМИИ И ОСВЕЩЕНИЯ РАЗЛИЧНОГО СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА

Цель работы: изучить содержание цитокининов в различных зонах роста корня в проростках гороха в оптимальных условиях роста, при действии низкой температуры (8 °С) и LED-освещения различного спектрального состава (обогащенного красным или синим светом).

Материалы и оборудование: 2-дневные проростки гороха (*Pisum sativum* L.) с суммарной длиной корня и гипокотыля 30–35 мм, выращенные при 22 °С и после экспозиции при низкой температуре (8 °С) в течение суток или светодиодного освещения различного спектрального состава (обогащенного красным или синим светом); этанол, поливинилпирролидон, NaOH, *n*-бутанол, ледяная уксусная кислота, зеатин, зеатинрибозид, меркаптоэтанол, центрифужные и микроцентрифужные пробирки, пластинки Silufol-254 UV (Kavalier, Чехия), хроматографическая камера для ТСХ, вентилятор «Ветерок», фарфоровые выпаривательные чашки, ступка с пестиком, центрифуга, холодильник.

Вводные замечания

Фитогормоны играют важнейшую роль в регуляции многих процессов, которые происходят в растениях на всех этапах онтогенеза. Поэтому вопросам изучения фитогормонов уделяется большое внимание исследователей.

Практически для всех фитогормонов характерна полифункциональность действия. Например, цитокинины стимулируют деление клеток, влияют на формирование ФСА, регулируют прорастание семян, задерживают старение, участвуют в регуляции транспорта метаболитов и симбиоза бобовых растений с клубеньковыми бактериями рода *Rhizobium*, индуцируют формирование побега в каллусной культуре и т. д. Многие аспекты регуляции на уровне клетки и целого растения с участием цитокининов достаточно хорошо изучены. Определены структура, этапы биосинтеза, способы действия. Структурная формула одного из известных природных цитокининов – зеатина – представлена на рис. 1.5.

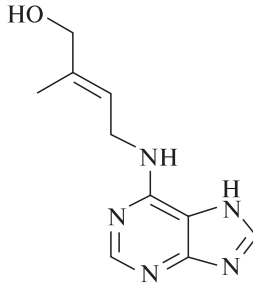


Рис. 1.5. Структурная формула зеатина

Но все же многие важные вопросы остаются открытыми. Например, известно, что действие цитокинина может проявляться как в месте синтеза, так и в других частях растения, когда фитогормон играет роль *long-distant signal* («сигнала, действующего на больших расстояниях»). Цитокинины функционируют в зоне деления корня и перемещаются вверх по ксилеме. Поэтому особый интерес представляют сигнальные функции цитокининов на уровне целого растения и изучение локализации и механизмов транспорта цитокининов в растении. Многие данные свидетельствуют о дальнем транспорте цитокининов по ксилеме и флоэме с участием ряда переносчиков. Однако в месте синтеза цитокининов – зоне меристемы корня – развитые сосуды ксилемы отсутствуют. И до сих пор не ясно, каким образом осуществляется транспорт цитокининов из кончика корня до места загрузки в ксилему: от клетки к клетке (по симпласту) или по межклетникам (апопласту). Таким образом, изучение локализации и накопления цитокининов в растении позволит определить, насколько эффективны в данных условиях механизмы транспорта цитокининов и их регуляторные функции.

Например, предполагается, что в результате изменения температурных режимов или воздействия LED-освещения с различным спектром в растении будет изменяться механизм синтеза и транспорта гормонов, что приведет к модификации механизма трансдукции экзогенных и эндогенных сигналов и повлияет на структуру корневой системы. К настоящему времени уже получены данные, указывающие на важную роль светового сигнала в формировании гормонального статуса корней. Следует также отметить, что изучение особенностей физиолого-биохимических процессов растений, культивируемых с ис-

пользованием LED-освещения, является в настоящее время одним из перспективных направлений фундаментальных и прикладных исследований.

Определение эндогенного состава и содержания цитокининов в растениях является сложным и трудоемким вследствие их низкого содержания и наличия других молекул с близкими физико-химическими свойствами. Этот процесс включает подготовку (фиксацию) растительного материала, экстракцию, очистку, фракционирование, идентификацию, определение активности с помощью биотестов (см. лабораторную работу 2) и количественную оценку содержания. Выбор способа и последовательности этапов выделения зависит от физико-химических свойств и стабильности молекулы изучаемого фитогормона, метода планируемого количественного определения и поставленных задач.

Цитокинины слабо растворимы в воде при низкой температуре (при нагревании растворимость в воде улучшается), хорошо растворимы в органических растворителях, в растворах щелочей и кислот. Поэтому экстракция цитокининов из свежего, замороженного в жидком азоте или лиофильно высушенного растительного материала достаточно эффективна с использованием органических растворителей (70–96%-й этанол, этилацетат, этиловый эфир, метанол, бутанол) при кислых и щелочных рН. Цитокинины устойчивы к нагреванию и автоклавированию, поэтому также можно применять фиксацию растительного материала горячим этиловым или метиловым спиртом.

Затем экстракты можно очистить на колонках с сефадексом, ионообменными материалами (катионитами или анионитами), активированным углем, переосаждением солями серебра или бария и другими способами.

Разделение проводят с помощью бумажной ТСХ, капиллярной ГХ или ВЭЖХ в различных системах растворителей (например, *n*-бутанол – уксусная кислота – вода или *n*-бутанол – NH_4OH – H_2O). Идентификацию цитокининов проводят по поглощению в УФ-диапазоне при 260–275 нм, с помощью ИК- и масс-спектрометрии. Количественное определение эндогенного содержания цитокининов затруднено из-за очень низкой их концентрации в тканях растений. Например, по утверждению некоторых исследователей, для получения 1 мг зеатина необходимо переработать 70 кг растительного материала. Часто после идентификации цитокининов с помощью хроматографии для определения их концентрации используют метод биотестов (см. лабораторную работу 2). Однако более точными и избиратель-

ными для количественного определения фитогормона и его метаболитов являются физико-химические методы анализа, в которых объединены хроматография высокой степени разрешения с детекцией, обеспечивающей селективность. Например, ВЭЖХ или ГХ в сочетании с МС: ГХ – МС и ВЭЖХ – МС. Тем не менее эти методы часто невозможно использовать при оперативном контроле за содержанием фитогормонов в динамике в большом количестве образцов. Кроме того, для этого требуется специальное дорогостоящее оборудование и инженерное обеспечение.

Альтернативой могут служить иммунохимические методы анализа фитогормонов, которые сочетают высокую избирательность и чувствительность (10–100 пг/мл), например, твердофазный конкурентный иммуноферментный анализ. Простота их использования позволяет одновременно анализировать несколько десятков образцов. Для проведения иммунохимического анализа не требуется большого количества растительного материала и сложной длительной очистки экстракта. Также нет необходимости в специальном дорогостоящем оборудовании.

Ход работы

1. Фиксация материала и экстракция цитокининов.

Все последующие процедуры важно проводить, защищая образцы от прямого воздействия света.

Корни проростков нарезать на отрезки длиной 5 мм, начиная от кончика корня. Отделить зону деления корня от зоны растяжения. Растительный материал (2–5 г) зафиксировать кратковременным кипячением в 80%-м этаноле, добавить в качестве антиокислителя меркаптоэтанол и гомогенизировать в 80%-м этаноле (при соотношении ткань : экстрагент 1 : 10). Затем экстрагировать цитокинины в течение 12–18 ч при 4 °С с добавлением поливинилпирролидона (10 % от массы растительного материала). Ускорить экстракцию можно встряхиванием пробирок.

После окончания экстракции гомогенат центрифугировать при 5500 g в течение 20 мин. Супернатант отделить и упарить в токе холодного воздуха до водного остатка, добавить 1 N NaOH до pH 8,0 и трижды экстрагировать водонасыщенным *n*-бутанолом. Пробирки каждый раз встряхивать в течение 1–2 мин. Разделение может проходить медленно, поэтому нужно обязательно дожидаться полного разделения фаз. Объединенную бутанольную фракцию отобрать, упарить досуха и растворить в минимальном объеме 96%-го этанола. В полученном экстракте может присутствовать комплекс различных форм цитоки-

нинов: зеатин, *цис*-зеатин, дигидрозеатин, изопентениладенин, их рибозиды, О- и N-глюкозиды.

2. Приготовление стандартного раствора зеатина и зеатинрибозида (1 мг/мл).

Навеску 1 мг растворить в 100 мкл 0,1 N KOH или NaOH, нагреть до полного растворения и довести до 1 мл 70%-го этанола. Хранить при необходимости при $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3. ТСХ цитокининов.

ТСХ цитокининов провести в системе *n*-бутанол : ледяная уксусная кислота : вода (4 : 1 : 1) на пластинках Silufol-254 UV. В качестве растворов сравнения использовать стандартные растворы зеатина и зеатинрибозида. Идентификацию зеатина и зеатинрибозида провести сравнением со стандартными препаратами зеатина и зеатинрибозида в УФ. В зависимости от площади пятна оценить содержание цитокининов в зоне деления и зоне растяжения корня у проростков гороха в оптимальных условиях роста, при действии низкой температуры ($8\text{ }^{\circ}\text{C}$) и LED-освещения различного спектрального состава (обогащенного красным или синим светом). Заполнить табл. 1.7.

Таблица 1.7

Вариант эксперимента Измеряемый параметр	Контроль	8 °С	LED-освещение с преобладанием красного света	LED-освещение с преобладанием синего света
Содержание цитокининов в зоне деления				
Содержание цитокининов в зоне растяжения				

4. Количественное определение цитокининов.

Зоны зеатина и зеатинрибозида на хроматограмме объединить, элюировать 70%-м этанолом и упарить досуха. Полученные пробы можно использовать для проведения биотестов (см. лабораторную работу 2) или проанализировать методом ВЭЖХ с УФ-детектором при длине волны 268 нм (колонка Silasorb SPH-5 C18, элюент – ацетонитрил : вода : уксусная кислота (55 : 44 : 1)). Идентификацию зеатина и зеатинрибозида провести сравнением со временем удерживания стандартных препаратов зеатина и зеатинрибозида.

5. Анализ полученных результатов.

Проанализировать полученные результаты и сделать вывод о механизме регуляции внешними факторами роста корневой системы растений.

Контрольные вопросы

1. Какие физиологические функции в растительных организмах регулируют цитокинины?
2. В чем заключаются особенности функционирования цитокининов в растениях?
3. Перечислите основные преимущества и недостатки методов, используемых при изучении содержания цитокининов.
4. Опишите и охарактеризуйте основные этапы выделения цитокининов из растительной ткани.

Лабораторная работа 4

АКТИВНОСТЬ АМИЛАЗЫ В ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЕНАХ И УЧАСТИЕ В ЭТОМ ПРОЦЕССЕ ГИББЕРЕЛЛИНА

Цель работы: изучить процессы расщепления экзогенного крахмала амилазой пророщенных семян гороха и ячменя.

Материалы и оборудование: проросшие семена гороха и ячменя (4-дневные), сухие семена гороха и ячменя; автоклав, весы, лезвие, колба стеклянная на 500 мл, шпатель, стерильные чашки Петри, стеклянная палочка для перемешивания, пинцет, скальпель, пипетка Пастера, фольга, фильтровальная бумага, агар-агар, крахмал, слабый раствор йода.

Вводные замечания

Гиббереллины представляют собой наиболее многочисленный класс фитогормонов дитерпеновой природы, участвующих в контроле важнейших физиологических процессов. У растений, грибов и бактерий насчитывается около 150 различных соединений, близких по строению и относимых к группе гиббереллинов.

Большинство гиббереллинов – кислоты, поэтому их принято обозначать ГК (гибберелловая кислота). Наиболее известной и часто используемой в экспериментах среди них является гибберелловая кислота с индексом 3 (ГК₃) (рис. 1.6). Индекс обозначает порядок открытия в историческом плане. Несмотря на многообразие данной группы веществ биологической активностью обладают лишь некоторые из них. Остальные являются предшественниками биосинтеза или представляют собой неактивные формы.

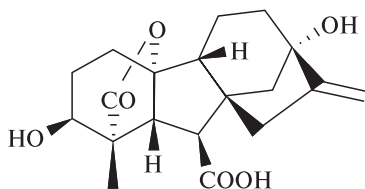


Рис. 1.6. Структурная формула гибберелловой кислоты (ГК₃)

У высших растений гиббереллины содержатся в незрелых и прорастающих семенах, плодах, проростках, меристематических тканях побегов, молодых растущих и развертывающихся семядолях и листьях, а также в апикальных зонах корней.

Гиббереллины регулируют важные физиологические процессы в растениях.

1. *Удлинение стебля.* Гиббереллины действуют на интеркалярные меристемы, стимулируя рост и удлинение стебля. Чем крупнее лист, тем больше гиббереллина в нем синтезируется и тем более мощный сигнал поступает в интеркалярную меристему. Таким образом, чем больше площадь листьев, тем длиннее междоузлия.

2. *Стимуляция развития бессеменных плодов.* Гиббереллины оказывают исключительно эффективное действие на бессемянные сорта винограда. При опрыскивании их соцветий раствором данного вещества в концентрации 10 мг/л наблюдается значительная стимуляция роста (в 1,5–2 раза) ягод, сопровождающаяся повышением их сахаристости.

3. *Индукция цветения.* Гиббереллин часто используют в декоративном садоводстве. В частности, после обработки соцветий данным веществом увеличивается число цветоносов и цветков, причем сами цветки становятся более крупными.

4. *Регуляция прорастания зерна.* Гиббереллины мобилизуют запасные питательные вещества при прорастании семян. Детально этот процесс изучен у злаков, поскольку имеет важное значение в производстве пива.

Качество пива зависит от качества солода – сладкой темной массы, получаемой при упаривании экстракта проростков ячменя. В свою очередь качество солода зависит от эффективности гидролиза крахмала в зерновках ячменя, а значит – от жизнеспособности зародышей и от синтеза ГК, которая стимулирует этот процесс. Чем ниже всхожесть семян, тем хуже солод.

Прорастание семян индуцируется при попадании их во влажные условия. Клетками зародыша выделяются гиббереллины, формируются сигнал для синтеза гидролитических ферментов – амилаз, которые расщепляют крахмал эндосперма с высвобождением мальтозы и глюкозы. В процессе набухания семян, при их прорастании активность гидролитических ферментов увеличивается. Содержание крахмала в семенах уменьшается, сахаров – увеличивается, они поступают в ткани зародыша, активируя его рост. Схематически процесс прорастания семян злаковых растений представлен на рис. 1.7. Качественный солод

можно также получить из плохо прорастающих семян, если обработать их раствором ГК, способствующей расщеплению крахмала в зерновках ячменя.

Нужно отметить, что ГК стимулирует прорастание не только у злаковых растений. Например, у подсолнечника и тыквы она ускоряет расщепление запасных жиров и их окисление до сахаров, а у бобовых мобилизует запасные белки. Если перед посадкой обработать ГК семена, клубни или луковицы, то можно добиться заметной стимуляции их прорастания.

1-й этап

При прорастании щиток выделяет ГК, которая диффундирует к алейроновому слою.

2-й этап

В алейроновом слое инициируется синтез амилаз — ферментов, расщепляющих крахмал.

3-й этап

Крахмал расщепляется до мальтозы и глюкозы, их поглощает щиток и передает тканям зародыша.

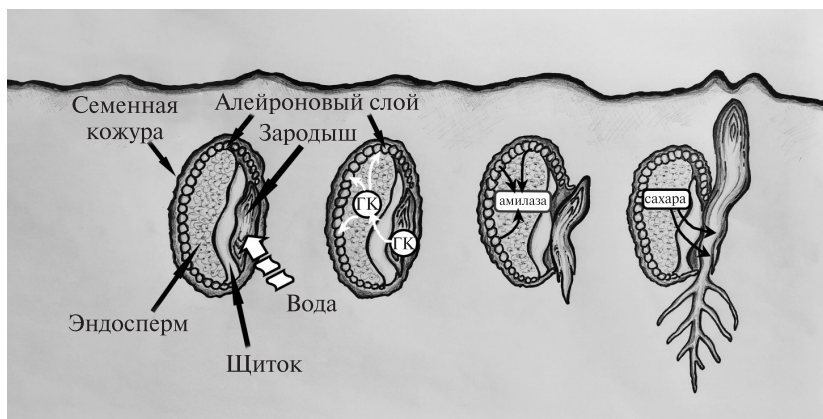


Рис. 1.7. Прорастание зерновки злака

Крахмал является запасным полисахаридом, состоящим из остатков глюкозы, и представляет собой смесь двух полимеров: амилозы (линейный полисахарид) и амилопектина (полимер с разветвленной цепью). Гидролиз этих веществ протекает по-разному. Амилоза сразу расщепляется до дисахарида мальтозы, а амилопектин — постепенно, через декстрины. Дальнейшее расщепление мальтозы до глюкозы происходит в результате действия уже другого фермента — мальтазы.

Ход работы

С целью обнаружения активности фермента амилазы используют проросшие семена гороха и ячменя. В качестве контроля – сухие семена.

Приготовить 250 мл стерильной агаризованной среды (0,8 %) с крахмалом (1 %). Для этого насыпать необходимые навески агар-агара и крахмала в стеклянную колбу на 500 мл, добавить дистиллированную воду, размешать стеклянной палочкой. Плотно закрыть горлышко колбы фольгой и отправить в автоклав. Полученную стерильную среду разлить в пять чашек Петри, дать застыть.

Далее необходимо в каждой чашке Петри разделить среду на две равные части, проведя скальпелем, как указано пунктирной линией на рис. 1.8. На одной части агаризованной среды вверху скальпелем вырезать квадрат, а на другой – треугольник (см. рис. 1.8). Полученные внутренние фигуры аккуратно достать и выбросить.

На левую сторону чашки Петри, помеченную квадратом, разложить с помощью пинцета в одну линию внутренней поверхностью вниз четыре семядоли сухих семян гороха (см. рис. 1.8). Семядоли следует укладывать очень аккуратно, слегка надавливая, стараясь не повредить среду. Рядом разложить семена ячменя.

Проросшие семена гороха разрезать на чистой фильтровальной бумаге скальпелем на две части и разложить в одну линию пинцетом поверхностью среза вниз на правую половину среды в чашку Петри, помеченную треугольником (см. рис. 1.8). Рядом с ними разложить разрезанные лезвием вдоль на две части проросшие семена ячменя.

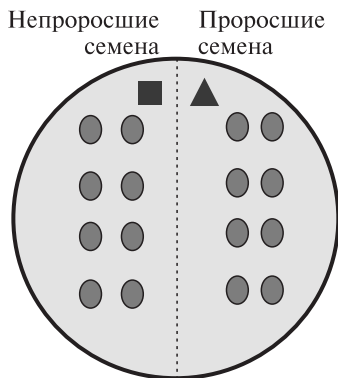


Рис. 1.8. Схема раскладки семян в чашке Петри на агаризованной среде

Закрывать чашки Петри крышками и оставить их инкубироваться в течение разного времени – 5, 10, 15, 20 и 25 мин. По истечении нужного времени семена аккуратно достать из чашек и осторожно налить на агаризованную среду в чашку Петри по 5 мл раствора йода с помощью пипетки Пастера. Обратить внимание на окрашивание агаризованной среды в местах, где лежали семена. Крахмал обнаруживается по реакции с йодом (наблюдается окрашивание в синий цвет).

Заполнить табл. 1.8, указав интенсивность окрашивания среды, обозначая, к примеру, слабо окрашенную среду одним знаком «+», а сильно окрашенную среду – несколькими знаками «++++».

Таблица 1.8

Объекты исследования		Время инкубации, мин				
		5	10	15	20	25
Непроросшие семена	Горох					
	Ячмень					
Проросшие семена	Горох					
	Ячмень					

На основании полученных данных сделать вывод об активности амилазы в семенах гороха и ячменя.

Контрольные вопросы

1. Какой фитогормон мобилизует запасные питательные вещества при прорастании семян?
2. Какой фермент участвовал в реакции гидролиза, которая протекала на границе соприкосновения агаризованной среды и поверхности среза семян?
3. Назовите основные конечные продукты ступенчатого гидролиза при данной ферментативной реакции.
4. Какие физиологические функции в растительных организмах регулируют гиббереллины?

Лабораторная работа 5

ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ НАНОЧАСТИЦ *IN VITRO* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КУЛЬТУР РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЕЙ

Цель работы: определение цитотоксичности наночастиц (фуллерена, фуллеренола, наночастиц селена и кремния) с использованием ТТХ и ДФ для проведения тестов на жизнеспособность клеток суспензионной культуры растений.

Материалы и оборудование: клетки гетеротрофной растительной суспензионной культуры на линейной фазе ростового цикла, фуллерен C_{60} , фуллеренол [$C_{60}(OH)_{24-26}$], уголь активированный, наночастицы селена и кремния, селенит натрия, монокремниевая кислота, культуральная среда (обычно среда Мурасиге и Скуга), ТТХ, ДФ, ацетон, NaCl, этанол, KH_2PO_4 , KOH, лед, стерильные центрифужные и микроцентрифужные пробирки, штативы для пробирок, стерильные стаканы химические, дозаторы, пипетки Пастера, спектрофотометр, флуоресцентный микроскоп или световой микроскоп, снабженный барьерными фильтрами ($\lambda_{возб} = 493$ нм, $\lambda_{фл} = 520$ нм).

Вводные замечания

Последние десятилетия характеризуются интенсивным развитием нанотехнологий и использованием наноматериалов в различных сферах народного хозяйства. К наноматериалам относят изолированные твердофазные объекты, имеющие отчетливо выраженную границу с окружающей средой, размеры которых по одному из измерений составляют от 1 до 100 нм. Например, фуллерены представляют собой сферические молекулы диаметром около 1 нм, содержащие 60 или более атомов углерода. Модель молекулы фуллерена C_{60} представлена на рис. 1.9. Одним из способов повышения растворимости фуллерена в воде является химическая модификация и получение полигидроксилированных форм (фуллеренолов), обладающих особыми физико-химическими свойствами и биологической активностью.

Существуют как естественные (пылевые бури, вулканическая пыль, лесные пожары), так и антропогенные (сжигание топлива и мусора, сварка, промышленное производство) источники поступления наноматериалов в окружающую среду. Часть из них попадает в почву и водную среду, а часть находится в атмосфере.



Рис. 1.9. Модель молекулы фуллерена C_{60}

Повышенный интерес исследователей к нанобъектам вызван их необычными физическими и химическими свойствами, особенностями биологического действия, которые часто радикально отличаются от свойств этого же вещества в форме сплошных фаз или макроскопических дисперсий.

Небольшой размер наночастиц позволяет им накапливаться в тканях и клетках, возможно, встраиваться в ДНК или белки и тем самым изменять их функции. С другой стороны, уникальные свойства наноматериалов могут являться причиной оказания самых разных эффектов на живые системы, в частности на растения. Большая удельная поверхность наноматериалов повышает химический потенциал на межфазных границах и приводит к аномальному увеличению сорбционной и реакционной способностей, благодаря чему наноматериалы, например, могут адсорбировать значительное количество поллютантов и транспортировать их внутрь клетки.

Растения способны в больших количествах накапливать наноматериалы, что определяет транслокацию последних по цепи питания и в конечном итоге поступление в организм человека. С другой стороны, нанотехнологии могут быть направлены на повышение урожайности, создание индукторов стрессоустойчивости сельскохозяйственных растений к неблагоприятным факторам окружающей среды и т. д. Сегодня разрабатываются коммерческие нанопрепараты, которые предлагаются потребителю для применения в растениеводстве в качестве регуляторных, стимулирующих рост и защитных. Поэтому установление механизмов изменения наночастицами физиолого-биохимических процессов в растительной клетке необходимо для понима-

ния общей картины поведения наноструктур в биологических системах и является важным этапом разработки регуляторных и защитных препаратов на их основе. Для успешного коммерческого использования комплексов на основе наночастиц требуется прежде всего оценка цитотоксичности, или влияния на жизнеспособность клеток.

Состояние жизнеспособности чаще всего определяется интенсивностью роста изучаемых тканей (клеточных культур): увеличения свежего или сухого веса, количества или размера клеток. Однако рост может быть ошибочной мерой жизнеспособности клеток. Например, низкие температуры или ингибиторы метаболизма могут остановить рост, но не убить ткань. При измерении ростовых параметров также трудно установить долю живых клеток. Поэтому измерения роста лучше всего сочетать с другими тестами, которые определяют какой-либо параметр метаболической активности: циклоз, целостность мембраны (утечка электролита, плазмолиз), биохимическая активность (синтез белка, ДНК и РНК, содержание АТФ и др.). Основными преимуществами этих тестов являются скорость и точность результатов, а также гуманность метода определения токсичности по сравнению с опытами, проводимыми на животных.

Большинство вышеперечисленных тестов были изначально разработаны с использованием тканей животных, поэтому их применение к культурам растений, имеющих ряд структурных и биохимических особенностей, требует некоторых переработок, хотя, например, большинство тестов, которые анализируют метаболическую активность, подходят и для любого типа культуры растительных тканей. С другой стороны, для разработки тестов на жизнеспособность может учитываться множество специфических для растений жизненно важных функций. В любом случае важно понимать, что все доступные сегодня методы оценки жизнеспособности клеток имеют определенные ограничения, поэтому в экспериментальной работе следует:

- 1) использовать несколько тестов на жизнеспособность;
- 2) устанавливать достоверность теста для каждой изучаемой системы культивирования, например, путем сравнения результатов анализа от образцов с растущей активностью с образцами, убитыми путем замораживания и оттаивания;
- 3) учитывать при выборе теста, что после стрессового воздействия может пройти некоторое время, возможно, от минут до дней, прежде чем произойдет трансформация жизненно важных клеточных функций.

Рассмотрим два широко используемых метода оценки жизнеспособности: ДФом и ТТХ. Эти методы позволяют задействовать в ка-

честве тест-системы растительные клетки и в короткие сроки с минимальными затратами без участия живых организмов определить цитотоксичность препаратов.

Использование ТТХ основано на способности живых клеток превращать бесцветные растворы солей тетразолия в нерастворимые пурпурные кристаллы формазана под действием дегидрогеназы митохондриальной цепи переноса электронов. Поскольку такая реакция требует митохондриальной активности, факторы, которые замедляют или ингибируют митохондриальную активность (например, низкие температуры), также будут влиять на интенсивность образования формазана. Следовательно, анализ должен проводиться в оптимальных условиях роста.

Для количественного определения красный осадок может быть извлечен из ткани с помощью этанола, и оптическая плотность экстракта тогда устанавливается спектрофотометрически. Чтобы избежать поглощения другими соединениями, используют определение оптической плотности при 485 нм, исходя из предположения, что в растительных культурах нет соединений, которые могли бы заметно поглощать свет на этой длине волны. В качестве контроля может быть проведена проверка поглощения экстракта необработанной культивируемой ткани 95%-м этанолом, чтобы выявить фоновое поглощение.

При определении жизнеспособности с помощью ДФ неполярная нефлуоресцирующая молекула зонда попадает в растительные клетки, где ацетатные фрагменты отщепляются эстеразой. Образующийся в результате флуоресцеин остается в клетке, поскольку не может проникнуть через плазматическую мембрану. Мертвые клетки имеют низкую активность эстеразы и/или проницаемые поврежденные мембраны, поэтому внутриклеточная флуоресценция наблюдаться не будет. Максимум поглощения света флуоресцеином — 450–500 нм при биологических значениях рН, а максимум флуоресценции — 520 нм. Таким образом, свечение флуоресцеина можно наблюдать с помощью флуоресцентного микроскопа, снабженного соответствующими фильтрами. При этом живые клетки будут флуоресцировать, а мертвые — нет.

Исследование с помощью ТТХ достаточно длительное и может проводиться в качестве общего анализа жизнеспособности для популяции клеток. Метод с использованием ДФ является быстрым, и краситель может визуализироваться в отдельных клетках под микроскопом. Следовательно, такой подход может применяться не только для общего анализа жизнеспособности, но и для определения количества живых клеток в популяции.

Подходящими контролями для анализа с помощью ТТХ и ДФ могут быть убитые кипячением или замороженные/оттаявшие ткани и активно растущие ткани.

Ход работы

1. Подготовительный этап.

Отобрать после тщательного перемешивания в пробирку 5 мл клеточной суспензии, отфильтровать через предварительно взвешенный бумажный фильтр, высушить при 80 °С и взвесить. Рассчитать плотность клеточной суспензии (мг сух. массы / мл). Разбавить исходную суспензию культуральной средой Мурасиге и Скуга до концентрации 5 мг/мл и использовать для анализа.

Отобрать после тщательного перемешивания в пробирку 5–10 мл полученной клеточной суспензии и заморозить в смеси лед/NaCl (в дальнейшем брать размороженные клетки в качестве контрольного образца).

Приготовить калий-фосфатный буфер 0,05 М, рН 7,5.

Приготовить на среде Мурасиге и Скуга тестируемый препарат необходимой концентрации (2, 10, 20, 40, 100 мкл/мл) (фуллерен C₆₀, фуллеренол [C₆₀(ОН)₂₄₋₂₆], уголь активированный, наночастицы селена и кремния, селенит натрия, монокремниевая кислота).

В микроцентрифужную пробирку добавить 200 мкл тестируемого препарата или культуральной среды (контроль) и 200 мкл клеточной суспензии и инкубировать при 25 °С в течение 24–96 ч.

2. Окрашивание раствором ДФ.

Развести 0,5 мл исходного раствора ДФ в 24,5 мл культуральной среды (до конечной концентрации 0,01 %).

На предметном стекле смешать 50 мкл клеточной суспензии и 50 мкл раствора ДФ.

Через 15 мин поместить препарат на предметный столик флуоресцентного микроскопа и посчитать на определенной площади флуоресцирующие клетки как жизнеспособные, а нефлуоресцирующие клетки – как мертвые при $\lambda_{\text{возб}} = 493 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{фл}} = 520 \text{ нм}$.

Рассчитать процент ингибирования и определить полуингибирующую концентрацию (IC₅₀ – гибель или подавление метаболизма 50 % клеток) и максимальную недействующую концентрацию (максимальная концентрация вещества, при которой токсические эффекты на клетки не выявлены).

Заполнить табл. 1.9 и сравнить действие препарата в наноформе и в форме соли.

3. Окрашивание ТТХ.

Приготовить раствор ТТХ (0,4 г ТТХ / 100 мл 0,05 М калий-фосфатного буфера). Раствор следует хранить замороженным или при температуре 4 °С в темноте, не допуская появления окраски раствора.

Удалить среду инкубации из микроцентрифужной пробирки с клетками и добавить 1 мл раствора ТТХ в калий-фосфатном буфере.

Оставить смесь при 28 °С на 24–96 ч в темноте до появления формазана.

Центрифугировать пробирки при 100 об/мин в течение 2 мин, после чего полностью удалить супернатант с помощью пипетки Пастера.

Добавить к окрашенному осадку 1 мл 96%-го этанола, встряхнуть и нагреть до 60 °С для полной экстракции формазана. Каждый экстракт для анализа должен быть доведен до определенного конечного объема, поскольку 96%-й этанол будет частично испаряться.

Определить оптическую плотность поглощения отобранного супернатанта (известного объема) спектрофотометрически при 485 нм.

Рассчитать процент ингибирования. Отрицательное значение процента ингибирования будет говорить о стимулирующем действии (клетки активнее делятся). Определить полуингибирующую концентрацию и максимальную недеиствующую концентрацию.

Заполнить табл. 1.9 и сравнить действие препарата в наноформе и в форме соли.

Таблица 1.9

ПРЕПАРАТ «.....»

Объем добавленного препарата (мкл/мл)	0	1	10	20	40	100	Контр. образец
Концентрация препарата в культуральной среде (мкг/мл)							
Количество флуоресцирующих клеток							
Количество нефлуоресцирующих клеток							
% ингибирования (гибель клеток)							

Полуингибирующая концентрация =

Максимальная недеиствующая концентрация =

Контрольные вопросы

1. Дайте определение наноматериалам.
2. Какие вы знаете способы определения жизнеспособности растительных клеток?
3. Перечислите основные этапы определения жизнеспособности клеток с использованием ТТХ.
4. Перечислите основные этапы определения жизнеспособности клеток с использованием ДФ.
5. В чем преимущества и недостатки методов определения жизнеспособности клеток?

Лабораторная работа 6

УЧАСТИЕ ВТОРИЧНЫХ МЕДИАТОРОВ В СВЕТОЗАВИСИМЫХ РЕАКЦИЯХ РАСТЕНИЙ

Цель работы: оценить вклад систем NO и цГМФ в процессы биосинтеза хлорофилла и формирования ФСА при деэтиоляции проростков ячменя.

Материалы и оборудование: этиолированные 5-дневные проростки ячменя, сахара, этанол, ацетон, SNP, сРТИО, L-NNA, ферроцианид натрия, NaNO_2 и NaNO_3 , 8-Br-цГМФ, LY83583, мел, кварцевый песок, NaCl, *трис*-(оксиметил)-аминометан, HCl, KOH, 1%-й раствор диурона, ножницы, чашки Петри, ступки фарфоровые, пинцеты, капроновая ткань, центрифужные и микроцентрифужные пробирки, штативы для пробирок, мерные цилиндры, мерные колбы, дозаторы, весы, центрифуга, спектрофотометр, спектрофлуориметр Varian Cary Eclipse.

Вводные замечания

Растения воспринимают свет как источник энергии для фотосинтеза и как источник информации об окружающей среде – фактор оптимизации фотосинтетических реакций и регуляции роста и развития. Многие физиологические процессы, например прорастание семян, ингибирование удлинения гипокотыля, дифференцировка хлоропластов, биосинтез хлорофилла и экспрессия ряда ядерных и хлоропластных генов, контролируются светом с помощью трех ключевых фоторецепторных систем – фитохромов, криптохромов и фототропинов. Регуляция физиологических процессов фоторецепторами связана с активацией путей сигнальной трансдукции с участием низкомолекулярных вторичных медиаторов, в числе которых ионы кальция, ИФ₃, ДАГ, цАМФ, цГМФ, NO. При изучении фитохромзависимых процессов было установлено, что по крайней мере три из них – прорастание семян, деэтиоляция и ингибирование удлинения гипокотыля – происходят с участием NO и цГМФ.

NO стимулирует деэтиоляцию и синтез хлорофилла в картофеле, салате и арабидопсе, увеличивает содержание хлорофилла в листьях гороха и замедляет деградацию фотосинтетических пигментов в листьях картофеля, зараженных фитотфторой. NO является высокореактивным радикалом и действует как сигнальная молекула в механизмах защиты растений от биотических и абиотических стрессов или как

медиатор действия фитогормонов, контролирующих рост и развитие. В этих процессах NO может участвовать независимо или во взаимодействии с другими вторичными медиаторами.

Многими исследователями было продемонстрировано присутствие NO в растениях и его участие в регуляторных процессах. У животных была идентифицирована NOS, генерирующая NO. NOS-подобная активность была обнаружена и у растений. Было также установлено, что ингибиторы NOS млекопитающих ингибируют образование NO в растительной клетке. При этом образование NO в растениях может происходить также с участием нитратредуктазы. Были получены доказательства присутствия чувствительной к NO гуанилатциклазы в растениях, а некоторые исследователи предположили существование общего пути сигнальной трансдукции для NO и цГМФ.

В этиолированных растениях пропластиды развивающегося листа дифференцируются в этиопласты. На этой стадии развития происходит ряд изменений, таких как увеличение числа пластид в клетке, объема пластид и увеличение экспрессии большинства ядерных и пластидных генов. Однако кодируемые ядром хлорофилл-*a/b*-связывающие белки светособирающих антенных комплексов и другие белки, кодируемые пластидным геномом, не накапливаются, а этиопласты не синтезируют хлорофилл. Хлорофилл образуется только при освещении одновременно с накоплением хлорофиллсвязывающих апопротеинов, ключевых белков фотосистем (D1 и CP43) и сборкой основных элементов ФСА.

Обработка этиолированных растений донором NO (SNP) приводит к увеличению содержания хлорофилла и биосинтезу белков тилакоидной мембраны. При этом обработка нейтрализатором NO (сРТИО) или ингибитором NOS (L-NNA) замедляет зеленение этиолированных проростков. Эти эксперименты показывают, что NO как эндогенная сигнальная молекула участвует в опосредованном светом зеленении проростков, а экзогенный NO ускоряет этот процесс. Схожие эффекты воздействия проникающего через мембрану аналога циклического гуанозинмонофосфата (8-Br-цГМФ) показали, что и цГМФ принимает участие в сигнальном каскаде в процессах деэтиоляции.

Ход работы

1. Анализ воздействия NO и цГМФ на биосинтез фотосинтетических пигментов при деэтиоляции.

Пятидневные, выращенные в темноте проростки срезать на 1 см выше семян в дистиллированной воде, поместить в чашки Петри,

содержащие дистиллированную воду или 100 мМ SNP (донор NO), сРТЮ (нейтрализатора NO) или L-NNA (ингибитор NOS), 8-Br-цГМФ (проникающий через мембрану аналог цГМФ), LY83583 (ингибитор гуанилатциклазы). В качестве дополнительных контролей можно использовать 100 мкМ ферроцианида натрия и смесь, содержащую 100 мМ NaNO₂ и 100 мМ NaNO₃. Все процедуры выполнять, когда это возможно, в полной темноте или избегая яркого освещения, чтобы избежать ускоренного фотоконвертирования протохлорофиллида в хлорофилл.

Для обеспечения надлежащего поглощения химических веществ можно использовать вакуумную инфльтрацию в течение 60 мин в темноте.

После вакуумной инфльтрации и инкубации в темноте образцы осветить (150–200 мкмоль · м⁻² · с⁻¹ в течение 0, 6, 12, 24 и 36 ч).

Определить содержание фотосинтетических пигментов в проростках. Для этого образцы промокнуть фильтровальной бумагой, взвесить и растереть в охлажденной ступке в ацетоне до полного обесцвечивания растительного материала. Экстракт отфильтровать и измерить его объем. С помощью спектрофотометра установить величину поглощения (A) экстракта при 662, 645 и 470 нм (в диапазоне 0–1 отн. ед.). Определить концентрацию пигментов (мг/л) и рассчитать содержание пигментов (мг/г) по формулам

$$C_a = 611,24 \cdot A_{662} - 2,04 \cdot A_{645},$$

$$C_b = 20,13 \cdot A_{645} - 4,19 \cdot A_{662},$$

$$C_{\text{каротиноидов}} = \frac{(1000 \cdot A_{470} - 1,90 \cdot C_a - 63,14 \cdot C_b)}{100}.$$

Заполнить табл. 1.10.

Таблица 1.10

Условия инкубации	Xл _a , мг/г	Xл _b , мг/г	Xл _{a+b} , мг/г	Каротиноиды, мг/г
SNP				
сРТЮ				
L-NNA				
Ферроцианид натрия				
NaNO ₂ и NaNO ₃				

Условия инкубации	Хл _a , мг/г	Хл _b , мг/г	Хл _{a+b} , мг/г	Каротиноиды, мг/г
8-Вг-цГМФ				
LY83583				

2. Анализ воздействия NO и цГМФ на параметры флуоресценции хлоропластов.

Перед началом работы обязательно включить центрифугу в режиме охлаждения! Все растворы, посуду и принадлежности, необходимые для приготовления суспензии, охладить в морозильной камере в течение 30 мин при -10°C и хранить в холодильнике при $+10^{\circ}\text{C}$.

Приготовить 50 мл среды выделения, содержащей 0,4 М сахарозу, 0,01 М NaCl, 0,07 М фосфатный или *трис*-буфер (pH 7,9–8,0).

Навеску листьев (2–5 г) каждого образца (см. п. 1) охладить в течение 20 мин в полиэтиленовом пакете в холодильнике. Растительный материал измельчить ножницами и гомогенизировать в фарфоровой ступке, замороженной в лед, в течение 1–2 мин в среде выделения при соотношении ткань : среда, равном 1 : 5. Растертый материал отжать пинцетом через два слоя капроновой ткани. Полученный фильтрат центрифугировать при 100 g, 4°C в течение 5 мин. Супернатант центрифугировать 15 мин при 1000 g, после чего осадок, содержащий хлоропласты, промыть средой выделения и снова центрифугировать при 2500 об/мин. Осадок ресуспендировать в среде выделения, объем суспензии хлоропластов довести до 10 мл.

Оценить концентрацию хлорофилла в суспензии хлоропластов. Для спектрофотометрического определения аликвоту суспензии хлоропластов каждого варианта растереть в охлажденной ступке в 96%-м этаноле до полного обесцвечивания растительного материала, отфильтровать и измерить объем экстракта. С помощью спектрофотометра установить величину поглощения (A) экстракта при 665 и 649 нм (в диапазоне 0–1 отн. ед.). Определить концентрацию хлорофилла (мг/л) по формуле

$$C_{a+b} = 6,1 \cdot A_{665} + 20,04 \cdot A_{649}.$$

Рассчитать содержание хлорофилла в суспензии хлоропластов в каждом варианте.

Хранить полученную суспензию хлоропластов следует при температуре от 0 до $+5^{\circ}\text{C}$. Для обработки ФАВами и определения интенсив-

ности флуоресценции использовать суспензии хлоропластов с равной концентрацией хлорофилла.

Разделить суспензии хлоропластов каждого варианта (с одинаковой концентрацией хлорофилла) на две равные части. К одной добавить раствор диурона (10 мкл / 1 мл суспензии) и инкубировать в течение 1 ч.

Суспензию хлоропластов (100 мкл), полученную из растений различных вариантов образцов (см. п. 1), обработанных и необработанных диуроном, поместить в лунки тест-планшета для измерения интенсивности флуоресценции. Выдержать в темноте в течение 5 мин, затем провести измерение и анализ спектров флуоресценции при длине волны возбуждения 550 нм.

Записать и проанализировать форму спектра флуоресценции хлорофилла различных образцов.

Оценить величины и отношение длинноволновой и коротковолновой интенсивности флуоресценции (F_{740} и F_{685}) с использованием статистической обработки результатов (см. п. 3).

Найти величину параметра $\omega = F_{740}/F_{685}$.

Определить интенсивность флуоресценции, соответствующей максимуму спектра флуоресценции (F_0 , F_d), рассчитать параметр F_v с использованием статистической обработки результатов (см. п. 3).

Заполнить табл. 1.11. Построить гистограммы.

Таблица 1.11

Условия инкубации	F_{740}	F_{685}	$\omega = F_{740}/F_{685}$	F_0	F_d	$F_v = F_d - F_0$	F_v / F_d
SNP							
cPTIO							
L-NNA							
Ферроцианид натрия							
NaNO ₂ и NaNO ₃							
8-Br-цГМФ							
LY83583							

3. Статистическая обработка результатов.

Статистическую обработку результатов провести с использованием программы Microsoft Office Excel. Результаты в табл. 1.10, 1.11 и на гистограммах представить как средние значения и их стандартные отклонения.

4. Анализ полученных результатов.

Проанализировать полученные результаты и оценить вклад систем NO и цГМФ в процессы биосинтеза хлорофилла и формирования ФСА при деэтиоляции проростков ячменя.

Контрольные вопросы

1. Перечислите известные вторичные медиаторы растений.
2. Как происходит процесс формирования ФСА при деэтиоляции?
3. Какие основные параметры были использованы в работе для оценки участия систем вторичных медиаторов в процессе формирования ФСА при деэтиоляции?

Лабораторная работа 7

УЧАСТИЕ H_2O_2 И ИОНОВ КАЛЬЦИЯ В ТРАНСДУКЦИИ ГРАВИТАЦИОННОГО СТИМУЛА

Цель работы: исследовать Ca^{2+} -зависимую флуоресценцию и особенности структуры корня проростков в условиях изменения действия силы тяжести.

Материалы и оборудование: проростки *Arabidopsis thaliana* (экотип Col-0), центрифужные и микроцентрифужные пробирки, штативы для пробирок, пинцет, мерные цилиндры, химические стаканы, колбы, дозаторы, вата, фильтровальная бумага, H_2O_2 , CaCl_2 , диметилсульфоксид (ДМСО), НЕРЕС, NaOH, Ca^{2+} -чувствительный индикатор (флуоресцентный индикатор Fluo-8 AM), Pluronic F-127, клиностаг, весы лабораторные, центрифуга, флуоресцентный микроскоп.

Вводные замечания

В гравитационном поле Земли сила тяжести создает ускорение (g), равное $9,81 \text{ м/с}^2$. Физический смысл понятия веса тела $P = mg$, где m – масса, а g – ускорение силы тяжести. Состояние механического напряжения, которое испытывает растение в гравитационном поле, является результатом двух противоположно направленных процессов, протекающих одновременно: пространственной неупорядоченности внутриклеточных элементов и стремлением их к седиментации (осаждению) под действием силы тяжести.

Как растение чувствует изменение величины и направления вектора силы тяжести? Каким же образом и с помощью каких механизмов клетка воспринимает сигнал об изменении напряженности гравитационного поля и трансформирует (передает) этот сигнал? Ответы на поставленные вопросы были получены на основании анализа результатов многочисленных экспериментов, выполненных в условиях реального космического полета и при моделировании эффектов измененной силы тяжести в лабораторных условиях на Земле с помощью клиностага и центрифуги.

Клиностаг – это установка, используемая в лабораторных условиях для имитации изменений силы тяжести. Эффект достигается в результате вращения горизонтально расположенных растений вокруг своей продольной оси (рис. 1.10).

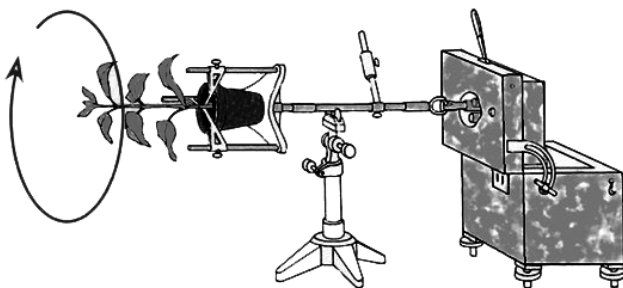


Рис. 1.10. Схема устройства клиноста

Гравитропизм является одним из наиболее важных тропических движений во время роста и развития растений. Растения ощущают гравитацию и направляют рост новых тканей относительно вектора гравитации. Согласно теории Холодного – Вента механизм, который может направлять рост корня растения вниз, включает асимметричное накопление ауксина на противоположных сторонах зоны растяжения, которое приводит к гравиизгибу, дифференциальному росту и искривлению кончика корня.

Ауксин (в основном в форме ИУК) участвует практически во всех этапах роста и развития растений. После синтеза ИУК транспортируется в определенные ткани с помощью PIN-белков, где индуцирует сигнальный каскад и вызывает соответствующие ростовые реакции растений. Полярность локализации субклеточных PIN очень важна для направленного транспорта ауксина и гравитропного роста корней.

Лучше всего влияние гравитации изучено на корнях (как на модельной системе). По современным данным, значительную роль в восприятии силы тяжести играет распределение органелл в клетках корня и состояние цитоскелета. Крупные крахмальные зерна – статолиты, содержащиеся в клетках корневого чехлика – статоцитах, по своим размерам и массе существенно превышают остальные внутриклеточные структуры. При изменении положения клетки в пространстве в момент получения гравитационного стимула статолиты осаждаются под действием силы тяжести (рис. 1.11).

В результате механического взаимодействия статолитов с клеточными мембранами (ЭПР, плазмалемма, тонопласт) изменяются процессы мембранного транспорта. Предполагают, что общим для всех типов клеток в реакции гравитропизма (в случае с многоклеточными)

или гравитаксиса (в случае с одноклеточными) является участие в этом процессе механорецепторов – механочувствительных ионных каналов. Наиболее ранний процесс в гравитропической реакции – поперечная электрическая поляризация осевых органов, которая является результатом изменения мембранных потенциалов клеток, оказавшихся на верхней или нижней стороне гравитимулированного органа. Первичным посредником между гравитропическим стимулом и сдвигами мембранного потенциала статоцитов, вероятнее всего, становятся полярные потоки ионов Ca^{2+} через потенциалчувствительные и/или механочувствительные Ca^{2+} -каналы. Сильная деполяризация статоцитов, оказавшихся при гравитимуляции на нижней стороне корня, может быть пусковым механизмом, способствующим открытию Ca^{2+} -каналов и поступлению Ca^{2+} в цитоплазму. Затем вследствие запуска систем активного транспорта Ca^{2+} выводится из цитоплазмы.

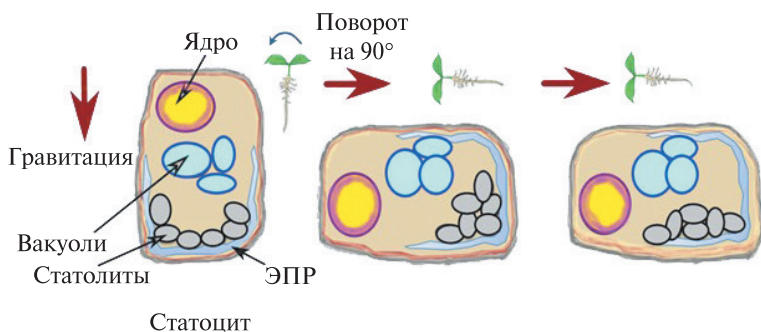


Рис. 1.11. Осаждение статолитов в статоцитах при изменении положения клеток в пространстве

Таким образом, латеральные потоки ионов Ca^{2+} , в формировании которых принимают участие системы активного и пассивного мембранного транспорта кальция, являются одним из наиболее ранних ответов на действие силы тяжести и ее изменений. Исследования показали, что обработка хелатором кальция EGTA кончиков корней кукурузы вызывает потерю гравитропической чувствительности, а асимметричное внесение хлорида кальция вблизи кончиков корней вызывает искривление корня в сторону более высокой концентрации кальция. Таким образом, временное и пространственное перераспределение Ca^{2+} в корне может влиять на развитие гравитропного изгиба.

Многочисленные данные свидетельствуют о том, что и другие вторичные медиаторы процессов сигнальной трансдукции вовлечены в гравитропические эффекты.

Перекись водорода (H_2O_2) является самой стабильной из АФК. H_2O_2 образуется с участием различных ферментативных процессов и ее можно рассматривать как фактор роста, который регулирует процессы роста и развития растений, включая деление и дифференциацию клеток. С другой стороны, H_2O_2 вызывает окислительное повреждение и даже гибель клеток, если растение подвергается различным биотическим и абиотическим стрессам, что, хоть и кажется разрушительным, играет важную биологическую роль. Ее также можно рассматривать как сигнальную молекулу. Например, H_2O_2 действует как сигнальная молекула при регулируемом ауксином гравитропизме корней. Многими учеными показано, что экзогенная обработка H_2O_2 может влиять на первичный гравитропизм корней и вызывать изгибание корня. Хотя подробности механизма действия H_2O_2 остаются неизвестными, есть предположение, что H_2O_2 может регулировать изгибание корней путем корректировки концентрации и распределения внутриклеточных Ca^{2+} и ИУК.

Ход работы

1. Изучение влияния H_2O_2 на структуру корня проростков, выращенных при клиностаировании и в контрольных условиях.

Параметры структуры корня (длину меристемы (Lm) и диаметр корня в зоне латерального корневого чехлика (D), рис. 1.12) определить у проростков, выращенных в присутствии 4 мМ H_2O_2 и без, при клиностаировании и контрольных, с помощью микроскопа (объектив 10×) и обработки изображений в программе Image J. Результаты записать в табл. 1.12.

Таблица 1.12

Вариант эксперимента \ Параметр	Контроль	Клиностат	Контроль + 4 мМ H_2O_2	Клиностат + 4 мМ H_2O_2
Lm				
D				

Описать структуру корня в каждом варианте эксперимента и сделать вывод о влиянии H_2O_2 и клиностаирования на структуру и гравитропизм корня.

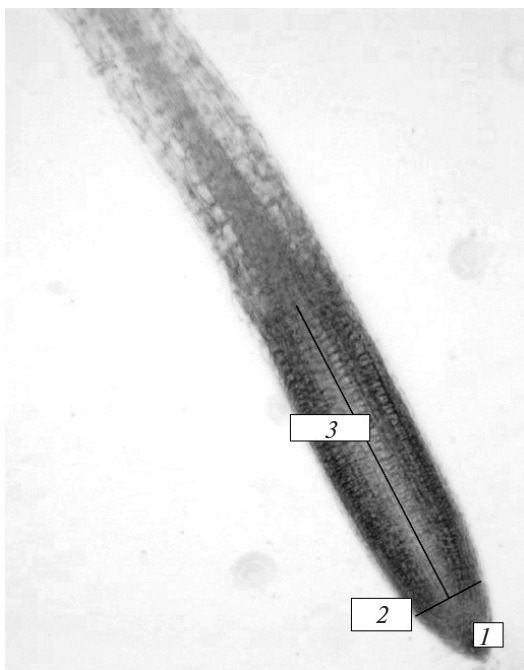


Рис. 1.12. Параметры структуры главного корня проростка *Arabidopsis thaliana* (1 – корневой чехлик, 2 – диаметр корня в зоне латерального корневого чехлика (D), 3 – длина меристемы (Lm)), определяемые с использованием инвертированного микроскопа KERN BDS-400 (увеличение 10 \times)

И с т о ч н и к: фото предоставлено научным сотрудником Института экспериментальной ботаники НАН Беларуси Т. Н. Куделиной

2. Обнаружение внутриклеточных свободных ионов кальция в корне.

Приготовить буферный раствор А, содержащий 20 мМ HEPES-NaOH (pH 7,5).

К раствору А добавить 25 % Pluronic F-127 (из расчета 5 мкл 25 % Pluronic F-127 на 1 мл раствора А) и Fluo-8 АМ (конечная концентрация 10 мкМ) для получения раствора Б.

Инкубировать проростки в растворе А (контроль) и в растворе с флуоресцентным зондом (Б) в течение 90 мин при температуре 37 °С.

Проростки трижды промыть дистиллированной водой и сравнить флуоресцентные изображения кончиков корней с помощью флуоресцентной микроскопии ($\lambda_{\text{возб}} = 488 \text{ нм}$ и $\lambda_{\text{фл}} = 525 \text{ нм}$). Результаты записать в табл. 1.13.

Таблица 1.13

Вариант эксперимента \ Параметр	Контроль	Клиностат	Контроль + + 4 мМ H ₂ O ₂	Клиностат + + 4 мМ H ₂ O ₂
Интенсивность флуоресценции				

Сравнить локализацию и интенсивность флуоресценции в каждом варианте эксперимента и сделать вывод о влиянии H₂O₂ и клиностати-рования на Ca²⁺-зависимую флуоресценцию корня.

3. Анализ влияния изменения силы тяжести на распределение ионов кальция в корне проростков.

Пробирки для центрифугирования заполнить наполовину дистиллированной водой и поместить в них растения, нагруженные флуоресцентным зондом (см. п. 2) (по 3–5 шт.) таким образом, чтобы в воду была погружена только корневая система (зафиксировать поролоном, стараясь не повредить корни) (4 пробирки: 1 – контроль без центрифугирования, 2, 3, 4 – различные режимы центрифугирования). Уравновесить пробирки с растениями аналогичными пробирками с дистиллированной водой без растений для центрифугирования. Центрифугировать при 100, 1000, 10 000 g в течение 15 мин. Заполнить табл. 1.14.

Таблица 1.14

Вариант эксперимента \ Параметр	Без центрифугирования	100 g	1000 g	10 000 g
Интенсивность флуоресценции				

По окончании центрифугирования извлечь проростки, трижды промыть дистиллированной водой и сразу сравнить флуоресцент-

ные изображения корней с помощью флуоресцентной микроскопии ($\lambda_{\text{возб}} = 488 \text{ нм}$ и $\lambda_{\text{фл}} = 525 \text{ нм}$).

Сделать вывод о влиянии изменения силы тяжести на Ca^{2+} -зависимую флуоресценцию корня.

Контрольные вопросы

1. Что является первичной мишенью действия гравитации на растительный организм?
2. Какова роль ионов кальция в восприятии растениями изменений гравитационного поля?
3. Какова роль ауксина и H_2O_2 в гравитропических ответах корня?
4. Возможно ли культивирование растений в условиях микрогравитации?

Лабораторная работа 8

ВЛИЯНИЕ СВЕТА НА НАКОПЛЕНИЕ ПРОДУКТОВ ПЕРВИЧНОГО И ВТОРИЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА В ЛИСТЬЯХ И КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* КАТАРАНТУСА РОЗОВОГО

Цель работы: оценить влияние освещения на накопление продуктов вторичного и первичного метаболизма в гетеротрофной и фотомиксотрофной каллусной культуре и нативных растениях катарантуса розового.

Материалы и оборудование: листья катарантуса розового, гетеротрофная (культивируемая в темноте) и фотомиксотрофная (культивируемая на свету) каллусная ткань катарантуса розового, этанол, гексан, хлороформ, реактив Фолина – Дениса, карбонат натрия, хлорид алюминия, сахароза, *трис*-HCl, ЭДТА, меркаптоэтанол, фенолметан сульфонил фторид (ФМСФ), 1 М NaOH, 1 М HCl, бычий сывороточный альбумин (БСА), кумасси бриллиантовый голубой G-250, фарфоровые ступки, делительные воронки, выпаривательные чашки, мерные цилиндры, центрифужные и микроцентрифужные пробирки, штативы для пробирок, нейлоновая ткань, бюксы, сушижаровой шкаф, центрифуга, спектрофотометр.

Вводные замечания

В настоящее время многие соединения, используемые в фармацевтической, пищевой и парфюмерной промышленности, получают из растительного сырья. Применение лекарственных препаратов растительного происхождения, доказавших свою эффективность и безопасность, становится все более актуальным. Широкий спектр биологической активности фитопрепаратов обусловлен способностью растений к биосинтезу разнообразных БАВ. Среди них следует выделить две основные группы: первичные и вторичные метаболиты. Снижению развития заболеваемости также способствует присутствие в составе пищевых продуктов и биологически активных добавок, таких как аминокислоты, витамины, минеральные вещества, пищевые волокна и т. д.

Понятия первичных и вторичных метаболитов были введены в 1891 г. немецким биологом Альбрехтом Косселем. К первичным метаболитам относят вещества, участвующие в росте, развитии и репродукции, например нуклеотиды, аминокислоты, липиды, органические кислоты, углеводы и др. При этом под термином «первичный

метаболизм» понимают такие процессы, как дыхание, фотосинтез, синтез ДНК и РНК, белков и липидов. Однако в большинстве случаев БАВ растений относятся ко вторичным метаболитам – алкалоидам, фенольным соединениям, изопреноидам и минорным соединениям, таким как небелковые аминокислоты, цианогенные гликозиды, цианолипиды, беталаины, тиофены и др. К настоящему времени идентифицировано более 100 000 индивидуальных соединений вторичного метаболизма. Вторичный метаболизм – это синтез веществ (вторичных метаболитов), не участвующих в основном (первичном) обмене и имеющих значение на уровне целого организма. Данные метаболиты выполняют в растении запасающую и защитную функции и являются продуктами жизнедеятельности, участвуют во взаимодействии с окружающей средой, в том числе и с другими организмами.

Растения семейства *Aprocunaceae* являются незаменимым источником получения очень многих фармакологически ценных веществ, обладающих биологически активным действием. Самым известным представителем этого семейства является катарантус розовый (*Catharanthus roseus* G. Don) – тропический вечнозеленый кустарник (рис. 1.13).



Рис. 1.13. Внешний вид растения катарантус розовый

В катарантусе розовом синтезируется более 100 терпеновых индольных алкалоидов, характеризующихся широким спектром биологической активности. Все данные соединения представляют интерес для фармацевтической промышленности. Но в основном повышенное внимание к исследованиям катарантуса розового обусловлено его способностью синтезировать и накапливать алкалоиды *bis*-индольной природы, обладающие противоопухолевой активностью. В их числе: винбластин, используемый, например, для лечения болезни Ходжкина

(лимфогранулематоза), и винкристин, применяемый при терапии различных видов лейкемии. Однако высокоценные бис-индольные алкалоиды синтезируются в растениях в весьма малом количестве. Так, содержание винкристина в листьях катарантуса розового в пересчете на сухую массу составляет около 0,0003 %. В связи с этим стоимость винбластина и винкристина на рынке является весьма значительной.

Кроме алкалоидов в катарантусе розовом синтезируется широкий спектр фенольных соединений: 2,3-дигидоксibenзойная кислота, фенилпропаноиды, такие как производные коричной кислоты, а также флавоноиды и антоцианы, обладающие антиоксидантной активностью.

Катарантус розовый произрастает в тропических и субтропических климатических поясах планеты, в условиях климата Беларуси его культивирование в открытом грунте невозможно. Более того, важно отметить, что состав и количественное содержание биологически активных метаболитов в катарантусе розовом значительно варьируются не только в зависимости от вида, разновидности и сорта растения, но также от условий произрастания. В связи с этим особое значение приобретает разработка и внедрение современных технологий, позволяющих получать фармакологически активные препараты на основе культур клеток и тканей независимо от климатических условий. Использование культуры клеток и тканей имеет ряд преимуществ перед традиционным культивированием растений в открытом и защищенном грунте:

- 1) независимость от климатических условий;
- 2) отсутствие негативного влияния патогенов;
- 3) контролируемые условия культивирования;
- 4) возобновляемый источник экологически чистых вторичных метаболитов.

Характерной особенностью клеточных культур *in vitro* является их дедифференцированное состояние, которое индуцируется экзогенными гормональными препаратами (цитокинами и ауксинами) при инициации. Внешний вид первичной каллусной ткани *Catharanthus roseus*, иницированной на листовых эксплантах, представлен на рис. 1.14.

Культивирование клеток и тканей *in vitro* – каллусной и суспензионной культур – позволяет, с одной стороны, получить морфологически, физиологически и генетически однородный клеточный материал, с другой – культура *in vitro* может характеризоваться генетической гетерогенностью и изменчивостью. При этом зачастую в процессе длительного субкультивирования клеточная культура со временем все же приобретает генетическую, морфологическую и биохимическую однородность. Это и позволяет рассматривать ее в качестве уникального модельного объекта.

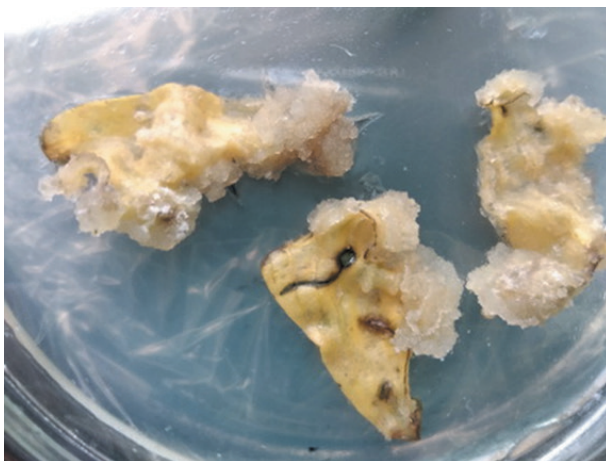


Рис. 1.14. Первичная каллусная ткань
Catharanthus roseus (L.) G. Don,
инициированная на листовых эксплантах

Несколько меньшая по сравнению с каллусной тканью генетическая, физиологическая и морфологическая вариабельность присуща суспензионным клеткам. Это может быть связано со спецификой культивирования: более однородными условиями питания, аэрации и удалением токсичных метаболитов из клеточного окружения.

К сожалению, в настоящее время в производстве БАВ растительного происхождения наблюдается недостаток сырьевых ресурсов при неуклонном росте спроса. В связи с этим поиск приемов, позволяющих повысить продуктивность ценных лекарственных растений, становится все более актуальным. При их выращивании в открытом и защищенном грунтах большое значение имеет подбор условий культивирования, обеспечивающих оптимальное соотношение между процессами роста и развития растений (синтезом первичных метаболитов) и биосинтезом фармакологически активных вторичных метаболитов. Существенное влияние на биосинтетический потенциал каллусных и суспензионных культур *in vitro* также оказывают физико-химические условия их культивирования. Так, например, свет является одним из наиболее важных факторов окружающей среды, который используется растениями как уникальный источник не только энергии, но и внешней информации, оказывающий непосредственное воздействие на рост и развитие. Снабженные специфическими фоторецепторами,

растительные организмы способны оценивать количество и качество света, а именно такие его характеристики, как длина волны, интенсивность, направление, продолжительность действия. Варьирование и оптимизация параметров освещенности может позволить контролировать как накопление биомассы, так и процессы первичного и вторичного метаболизма.

Ход работы

1. Получение и спектрофотометрический анализ экстрактов.

Спектрофотометрическая идентификация компонентов экстракта из растительного сырья может быть затруднительна вследствие содержания значительного количества различных веществ со сложными оптическими свойствами. Несмотря на это, спектры поглощения позволяют дать предварительную оценку наличия биологически активных соединений в исследуемом сырье, поскольку известно, что многие классы веществ обладают специфическими спектрами поглощения. Область 270–290 нм – характерные длины волн поглощения аминокислот, фенольных соединений и ряда алкалоидов. Полосы поглощения 420–450 нм обычно характерны для спектров значительного количества веществ, в том числе хлорофиллов, каротиноидов и ряда фенольных соединений. Поглощение длин волн 520–530 нм свойственно, например, растворам антоцианов. Максимумы при длинах волн 660–680 нм характеризуются спектры поглощения хлорофиллов.

Определить содержание (%) сухого вещества в исследуемом растительном материале – листьях и каллусной ткани – путем их сушки при 105 °С в сухожаровом шкафу в металлических бюксах до постоянного веса.

Навески листьев и каллусной ткани в пересчете на 0,3 г сухой массы гомогенизировать в ступке в 30 мл 70%-го этанола, настаивать в течение 30 мин. Затем экстракт отфильтровать и центрифугировать в течение 15 мин при 10 000 г. Довести объем супернатанта до 30 мл и использовать для дальнейших анализов (см. п. 2–4).

Провести спектрофотометрический анализ экстрактов в диапазоне от 200 до 800 нм. Сделать выводы.

2. Идентификация алкалоидов в экстрактах.

Для определения суммы алкалоидов 15 мл полученного экстракта выпарить досуха, растворить в 5 мл этилового спирта, добавить равное количество дистиллированной воды и подкислить соляной кислотой

до конечной концентрации 3 %. Затем экстракт перелить в делительную воронку и трижды очистить гексаном при соотношении 1 : 1, гексановую фракцию отбросить. Водно-спиртовой раствор охладить до 10 °С и довести до рН 8,5 с помощью 1 М NaOH. Алкалоиды трижды экстрагировать хлороформом. Водноспиртовую фракцию слить. Хлороформное извлечение промыть дистиллированной водой, выпарить и взвесить для определения суммы алкалоидов. Рассчитать содержание суммы алкалоидов на грамм сухой массы.

3. Количественное определение суммы фенольных соединений.

К 0,2 мл полученного экстракта прибавить 7,7 мл дистиллированной воды, 0,1 мл реактива Фолина – Дениса и 2 мл 10%-го раствора карбоната натрия, все тщательно перемешать и оставить в темном месте. Через 15 мин измерить оптическую плотность полученного раствора при длине волны 720 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Рассчитать концентрацию (мг/мл) фенольных соединений в полученном экстракте в пересчете на галловую кислоту с учетом оптической плотности исследуемого раствора и калибровочного коэффициента, равного 0,5. Затем содержание суммы фенольных соединений (Ф, %) в пересчете на галловую кислоту в абсолютно сухом сырье вычислить с учетом общего объема экстракта, массы навески растительного сырья и % содержания сухого вещества в ткани.

4. Количественное определение суммы флавоноидов.

К 0,2 мл полученного экстракта прибавить 5 мл 0,05 М раствора алюминия хлорида в этаноле. Оптическую плотность полученного раствора измерить при длине волны 410 нм. В качестве раствора сравнения используют 0,05 М раствор алюминия хлорида в этаноле.

Рассчитать концентрацию (мкг/мл) флавоноидов в полученном экстракте в пересчете на рутин с учетом оптической плотности исследуемого раствора и калибровочного коэффициента, равного 0,25. Затем содержание суммы флавоноидов (Фл, %) в пересчете на рутин в абсолютно сухом сырье вычислить с учетом общего объема экстракта, массы навески растительного сырья и % содержания сухого вещества в ткани.

5. Определение содержания цитоплазматического белка.

2 г сырой ткани очень тщательно гомогенизировать в 10 мл раствора, содержащего 0,3 М сахарозу, 10 мМ *трис*-HCl, 5 мМ ЭДТА, 2 мкМ меркаптоэтанол, 5 мкМ ФМСФ. Гомогенат отфильтровать через нейлоновый фильтр и центрифугировать при 10 000 г в течение 30 мин. Для измерения использовать метод Брэдфорда.

К 50 мкл исследуемого белкового раствора добавить 950 мкл приготовленного раствора кумасси бриллиантового голубого G-250 для определения концентрации белка и инкубировать в течение 10 мин в темноте. Для приготовления контрольного образца использовать 50 мкл раствора для гомогенизации.

Поглощение измерять при 595 нм на спектрофотометре.

Количество белка в пробе определить по предварительно построенной калибровочной кривой с использованием БСА в качестве стандарта (рис. 1.15).

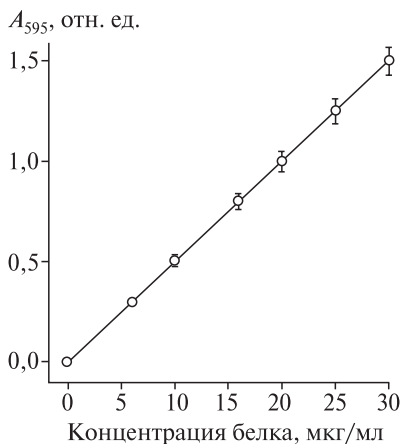


Рис. 1.15. Зависимость величины поглощения A от концентрации БСА

Полученные результаты записать в табл. 1.15.

Таблица 1.15

Объект исследования Параметр	Листья	Гетеротрофный каллус	Фотомиксотрофный каллус
Алкалоиды, мг/г			
Фенольные соединения, %			
Флавоноиды, %			
Белок, мкг/г			

Сравнить содержание метаболитов в различных образцах, оценить уровень накопления продуктов первичного и вторичного метаболизма в листе и каллусной культуре, сделать выводы о влиянии освещения на метаболизм каллусной культуры катарантуса розового.

Контрольные вопросы

1. Дайте определение понятиям «первичные метаболиты» и «вторичные метаболиты».
2. Какие преимущества имеет использование каллусной и суспензионной культур перед традиционным культивированием растений в открытом и защищенном грунтах?
3. В чем ценность сырья растения катарантус розовый?

Лабораторная работа 9

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Цель работы: провести сравнительный анализ антиоксидантной активности экстрактов различных видов лекарственных растений.

Материалы и оборудование: трава календулы лекарственной, девясил высокий, душицы, шалфея, зверобоя, ромашки лекарственной или других; DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил), этанол, мел, кварцевый песок, ступка с пестиком, металлические бюксы, весы, центрифуга, ножницы, вата, бумага фильтровальная, центрифужные пробирки, пробирки стеклянные, воронки, мерные цилиндры, мерные колбы на 250 мл, стеклянные мерные пипетки на 1 и 5 мл, груши, сухожаровой шкаф, спектрофотометр.

Вводные замечания

Антиоксиданты играют важную роль в регуляции свободнорадикальных превращений в организме человека и животных благодаря снижению концентрации свободнорадикальных форм метаболитов в клетках и ингибированию перекисного окисления липидов биологических мембран, которое ведет к патологическим изменениям функции клеток.

Свободные радикалы представляют собой реакционноспособные частицы, содержащие на внешней оболочке один или несколько неспаренных электронов. Их схематическое изображение и отличие от стабильных молекул представлено на рис. 1.16.

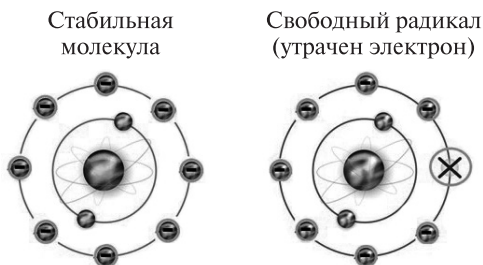


Рис. 1.16. Схематическое изображение стабильной молекулы и свободного радикала с утраченным электроном

Свободные радикалы также могут относиться к АФК, однако не всегда ими являются. Они образуются во всех живых организмах в ходе обычной жизнедеятельности как побочные продукты клеточного метаболизма. Например, АФК образуются при незначительной утечке электронов в дыхательной цепи митохондрий. При этом уровень АФК настолько мал, что клетка способна сама инактивировать их с помощью антиоксидантных систем. Схематическое изображение взаимодействия антиоксиданта со свободным радикалом представлена на рис. 1.17.

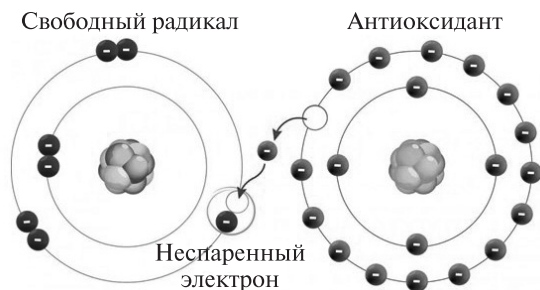


Рис. 1.17. Схематическое изображение реакции взаимодействия антиоксиданта со свободным радикалом

Однако при значительном превышении уровня АФК защитные системы клетки уже не справляются с их инактивацией. Это может вести к развитию оксидативного стресса и серьезным деструктивным процессам. В результате, когда сила окислительного стресса велика, клетка погибает (рис. 1.18). Предполагают, что с повышенным образованием свободных радикалов и АФК в клетках всех живых организмов связаны процессы старения.

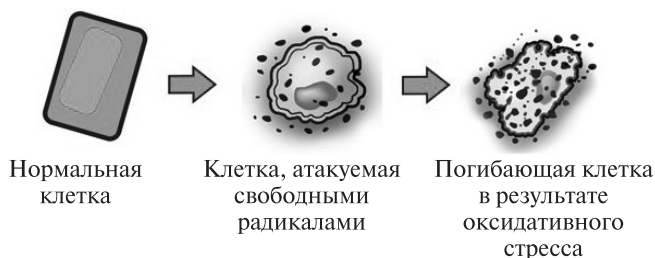


Рис. 1.18. Схематическое изображение клеточной смерти при выраженном оксидативном стрессе

Антиоксидантные системы можно разделить на неферментативные (соединения низкомолекулярной небелковой природы) и специфические ферментативные. В низкомолекулярные неферментативные системы включают, например, витамины А, С и Е, каротиноиды, пролин, аскорбат, глутатион, таурин, липоевую кислоту, кофермент Q₁₀, флавоноиды и др. Наиболее известными антиоксидантными ферментами являются супероксиддисмутаза, каталаза и пероксидаза. Данные ферменты являются важнейшей частью антиоксидантной системы животных и растительных организмов.

Наиболее перспективными источниками природных антиоксидантов являются лекарственные растения, в состав которых входят фенольные соединения различных групп, такие как флавоноиды (катехины, антоцианы, флавононы), фенолпропаноиды, терпены, дубильные вещества и др. Поэтому исследование антиоксидантных свойств индивидуальных соединений либо экстрактов, обогащенных такими веществами, является весьма актуальным.

Антиоксидантную активность экстрактов часто определяют по восстановлению DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил) радикала. В результате восстановления DPPH антиоксидантными молекулами снижается фиолетовая окраска спиртового раствора данного радикала, и в итоге раствор обесцвечивается (рис. 1.19). Реакция контролируется спектрофотометрически по изменению (уменьшению) оптической плотности раствора при 517 нм.

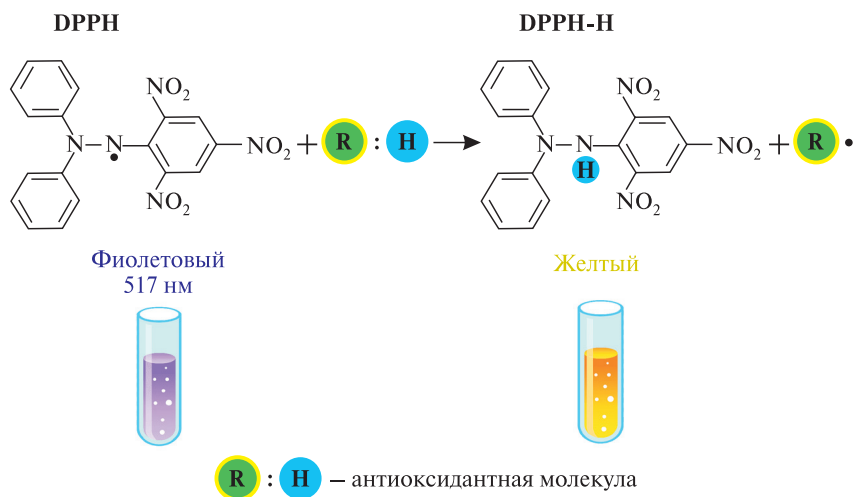


Рис. 1.19. Реакция восстановления DPPH-радикала антиоксидантом

Ход работы

Навеску растительного материала (1 г) измельчить и гомогенизировать в фарфоровой ступке в 70%-м этаноле (5 мл) с мелом и кварцевым песком. Добавить к гомогенату 15 мл 70%-го этанола, перемешать до однородного состояния и аккуратно перенести содержимое в центрифужные пробирки. Центрифугировать в течение 15 мин при 10 000 g. Супернатант использовать для определения антиоксидантной активности.

Для определения антиоксидантной активности 0,1 мл экстракта добавить к 2,4 мл 70%-го этанола и 1 мл 0,3 мМ этанольного раствора DPPH. Изменение оптической плотности регистрировать при 517 нм.

В качестве контрольного образца (A_0) смешать 2,5 мл 70%-го этанола и 1 мл 0,3 мМ этанольного раствора DPPH. Динамику восстановления DPPH-радикала определять в интервале 10–50 мин на 10-й, 20-й, 30-й, 40-й и 50-й минуте инкубации. Результаты занести в табл. 1.16.

Таблица 1.16

Объект	Поглощение, отн. ед.				
	10 мин	20 мин	30 мин	40 мин	50 мин

Построить графики зависимости величин оптической плотности поглощения от времени инкубации полученных экстрактов исследуемых растений с раствором DPPH.

Сделать выводы о разнице в величине и динамике антиоксидантной активности у различных видов лекарственных растений.

Рассчитать антиоксидантную активность каждого экстракта. Значения антиоксидантной активности (АОА) в % определять по формуле

$$АОА = \left(\frac{(A_0 - A_t)}{A_0} \cdot 100 \% \right) / m_{\text{сух}},$$

где A_0 – оптическая плотность контрольного образца (в отсутствие экстракта); A_t – оптическая плотность исследуемого образца; $m_{\text{сух}}$ – масса сухого вещества навески растительного материала.

Для определения сухого вещества навески сырого растительного материала поместить в металлические бюксы и сушить в сушильном шкафу при 105 °С до постоянного веса.

Контрольные вопросы

1. Какую роль играют антиоксидантные соединения в организме животных и растений?
2. Что представляют собой свободные радикалы и какие изменения они вызывают в растительной клетке?
3. Перечислите этапы определения антиоксидантной активности растительного сырья.

РАЗДЕЛ 2

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ И КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ СТУДЕНТОВ

2.1. ФОТОСИНТЕЗ И ПРОДУКТИВНОСТЬ РАСТЕНИЙ

В результате фотосинтеза создается почти 95 % органической массы растения. Поэтому понимание отношения между фотосинтезом и продуктивностью всегда было ключевым при использовании фотосинтетических признаков в селекции растений. В общем смысле биологическая продуктивность растений – это скорость генерации их биомассы в экосистеме, в основе которой лежит поглощение энергии квантов света и образование органических веществ в процессе фотосинтеза. Под продуктивностью также понимают воспроизведение растений, используемых человеком, идущее с определенной скоростью. Ее можно охарактеризовать величиной продукции в единицу времени на единицу площади или объема. Продукция – сумма приростов особей популяции. Используют также термин «урожайность». Урожайность биологическая – прирост массы сухого вещества, хозяйственная – сырого или сухого вещества хозяйственно ценных элементов, например, плодов или семян.

Во многих случаях целью культивирования растения является получение не общей биомассы, а определенных хозяйственно важных органов: семян (зерна), корнеплодов, плодов и т. п. К элементам продуктивности (продукции) в соответствии с целями производства также относят: всхожесть (коэффициент размножения), биомассу вегетативных или генеративных органов, продукты первичного или вторичного метаболизма, габитус и т. д. Важным элементом продуктивности являются семена растений. Продовольственная безопасность, особенно

в развивающихся странах, зависит главным образом от производства зерновых культур. Шесть наиболее популярных в мире культур: кукурузу, рис, пшеницу, сою, ячмень и сорго – выращивают для получения семян на более чем 40 % общей площади пахотных земель.

Получение высоких урожаев хозяйственно полезной биомассы – конечная цель любой культуры растений. Потребление общей биомассы растений, в том числе и как альтернативных источников энергии, во всем мире непрерывно растет. В качестве такой биомассы могут быть использованы остатки сельскохозяйственной продукции, лесная биомасса, культивируемые в биореакторах водоросли и др. Определение показателей продуктивности обычно сводится к измерению прироста массы растения.

Исследования взаимосвязи интенсивности фотосинтеза с продуктивностью продолжают уже много десятилетий. Достаточно долго считали, что зависимость между ними прямо пропорциональная. Поэтому в течение длительного времени проводили активный поиск и селекцию растений, имеющих повышенную интенсивность фотосинтетических процессов. Однако часто при активно фотосинтезирующем ФСА высокой продуктивности у растений не наблюдали. В большинстве случаев это было связано с тем, что между фотосинтезом и продуктивностью множество прямых и обратных связей, малоизученных или неизвестных, включая донорно-акцепторные отношения между фотосинтезирующим листом и органами растения, потребляющими ассимиляты. А это означает, что при необходимости улучшить структуру ФСА и повысить интенсивность фотосинтетических процессов растения требуется учитывать емкости и активности не только донорных, но и акцепторных органов, т. е. увеличение продуктивности растения возможно только путем оптимизации всех многочисленных систем и связей.

Кроме того, скорость и эффективность фотосинтеза зависит и от большого числа внешних факторов. Среди них:

- 1) интенсивность и спектральный состав света;
- 2) температура;
- 3) концентрация CO_2 ;
- 4) минеральное питание;
- 5) водный режим и т. д.

Следует также отметить, что и оценка продуктивности селекционного материала часто осложняется вследствие значительного влияния условий окружающей среды. Под влиянием внешних факторов разли-

чия в продуктивности между растениями одного сорта могут даже превосходить разницу в средней продуктивности между сортами.

К основным показателям, применяемым для описания и расчетов некоторых параметров, связанных с фотосинтезом и продуктивностью растений, относят следующие.

Интенсивность фотосинтеза — количество углекислого газа, поглощенного единицей листовой поверхности растения за единицу времени:

$$I_{\text{ф}} = \frac{A_{\text{CO}_2}}{S \cdot t},$$

где $I_{\text{ф}}$ — интенсивность фотосинтеза, $\text{мг} \cdot \text{дм}^{-2} \cdot \text{ч}^{-1}$; A_{CO_2} — количество углекислого газа, поглощенного растением, мг ; S — площадь листовой поверхности, дм^2 ; t — время, ч.

Коэффициент эффективности фотосинтеза — отношение количества поглощенного растением углекислого газа к количеству накопленного органического вещества за единицу времени:

$$K_{\text{эф}} = \frac{A_{\text{CO}_2}}{m},$$

где $K_{\text{эф}}$ — коэффициент эффективности фотосинтеза; A_{CO_2} — количество CO_2 , поглощенного растением, мг ; m — количество накопленного органического вещества за единицу времени, мг .

Энергетический выход фотосинтеза — отношение количества запасенной растением энергии к количеству поглощенной энергии:

$$E = \frac{E_{\text{зап}}}{E_{\text{погл}}},$$

где E — энергетический выход фотосинтеза; $E_{\text{зап}}$ — запасенная энергия, ккал; $E_{\text{погл}}$ — поглощенная энергия, ккал.

Чистая продуктивность фотосинтеза — это количество сухого вещества, накопленного листовой поверхностью определенной площади за определенный промежуток времени:

$$\text{ЧПФ} = \frac{m}{S \cdot t},$$

где ЧПФ — чистая продуктивность фотосинтеза, $\text{г} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{сут}^{-1}$; m — масса накопленного сухого вещества, г ; S — площадь листовой поверхности, м^2 ; t — время, сут.

Ассимиляционное число — количество ассимилированной листом за 1 час углекислоты, приходящееся на единицу содержащегося в листе хлорофилла; выражается в $\text{мг} \text{CO}_2/\text{мг} \text{хлорофилла}/\text{ч}$.

Задание 1

Решите следующие задачи.

Задача 1. Растение с площадью листьев $1,12 \text{ дм}^2$ усвоило 69 мг углекислого газа за 10 ч . Рассчитайте интенсивность фотосинтеза данного растения.

Задача 2. Растение орхидея фаленопсис за 1 ч в процессе фотосинтеза усвоило 230 мг углекислого газа и накопило $0,09 \text{ г}$ сухой массы. Рассчитайте коэффициент эффективности фотосинтеза у данного растения.

Задача 3. Рассчитайте энергетический выход фотосинтеза растения, если количество запасенной растением энергии составляет 156 ккал , а поглощенной энергии — 940 ккал .

Задача 4. За одни сутки в процессе фотосинтеза растение с площадью листьев 950 дм^2 накопило 34 г сухого вещества. Рассчитайте чистую продуктивность фотосинтеза растения.

Задача 5. Определите интенсивность фотосинтеза по количеству накопленного органического вещества за 3 ч . Площадь листьев — $0,7 \text{ дм}^2$. Абсолютно сухая масса листьев до опыта — $0,16 \text{ г}$, после опыта — $0,32 \text{ г}$.

Задача 6. Определение интенсивности фотосинтеза методом листовых половинок производили с 8 до 12 ч . Взвешивание высушенных проб листьев дало следующие результаты: а) освещенные листья 8 ч — $0,2233 \text{ г}$, 12 ч — $0,2603 \text{ г}$; б) затененные листья 8 ч — $0,2350 \text{ г}$, 12 ч — $0,2050 \text{ г}$. Площадь листьев была одинакова и составляла 100 см^2 . Вычислите интенсивность фотосинтеза.

Задача 7. Сколько органического вещества синтезирует растение с площадью листьев $4,4 \text{ дм}^2$ за 45 мин , если известно, что интенсивность фотосинтеза составляет $30 \text{ мг} \cdot \text{дм}^{-2} \cdot \text{ч}^{-1}$?

Задача 8. Определите интенсивность фотосинтеза растения в эксперименте с $\text{Ba}(\text{OH})_2$, если поверхность листьев $0,73 \text{ дм}^2$, продолжительность опыта — 20 мин , количество раствора $\text{Ba}(\text{OH})_2$ в колбе — 20 мл . На титрование опытного раствора пошло $19,5 \text{ мл}$ HCl , контрольного — 18 мл , 1 мл HCl соответствует $0,44 \text{ мг}$ CO_2 .

Задача 9. Вычислите чистую продуктивность фотосинтеза, если начальная биомасса растений с 1 м^2 – $42,5 \text{ г}$ ($M_{\text{нач}}$), конечная – $412,3 \text{ г}$ ($M_{\text{кон}}$), период роста растений 10 дней (n). Площадь листьев растений в начале и в конце опыта равна соответственно $1,3$ (S_1) и $8,4$ (S_2) м^2 .

Задача 10. Определите величину ассимиляционного числа листа, имеющего $4,2 \text{ мг}$ хлорофилла, поглотившего в течение 3 ч 120 мг CO_2 .

Задача 11. Определите интенсивность фотосинтеза, если известно, что за 35 мин ассимиляционная поверхность растения $1,2 \text{ дм}^2$ поглотила 18 мг CO_2 .

Задание 2

В следующих вопросах выберите правильные ответы (их может быть несколько).

1. Какие существуют пути дезактивации электронно-возбужденного состояния молекулы хлорофилла:

- а) использование энергии возбуждения в физической стадии фотосинтеза;
- б) перенос энергии на другую молекулу;
- в) превращение энергии возбуждения в тепло;
- г) излучение фотона с переходом системы в основное состояние?

2. В результате какого процесса может происходить дезактивация молекул хлорофилла:

- а) удаления 5-циклопентанного кольца;
- б) колебательной релаксации;
- в) внутренней конверсии;
- г) хелатирования иона магния;
- д) фосфоресценции?

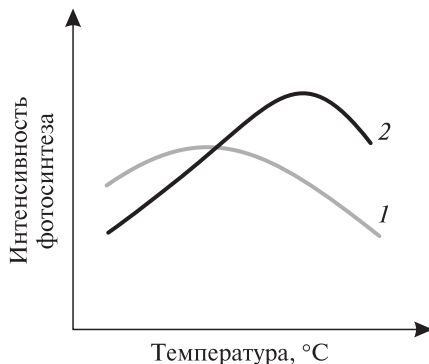
3. Какие пигменты не могут участвовать в осуществлении процесса фотосинтеза:

- а) каротин;
- б) фикоцианин;
- в) ксантофилл;
- г) фитохром;
- д) феофитин?

4. Что такое флуоресценция при фотосинтезе:

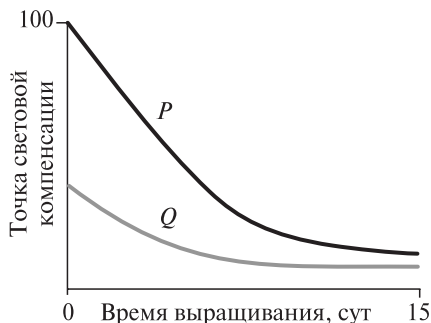
- а) поглощение света;
- б) испускание света;
- в) поглощение фосфора;
- г) выделение фосфора;
- д) поглощение магния;
- е) выделение магния?

5. Ответ ФСА растений на изменения температурного режима может быть представлен в виде графика. Для каких растений характерны изображенные ниже кривые зависимости фотосинтеза от температуры?



- а) 1 – C_4 -растения, 2 – C_3 -растения;
- б) 1 – САМ-растения, 2 – C_3 -растения;
- в) 1 – САМ-растения, 2 – C_3 -растения;
- г) 1 – C_3 -растения, 2 – C_4 -растения.

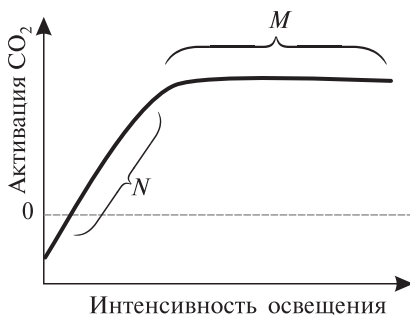
6. Два растения P и Q выращивали в сильно затемненных условиях. В процессе выращивания они продемонстрировали следующие изменения точки световой компенсации (точка световой компенсации – это интенсивность освещения, при которой фотосинтез и дыхание точно уравновешивают друг друга).



Выберите верные варианты:

- а) график *P* отражает акклиматизацию светолюбивого растения к низкой интенсивности освещения;
- б) график *Q* показывает, что данное растение относится к теневыносливым и не может фотосинтезировать, если интенсивность освещения ниже критического уровня;
- в) растение *P* – теневыносливое и акклиматизируется гораздо быстрее к низкой интенсивности освещения, чем растение *Q*;
- г) растение *Q* – светолюбивое и не способно акклиматизироваться к низкой интенсивности освещения.

7. На графике представлена типичная кривая, отражающая зависимость интенсивности фотосинтеза от уровня освещения. Что является лимитирующими факторами фотосинтеза на стадиях *M* и *N*?



- а) температура и CO_2 соответственно;
- б) CO_2 и свет соответственно;
- в) только CO_2 ;
- г) свет и CO_2 соответственно.

8. Следующая таблица характеризует адаптацию растения А и растения Б к различным условиям.

Параметры	Растение А	Растение Б
Точка компенсации CO_2 (мкл $\text{CO}_2 \cdot \text{л}^{-1}$)	20–100	0–5
Зависимость квантового выхода от повышения температуры	Убывает	Не изменяется

Выберите верные варианты:

- а) растение Б является C_4 -растением;
- б) растение А является более конкурентоспособным при высокой температуре;
- в) при концентрации углекислого газа в атмосфере $18 \text{ мкл} \cdot \text{л}^{-1}$ растение А не фотосинтезирует;
- г) если содержание CO_2 в атмосфере удвоится, интенсивность фотодыхания у растения А, скорее всего, увеличится.

9. Что характерно для световых реакций фотосинтеза:

- 1) низкая чувствительность к свету;
- 2) высокая чувствительность к свету;
- 3) низкий КПД энергопреобразования;
- 4) высокий КПД энергопреобразования;
- 5) маломеняющаяся конформация белковых комплексов;
- 6) сильноменяющаяся конформация белковых комплексов?

- а) 1, 3, 5; б) 1, 4, 5; в) 2, 4, 6; г) 2, 3, 6.

Задание 3

В эксперименте с помощью флуориметра типа РАМ были установлены следующие параметры флуоресценции у трех сравниваемых растений. Фоновый уровень флуоресценции $(F_0)_1 = 25$; $(F_0)_2 = 50$; $(F_0)_3 = 25$. Максимально возможная флуоресценция $(F_{\max})_1 = 300$; $(F_{\max})_2 = 200$; $(F_{\max})_3 = 150$.

Рассчитайте необходимые параметры F_v и F_v/F_{\max} и заполните таблицу.

Параметр	Растение		
	1	2	3
F_v			
F_v/F_{\max}			

Сделайте выводы о физиологическом состоянии растений и заполните таблицу на с. 81.

Отметьте в ней ответы на следующие вопросы.

А. В клетках какого растения меньше хлорофилла? Укажите параметр, анализ которого позволяет получить ответ.

Б. Для какого растения более эффективной является трансформация физической энергии света в химическую?

В. Какое растение относится к C_4 -растениям?

Г. В каком растении менее эффективными являются процессы восстановления CO_2 ?

Д. Какое растение испытывает наибольший недостаток элементов минерального питания?

Вопрос	Растение			На основании полученных данных ответить нельзя
	1	2	3	
А				
Б				
В				
Г				
Д				

Выберите верные утверждения. Объясните свой выбор.

А. Больше всего хлорофилла содержится в листьях растения 1.

Б. Фотосинтетическая трансформация физической энергии света в химическую происходит наиболее эффективно в листьях растения 1.

В. В хлоропластах растения 2 процессы восстановления CO_2 являются наименее эффективными.

Г. Больше всего углеводов образуется в результате фотосинтеза в растении 2.

Д. Условия роста растения 3 наиболее оптимальные.

Е. Растение 3 растет при большем дефиците азота, чем растение 1.

Задание 4

Листья двух различных растений, одно из которых росло под солнцем, другое – в тени, были отделены от растения и помещены в отдельные прозрачные коробки. Листья облучали светом с постоянно возрастающей интенсивностью, при этом измеряли уровень выделения O_2 . Результаты этого эксперимента представлены в таблице.

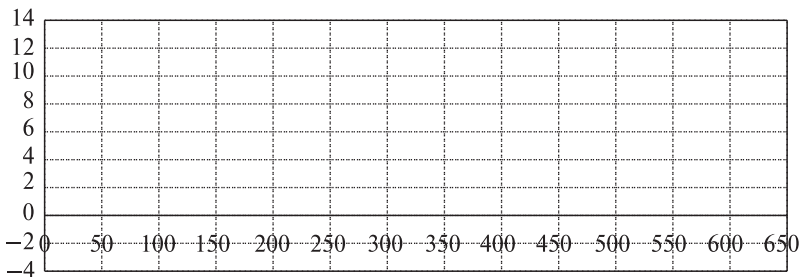
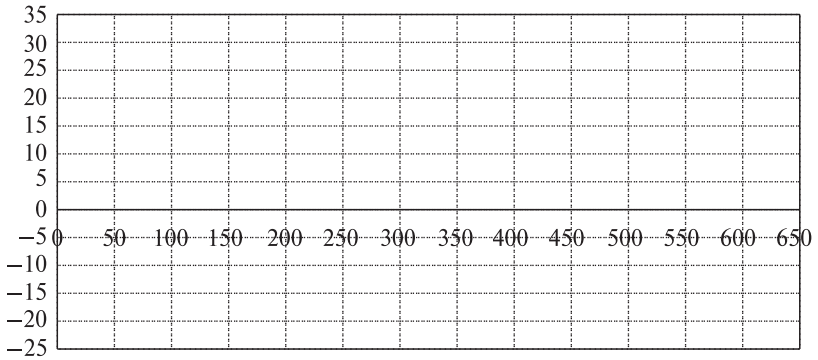
Интенсивность света ($\mu\text{моль фотонов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$)	Интенсивность выделения O_2 ($\mu\text{моль } O_2 \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$)	
	Лист А	Лист Б
0	-20	-2
10	-10	-0,5

Окончание таблицы

Интенсивность света ($\mu\text{моль фотонов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$)	Интенсивность выделения O_2 ($\mu\text{моль} \text{O}_2 \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$)	
	Лист А	Лист Б
25	-5	1,5
50	-1	3
100	5	6
250	15	10
500	28	12
600	30	11

В соответствии с данными, представленными в таблице, постройте для каждого листа отдельно график зависимости уровня фотосинтеза (образования O_2) от интенсивности света.

Для построения каждого графика правильно выберите координатную плоскость, масштаб которой больше подходит для набора данных, представленных в таблице. Обозначьте единицы на каждой оси.



Постройте графики зависимости уровня фотосинтеза (образования O_2) от интенсивности света отдельно для листа А и отдельно для листа Б.

Проанализируйте графики и определите, какой лист (А или Б) срезан с растения, адаптированного к тени, а какой с растения, адаптированного к солнцу. Внесите ответ в таблицу ниже.

Лист \ Адаптация	А	Б
К тени		
К солнцу		

Используйте построенные графики для правильного ответа на следующие вопросы.

1. Является ли световой компенсационный пункт для листа А выше, чем для листа Б:

- а) да;
- б) нет?

2. Можно ли определить световой компенсационный пункт как уровень света, при котором скорость фотосинтеза достигает максимума:

- а) да;
- б) нет?

3. Какой из ответов ниже правильно определяет световой компенсационный пункт для листа А:

- а) между -10 и -5 $\mu\text{моль } O_2 \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$;
- б) между 10 и 20 $\mu\text{моль } O_2 \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$;
- в) между 25 и 50 $\mu\text{моль фотонов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$;
- г) между 50 и 75 $\mu\text{моль фотонов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$;
- д) между 500 и 600 $\mu\text{моль фотонов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$?

4. Какой из ответов ниже правильно описывает уровень фотосинтеза у адаптированного к солнцу листа:

- а) 12 $\mu\text{моль } O_2 \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$;
- б) 15 $\mu\text{моль } O_2 \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$;
- в) 30 $\mu\text{моль } O_2 \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$;
- г) между 250 и 600 $\mu\text{моль фотонов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$;
- д) больше чем 600 $\mu\text{моль фотонов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$?

2.2. УЧАСТИЕ ПРОЦЕССОВ ФОТОМОРФОГЕНЕЗА В ФОРМИРОВАНИИ ЭЛЕМЕНТОВ ПРОДУКТИВНОСТИ

Свет – самый важный экзогенный сигнал, который контролирует развитие растительного организма. На всех стадиях своего роста растения получают и используют световую информацию и энергию из окружающей среды. Поглощение света растением – сложный внутримолекулярный физический процесс, в котором важны волновая и квантовая природа света. С одной стороны, поглощение света – результат взаимодействия электронного облака молекулы (белка-фоторецептора, фотосинтетического пигмента) с электрическим вектором световой волны, с другой – свет в растении поглощается молекулами определенными дозами – квантами за время около 10^{-14} с или менее. Поэтому молекула белка-фоторецептора или фотосинтетического пигмента может поглощать только кванты света, энергиям которых соответствуют тождественные энергетические емкости этой молекулы.

С течением эволюции формирование растительного организма проходило под влиянием света Солнца, в спектре излучения которого огромный диапазон длин волн. Однако преобладающим (44–50 %) в спектре энергии Солнца, достигающей поверхности Земли, оказывается излучение в диапазоне 380–750 нм – наиболее важная для растений ФАР. ФАР включает фиолетовый (380–430 нм), синий (430–490 нм), зеленый (490–570 нм), желтый (570–600 нм), оранжевый (600–620 нм), красный (620–700), дальний красный (700–750 нм) диапазоны. Волны этого диапазона поглощаются фотосинтетическими пигментами и/или основными белками – фоторецепторами растения, поэтому ФАР активирует и регулирует процессы фотоморфогенеза и фотосинтеза.

Преимущества использования ФАР в фоторецепции растения еще и в том, что она имеет оптимальную энергию (1–3 эВ). Излучение более длинноволновой области (инфракрасной) несет меньшее количество энергии (0,01–0,1 эВ) и способно вызвать только изменение уровней колебательной и вращательной энергий. Короткие волны (ультрафиолет, рентген) обладают слишком большой энергией (5–10 эВ) и могут повреждать биологические структуры.

Чувствительность растений к свету в данных ключевых диапазонах обеспечивается фотоморфогенетическими реакциями с участием фоторецепторных систем. У *Arabidopsis thaliana* в настоящее время насчитывают по меньшей мере 14 фоторецепторов: пять фитохромов (PhyA–E), три криптохрома (CRY1–3), два фототропина (PHOT1,

PHOT2), три белка семейства ZEITLUPE (ZTL, FKF1, LKP2) и рецептор УФ-В UVR8. Фоторецепция у большинства растений происходит с помощью по крайней мере трех фоторецепторных систем: фитохромной, криптохромной и системы фототропинов.

Фоторецепторы локализованы в ядре и/или в цитоплазме, характеризуются низким КПД энергопреобразования, сильно изменяющейся конформацией белковых комплексов. Воспринимает свет отдельный фоторецепторный комплекс, который связан с системой вторичных медиаторов, усиливающих и преобразующих полученный световой сигнал. Поэтому фоторецепторы являются высокочувствительными системами. Несколько квантов света достаточно, чтобы запустить фотобиологическую реакцию.

Фотоморфогенетические реакции воздействуют на сложные физиологические и биохимические процессы в растении, благодаря им модулируется активность фотосинтеза, роста и развития. На каждом этапе онтогенеза потребности растения в количестве и качестве света меняются, а при определенном освещении стимуляция одной функции может сопровождаться ингибированием другой. Информацию о функционировании и эффектах фоторецепторных систем в настоящее время уже используют при разработке регламентов LED-освещения растений в закрытом грунте.

Задание 1

В следующих вопросах выберите правильные ответы (их может быть несколько).

1. Для световых реакций фотоморфогенеза характерны:

- 1) низкая чувствительность к свету;
- 2) высокая чувствительность к свету;
- 3) низкий КПД энергопреобразования;
- 4) высокий КПД энергопреобразования;
- 5) мало меняющаяся конформация белковых комплексов;
- 6) сильно меняющаяся конформация белковых комплексов.

а) 1, 3, 5; б) 1, 4, 5; в) 2, 4, 6; г) 2, 3, 6.

2. С точки зрения функционально-физиологической классификации фотобиологических реакций фотоморфогенетические относятся:

- а) к энергетическим;
- б) к информационным;

- в) к биосинтетическим;
- г) к деструктивно-модифицирующим.

3. К фоторецепторам растений, регулирующим интенсивность фотосинтеза и роста, относят:

- 1) криптохромы;
- 2) фитохромы;
- 3) фототропины;
- 4) хлорофиллы;
- 5) антоцианы;
- 6) суперхром;
- 7) фитогормоны.

- а) 1, 2, 3, 5; б) 1, 2, 4, 5; в) 1, 2, 3, 6; г) 2, 4, 6, 7.

4. Фоторецептором с двумя взаимно превращающимися формами является:

- а) фитохром;
- б) фикоцианобилин;
- в) криптохром;
- г) фототропин.

5. Восприятие растениями чередования дня и ночи (явление фотопериодизма) опосредуется системами:

- а) фитохрома и фототропина;
- б) криптохрома и суперхрома;
- в) фитохрома и криптохрома;
- г) криптохрома и фототропина.

6. Развитие ФСА (экспрессия генов, кодирующих ряд ключевых фотосинтетических белков, биосинтез пигментов, биогенез хлоропластов) контролируется системами:

- а) фитохрома и фототропина;
- б) криптохрома и суперхрома;
- в) фитохрома и криптохрома;
- г) криптохрома и фототропина.

7. Ключевым параметром освещения для запуска таких фотоморфогенетических ответов, как прорастание семян, замедление роста побега в длину, развитие листовых пластинок, биогенез хлоропластов, является:

- а) интенсивность светового потока;
- б) направленность светового потока;
- в) продолжительность светового дня.

8. Регулируя длину светового дня в замкнутой экосистеме, контролируют:

- 1) прорастание семян;
- 2) накопление биомассы;
- 3) образование цветков;
- 4) созревание плодов;
- 5) образование запасяющих органов.

- | | |
|----------|----------|
| а) 1, 3; | г) 1, 4; |
| б) 2, 4; | д) 2, 5. |
| в) 3, 5; | |

9. К короткодневным (согласно классификации по отношению к длине светового дня) относятся растения:

- а) для прорастания которых необходима смена коротких дней на длинные;
- б) для цветения которых необходима смена коротких дней на длинные;
- в) для ускорения накопления биомассы которых необходима смена коротких дней на длинные;
- г) для прорастания которых необходима смена длинных дней на короткие;
- д) для цветения которых необходима смена длинных дней на короткие;
- е) для ускорения накопления биомассы которых необходима смена длинных дней на короткие.

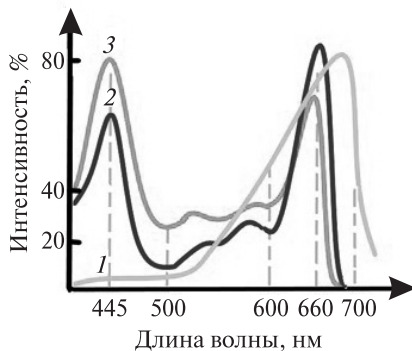
10. С точки зрения функционально-физиологической классификации фотобиологических реакций фотосинтез относится к реакциям:

- а) энергетическим;
- б) информационным;
- в) биосинтетическим;
- г) деструктивно-модифицирующим.

11. Из перечисленных процессов не является фотоморфозом:

- а) поглощение кванта света молекулой хлорофилла;
- б) активация биосинтеза хлорофилла;
- в) ингибирование роста гипокотыля;
- г) влияние света на полярность клеток;
- д) синтез антоцианов.

12. На рисунке показана зависимость интенсивности некоторых процессов от длины волны (кривые 1, 2, и 3).



Среди этих процессов:

- 1) синтез хлорофилла;
- 2) синтез каротиноидов;
- 3) фотосинтез;
- 4) фотоморфогенез;
- 5) фотофосфорилирование.

- а) 1 – 1, 2 – 2, 3 – 3;
- б) 1 – 1, 2 – 2, 3 – 5;
- в) 1 – 3, 2 – 1, 3 – 5;

- г) 1 – 1, 2 – 3, 3 – 4;
- д) 1 – 4, 2 – 3, 3 – 1.

13. Фотопериодизм – это реакция растительного организма:

- а) на изменение содержания хлорофилла при различном освещении;
- б) на переключение при фотосинтезе транспорта электронов с нециклического на циклический;
- в) на фотофосфорилирование, сопряженное с циклическим транспортом электронов;
- г) на изменение длины светового дня;
- д) на изменение температуры.

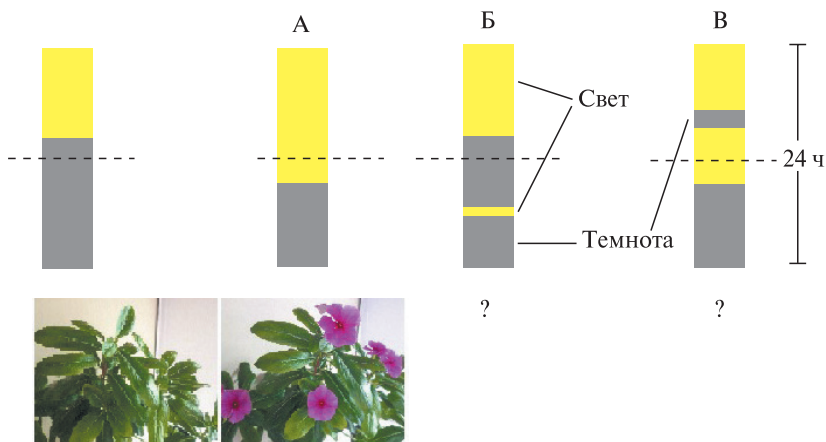
14. В 1881 г. Ч. Дарвин, исследуя явление фототропизма, показал, что экран из бихромата калия полностью снимает эффект фототропизма у растений. Оказалось, что этот экран не пропускает свет:

- а) красный;
- б) желтый;
- в) зеленый;
- г) синий;
- д) фиолетовый.

15. При освещении листьев растения *Mimosa pudica* естественным белым светом они выглядят обычным образом. Через 30 мин после перехода от белого света к темноте части листа второго порядка *Mimosa pudica* закрываются. В эксперименте непосредственно после окончания освещения белым светом листочки освещали в каждом случае в течение 2 мин в определенном порядке красным (К) светом с длиной волны 660 нм и/или дальним красным (ДК) светом с длиной волны 730 нм. Выберите варианты освещения, при которых листочки закрывались.

- а) К;
- б) ДК;
- в) К, ДК;
- г) К, ДК, К;
- д) К, ДК, К, ДК;
- е) К, ДК, К, ДК, К.

16. Переход к цветению можно вызвать, регулируя развитие апикальной меристемы. Меристема побега может (часто благодаря внешним факторам) перейти в меристему цветка и образовать его органы. В эксперименте цветение растений индуцировали уменьшением длительности темнового периода в течение суток (А).



Выберите верные утверждения:

- а) эти растения амфифотопериодичны;
- б) если создать световой режим, препятствующий цветению этих растений, а затем прервать темновой период короткой вспышкой света (Б), то эти растения зацветут;

в) если прервать световой период кратковременным затемнением (В), это стимулирует флоральную функцию;

г) если вместо светового режима изменить температурный – понизить температуру на несколько дней до 5 °С, это стимулирует цветение этих растений;

д) температурный фактор может стимулировать цветение этих растений, но температуру нужно повысить до 30 °С.

Задание 2

На схеме представлены результаты экспериментов по индукции цветения растения *Xanthinum strumarium* (светлые части – световой период, темные – темнота; К – красный свет, ДК – дальний красный свет – режимы освещения в период короткой вспышки света).



Определите правильные ответы и внесите их буквенное обозначение в таблицу.

1. Данное растение является:

- а) короткодневным;
- б) длиннодневным;
- в) растением нейтрального дня.

2. На схеме представлены физиологические доказательства участия:

- а) фитохромной системы;
- б) криптохромной системы;
- в) системы фототропинов;
- г) ни одна из систем не участвует.

3. Критический для цветения темновой период составляет:

- а) 6 ч;
- б) 10 ч;
- в) 12 ч;
- г) 15 ч.

Номер вопроса	Правильный ответ
1	
2	
3	

На схеме видно, что в одном из вариантов темновой период был прерван дополнительным коротким освещением:

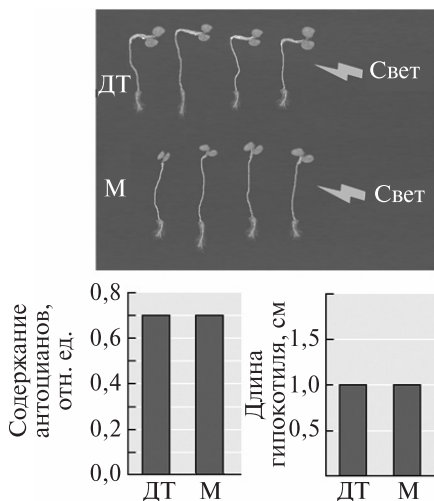
- 1) К;
- 2) ДК;
- 3) К-ДК;
- 4) К-ДК-К;
- 5) К-ДК-К-ДК.

Определите, при каком режиме растение будет цвести, а при каком вегетировать. Используя знак «✓», отметьте в таблице правильное соответствие.

Режим освещения	Цветет	Вегетирует
1		
2		
3		
4		
5		

Задание 3

На рисунке представлена реакция на свет проростков *Arabidopsis thaliana* (дикого типа (ДТ) и мутантов (М)). В этих же проростках определено содержание антоцианов и измерена длина гипокотыля. Выберите верные утверждения:



- а) проростки освещали белым светом;
- б) длина волны света, используемого для освещения, равнялась 450 нм;
- в) длина гипокотыля и содержание антоцианов в проростках не зависят от освещения;
- г) наблюдаемую реакцию проростков на свет можно отнести к процессам фотоморфогенеза;
- д) последующее освещение дальним красным светом будет ингибировать наблюдаемую реакцию;
- е) на рисунке показаны криптохромдефицитные мутанты;
- ж) в исследованных мутантах не будет наблюдаться светозависимого движения хлоропластов.

2.3. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ ОСНОВЫ ПРИМЕНЕНИЯ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА

В процессы роста и развития растений можно вмешиваться с помощью различных регуляторов роста – биологически активных соединений. Регулятор роста – молекула химической природы, обладающая сигнальной функцией, – первичный медиатор в системе сигнальной трансдукции. Основой их применения является воздействие на регуляторные механизмы клетки на генетическом и метаболическом уров-

нях с целью более полной реализации генетической информации для формирования высокой продуктивности культур. Реализация генетической информации в значительной мере определяется системой эндогенной регуляции (комплекса эндогенных первичных медиаторов, механизмов сигнальной трансдукции и межклеточной регуляции), формирование которой происходит под действием внешних факторов. Регуляторы роста, интегрируя комплекс функционально связанных процессов, влияют на формирование, морфогенез, развитие и в конечном счете продуктивность растений.

Понимание механизмов действия регуляторов роста и особенно фитогормонов на клеточном уровне является чрезвычайно важным для формирования представления о том, как в целом функционирует растительный организм. Несмотря на значительные достижения в исследовании биосинтеза, деградации, импорта и экспорта фитогормонов, окончательной ясности в вопросе их действия нет. Тем не менее установлено, что обычно основные этапы трансдукции сигнала регулятора роста описываются как рецепция → каскад сигнальной трансдукции → физиологический ответ и характеризуются основными закономерностями, свойственными процессам сигнальной трансдукции в растениях.

Поэтому регуляторы роста растений являются мощными рычагами, с помощью которых можно управлять сигнальными механизмами клетки, переключать метаболизм растения на принципиально новое направление, усиливать какую-то отдельную функцию, вызывать гибель растения или делать его более жизнеспособным.

Чтобы более успешно решать задачи сельскохозяйственного производства, необходимы детальные исследования механизмов действия эндогенных регуляторов, постоянный поиск, химический синтез синтетических БАВ с узкофункциональными свойствами и высокой специфичностью. В растениеводстве остается еще много проблем, успешное решение которых в ближайшее время, по-видимому, будет возможным только с помощью биологически активных регуляторов роста.

Задание 1

В следующих вопросах выберите правильные ответы (их может быть несколько).

1. Управлять процессами роста растений человек научился, еще ничего не зная о различных фитогормонах. Он обнаружил, что удаление верхушки растения (апикальной меристемы) приводит к стимуляции роста

боковых побегов. Впоследствии было установлено, что это связано с изменением уровня синтеза:

- а) абсцизовой кислоты;
- б) ауксина;
- в) brassinosteroida;
- г) gibberellina;
- д) цитокинина;
- е) этилена.

2. Стимуляцию укоренения черенков осуществляют обработкой раствором:

- 1) абсцизовой кислоты;
- 2) gibberelloвой кислоты;
- 3) индолилмасляной кислоты;
- 4) гидразида малеиновой кислоты.

- а) 1, 3;
- б) 2, 4;
- в) 3, 4;
- г) 1, 4.

3. Для получения партенокарпических (бессемянных) плодов в защищенном грунте используют:

- а) хлорхлинхлорид;
- б) трихлорфеноуксусную кислоту;
- в) gibberellin;
- г) тиомочевину.

4. Рост стебля стимулируется или ингибируется ауксином в соответствующих концентрациях:

- а) 10^{-10} М и 10^{-9} М;
- б) 10^{-9} М и 10^{-8} М;
- в) 10^{-5} М и 10^{-3} М;
- г) 10^{-5} М и 10^{-2} М.

5. Для ускорения созревания плодов используют:

- а) индолилуксусную кислоту;
- б) абсцизовую кислоту;
- в) gibberelloвую кислоту;
- г) этилен;
- д) эпибрасинолид.

6. Для получения низкорослых растений используют регуляторы, тормозящие биосинтез:

- 1) gibberellinov;
- 2) ауксинов;
- 3) абсцизовой кислоты;
- 4) brassinosteroidov.

- а) 1, 2;
- б) 1, 3;
- в) 2, 4;
- г) 1, 4.

7. При появлении на пути проростка под землей механического препятствия (камня) стимулируется синтез:

- а) абсцизовой кислоты;
- б) ауксина;
- в) brassinosterоида;
- г) гиббереллина;
- д) цитокинина;
- е) этилена.

8. В результате эксперимента алейроновый слой зерновки ячменя был разрушен. Было выявлено, что такие семена неспособны к прорастанию. Какая из приведенных ниже процедур запустит процесс прорастания таких зерновок:

- а) замачивание в воде, содержащей 10 % сахарозы;
- б) обработка раствором абсцизовой кислоты;
- в) обработка семян ферментом амилазой;
- г) обработка семян гиббереллином?

9. Какой фитогормон является биохимическим маркером корня растений, синтезируется в корнях и транспортируется по растению снизу вверх с ксилемным током пассивно и неполярно:

- а) цитокинин;
- б) α -нафтилуксусная кислота;
- в) гиббереллин;
- г) абсцизовая кислота?

10. Открытие цитокининов произошло благодаря ошибке экспериментаторов. До 1950-х гг. получить культуры растительных клеток не удавалось. После ряда безуспешных попыток (добавление в среду экстракта дрожжей, томатного сока и т. д.) учеными была выдвинута версия о том, что растительным клеткам не хватает ДНК. В результате какой ошибки экспериментаторов был открыт первый растительный гормон цитокининовой природы:

- а) по ошибке были добавлены компоненты среды для культур клеток животных;
- б) был нарушен режим автоклавирования;
- в) в среду культивирования случайно попал комар;
- г) ошиблись с концентрацией используемых растворов для культивирования?

11. Какой фитогормон вызывает листопад, ускоренное созревание плодов, замедление роста в длину, утолщение проростков и неразгибающуюся апикальную петельку:

- а) абсцизовая кислота;
- б) индолилуксусная кислота;
- в) жасминовая кислота;
- г) этилен?

12. В каких физиологических процессах не участвуют ауксины:

- а) тропизмы;
- б) циркадные процессы;
- в) процессы апикального доминирования;
- г) растяжение клеток и аттрагирующие эффекты?

13. Для объяснения механизма роста растительных клеток путем растяжения существует гипотеза «кислого роста». Какое вещество, согласно этой теории, принимает участие в запуске данного механизма:

- а) фитохром;
- б) ауксин;
- в) ферредоксин;
- г) цитокинин?

14. На плантациях некоторых каучуконосных растений необходимо предотвращать затверждение латекса, так как приходится заново делать насечки на стволах деревьев. Чем обрабатывают такие растения, чтобы избежать этого явления:

- а) стимуляторами синтеза этилена;
- б) ингибиторами синтеза этилена;
- в) гипертоническим раствором солей;
- г) ауксинами?

15. На рисунке представлена фотография недифференцированной ткани растения, культивируемой на искусственной агаризованной среде. Какие химические факторы, добавленные в среду культивирования, и в каком соотношении стимулируют данный тип роста:



- а) цитокинин и брассиностероид (1 : 2);
- б) гиббереллин и этилен (2 : 1);
- в) цитокинин и ауксин (2 : 1);
- г) ауксин и цитокинин (1 : 1)?

16. Какие из перечисленных соединений нельзя отнести к фитогормонам:

- а) зеатин;
- б) brassinolid;
- в) фитохром;
- г) gibberellin acid?

17. Цветение ананасов можно регулировать. Например, на плантациях Кубы ананасы раньше поливали карбидной водой, а на Гавайских островах среди ананасов расставляли емкости с нефтепродуктами и поджигали. Какое вещество кубинцы и гавайцы получали вышеуказанными методами для обработки ананасов на плантациях, чтобы они зацвели одновременно:

- а) ацетилен;
- б) этилен;
- в) сероводород;
- г) диоксид углерода?

18. Недостатком какого из фитогормонов обусловлено раннее прорастание семян:

- а) жасминовая кислота;
- б) этилен;
- в) абсцизовая кислота;
- г) ауксин?

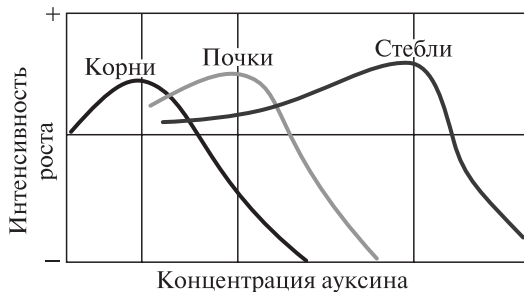
19. Какие вещества применяют для ускорения созревания плодов:

- а) defolianty;
- б) оксикоричные кислоты;
- в) цитокинины;
- г) этилен?

20. Следующие десять утверждений относятся к данным, представленным на графике. Выберите те из них, которые подтверждаются данными этого графика:

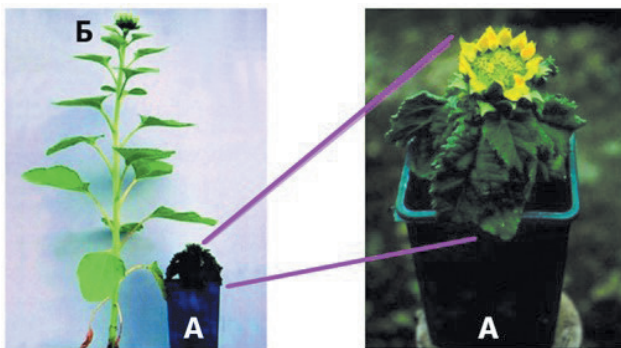
- 1) ауксин не влияет на рост стеблей;
- 2) ауксины не влияют на рост корней;
- 3) корни реагируют на ауксины иначе, чем почки;
- 4) корни реагируют на различные ауксины не так, как стебли;
- 5) корни выделяют ауксины и таким образом защищают себя;
- 6) высокая концентрация ауксинов стимулирует рост корня;
- 7) рост стебля всегда ускоряется при добавлении ауксинов;

- 8) рост корня стимулируется меньшим количеством ауксина, чем рост стебля;
 9) рост корня опережает рост стебля;
 10) рост корня ускоряется ростом стебля.



- а) 3, 8; б) 1, 2, 6, 7; в) 4, 5, 9, 10; г) 3, 6, 10.

21. Были получены карликовые мутанты – растения, в которых не происходит биосинтез одного из фитогормонов (растение А). В результате экзогенной обработки этим фитогормоном у них была обнаружена стимуляция ростовых процессов (растение Б). Какие из утверждений являются верными.



(по Cecconi F. et al., 2002)

- а) такую ростовую реакцию вызвала обработка ауксином;
 б) фитогормон, которым были обработаны растения, стимулирует закрытие устьиц при засухе;
 в) этот фитогормон является антагонистом ауксина при нарушении апикального доминирования;

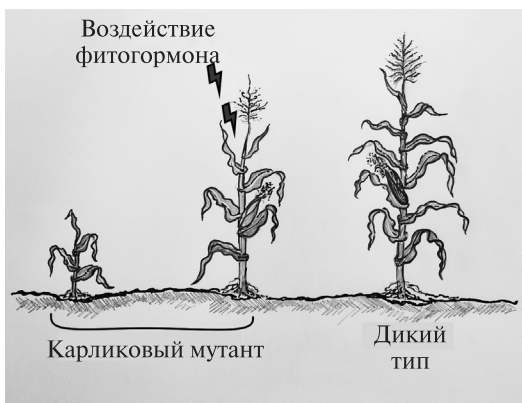
г) фитогормоны этой группы были открыты как болезнетворный фактор гриба, поражающего растения;

д) этот фитогормон не отвечает за образование апикальной петли у проростков;

е) синтетические аналоги этого фитогормона используются как дефолианты;

ж) с помощью этого фитогормона можно стимулировать цветение растений.

22. На рисунке показана ростовая реакция проростка карликового мутанта кукурузы (в котором не происходит синтез одного из фитогормонов) на добавление этого фитогормона.



В результате экзогенной обработки этим фитогормоном происходит стимуляция как клеточного роста, так и клеточного деления, в итоге — растяжение междоузлий. Дефицит какого фитогормона наблюдается в карликовых мутантах и какие еще эффекты для него характерны:

а) ауксин;

б) цитокинин;

в) гиббереллин;

г) стимулирует прорастание клубней картофеля и вызывает партенокарпию у томата;

д) ингибирует прорастание клубней картофеля и вызывает партенокарпию у томата;

е) стимулирует закладку боковых корней и рост главного корня;

ж) ингибирует закладку боковых корней и стимулирует рост главного корня?

2.4. СИГНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ

К растениям как биообъектам производства предъявляют ряд требований, среди которых высокие продуктивность и качество, экологические стабильность и пластичность. Важными становятся также экологичность и эффективность производства. Исследования с целью поиска мишеней биотехнологической регуляции продуктивности растений сегодня проводят на всех уровнях: молекулярном, клеточном, организменном, ценоотическом, экосистемном. Условия внешней среды выступают как факторы, индуцирующие систему саморегуляции растительной клетки. Эти воздействия воспринимаются с помощью сигнальных систем в клетках-мишенях, передаются и реализуются в других клетках и тканях в результате изменения генетических, биохимических и физиологических программ роста и развития растения. В результате в растении возникают быстрые и медленные реакции. При этом на основе сбора информации от всех клеток организма происходит интеграция и централизация систем регуляции и итоговый ответ растения на внешние воздействия.

Как уже упоминалось, рост и развитие любого растения определяются его генетическими особенностями и при этом управляются не только эндогенными процессами. Напротив, на развитие куда больше влияют внешние факторы в рамках генетически определенной нормы реакции. Внешние условия оказывают на рост как прямое, так и косвенное воздействие. Последнее связано с тем, что скорость роста зависит от многих физиологических процессов: фотосинтеза и минерального питания, водного и энергетического обменов. Существование организма возможно в конкретных границах действия того или иного фактора между зонами минимума и максимума – в зоне оптимума. Все факторы, влияющие на развитие растений, находятся в тесной взаимосвязи, и один может ослаблять или усиливать действие остальных. Например, изменение температуры почвы может существенно влиять на поглощение воды и элементов минерального питания; увеличение интенсивности освещения способствует усилению дыхания; рост концентрации питательных веществ снижает транспирацию и т. д. Полноценный рост и развитие растений определяются оптимальным соотношением внешних факторов.

Существование растений зависит от их способности оптимизировать процесс своего развития, быстрой адаптации к изменениям условий окружающей среды. Данная способность, как правило, ре-

ализуется на клеточном уровне, где перерабатывается информация, поступающая из внешней среды. Трансформация различных сигналов химической или физической природы в биологический эффект в клетке получила название трансдукции. Она осуществляется с помощью различных медиаторов, которые усиливают и передают сигнал от входа к конечной мишени. Роль таких медиаторов (вторичных мессенджеров) играют вещества, представляющие собой за редким исключением низкомолекулярные биологически активные химические соединения. В клетке работают десятки медиаторов, входящих в состав цепочек, посредством которых реализуются процессы передачи сигнала. Часто говорят о функционировании в клетке разветвленной сети трансдукции.

В ряде сигнальных путей для трансформации стимулов в реакцию используются циклические мононуклеотиды (цГМФ, цАМФ), фосфоинозитиды и ионы кальция. Ионизированный кальций (Ca^{2+}) – универсальный медиатор сигнальной трансдукции в животных и растительных системах всех уровней организации, имеющий важное полифункциональное значение для процессов роста и развития. Ca^{2+} участвует в регуляции транскрипции и трансляции многих генов, тем самым опосредуя действие различных внешних сигналов на внутриклеточный метаболизм через генетический аппарат клетки. Как правило, Ca^{2+} действует в комплексе с регуляторным белком кальмодулином. Многие стимулы химической и физической природы опосредуются изменением внутриклеточной концентрации ионов кальция. Приток ионов кальция в цитоплазму может осуществляться вследствие открытия Ca^{2+} -каналов на плазматической мембране и последующего входа Ca^{2+} в клетку по градиенту концентрации или выброса иона в цитоплазму из внутриклеточных депо. Описан широкий спектр кальциевых ответов, различающихся амплитудой, временным и пространственным разрешением, по которым клетка, возможно, дифференцирует получаемые извне сигналы. Увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ можно регистрировать с помощью кальциевых микроэлектродов, флуоресцентных зондов, а также используя Ca^{2+} -чувствительные фотопротейины. Участие ионов кальция предполагается во многих процессах внутриклеточной сигнализации, например, в трансдукции световых сигналов через фитохром или рецептор синего света, опосредовании действия фитогормонов, механического воздействия или температурных изменений. В трансдукцию большинства стимулов, кроме Ca^{2+} , включаются и другие медиаторы.

Со времени открытия системы фосфоинозитидов получены доказательства ее присутствия в большинстве, если не во всех эукариотических клетках. Влияние продуктов метаболизма фосфоинозитидов (ИФ₃ и ДГ) на изменение внутриклеточной концентрации Ca²⁺ позволяет системе фосфоинозитидов занимать одно из центральных мест в трансдукции внешних сигналов в клетках.

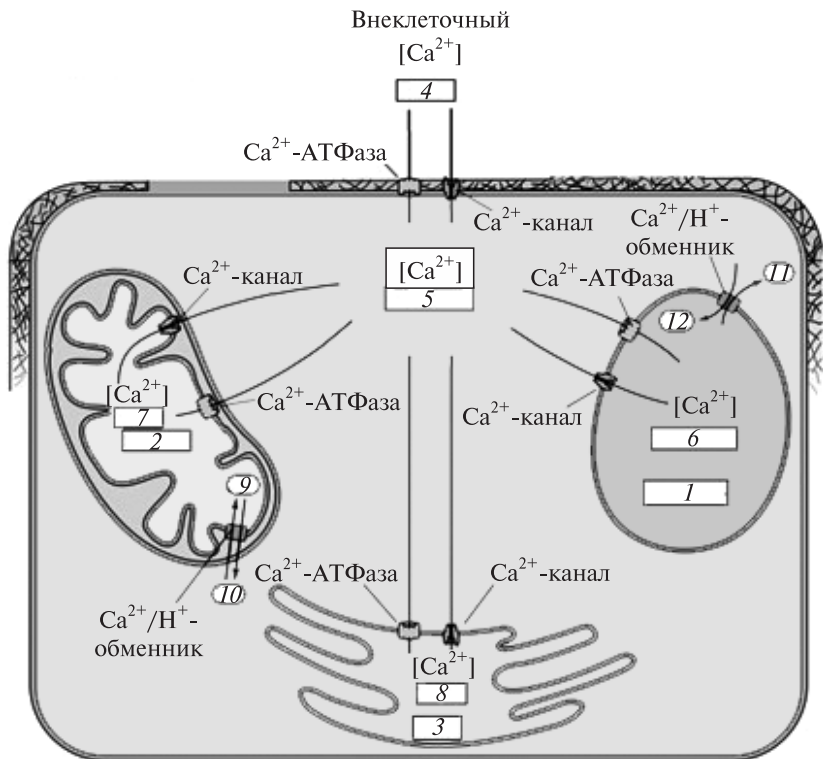
Одна из важнейших функций цГМФ в животных системах и в первую очередь у позвоночных — его медиаторная роль в процессах зрительной трансдукции в палочках сетчатки, которую он осуществляет, контролируя катионную проницаемость натриевых каналов в плазматической мембране фоторецепторной клетки. Участие цАМФ в качестве универсального модулятора внутриклеточного метаболизма однозначно показано у животных, бактерий и водорослей. цАМФ опосредует действие гормонов и других биологически активных соединений, не проникающих внутрь клетки, у прокариот участвует в индукции синтеза ряда ферментов, подверженных катаболитной репрессии. Установлена также взаимосвязь между концентрациями цАМФ и Ca²⁺ в клетке. цАМФ либо прямо, либо через протеинкиназу А регулирует проницаемость катионных каналов для кальция. Увеличение [Ca²⁺]_{цитр} в свою очередь, стимулирует активность внутриклеточных ферментов метаболизма циклического мононуклеотида, различных типов фосфодиэстераз и аденилатциклаз. Что касается растительных клеток, то пока имеются лишь косвенные доказательства присутствия в них циклических мононуклеотидов. Показано, например, что цГМФ участвует в регуляции фитохромзависимой экспрессии генов. Использование растениями Ca²⁺ и цГМФ в процессах фитохромной фототрансдукции представляет собой интересную эволюционную параллель с фоторецепторными механизмами в клетках сетчатки позвоночных. Системы метаболизма и функционирование в растительной клетке цГМФ и цАМФ активно изучаются. В последнее время также большое внимание уделяется исследованиям медиаторной роли АФК в процессах сигнальной трансдукции в растительных клетках.

Задание 1

Ответьте на следующие вопросы.

1. С использованием Ca²⁺-чувствительных флуоресцентных зондов было определено содержание свободных ионов кальция и их распределение внутри растительной клетки. Рассмотрите рисунок, на котором

$[Ca^{2+}]$ – концентрация свободного кальция. Идентифицируйте структуры, обозначенные соответствующими номерами.



(по Trewavas A., 2000)

А. Подпишите внутриклеточные органеллы (1–3), являющиеся основными кальциевыми депо.

- 1 – _____
 2 – _____
 3 – _____

Б. Выберите из предложенных значений (0,0001 мМ, 1 мМ, 1–10 мМ) концентрацию свободного кальция, которая была определена в соответствующей внутриклеточной структуре и вне клетки (4–8).

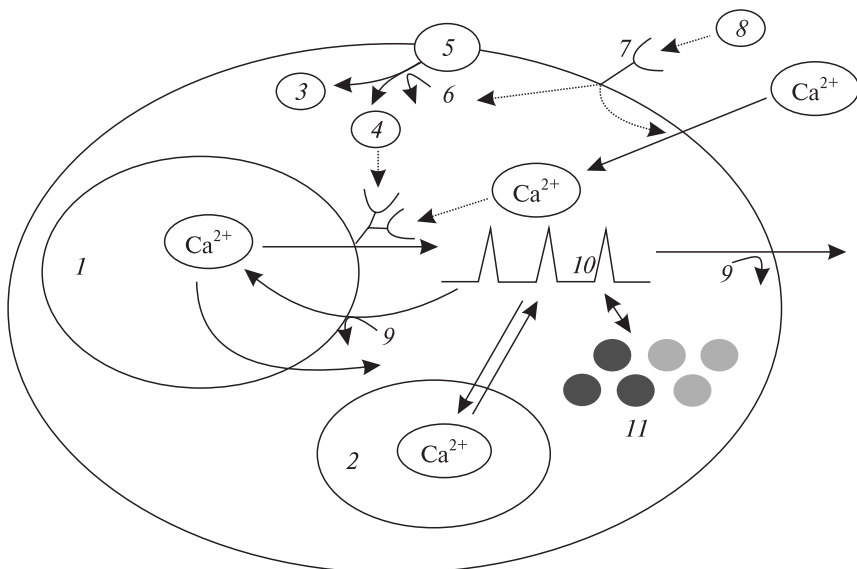
- 4 – _____ 7 – _____
 5 – _____ 8 – _____
 6 – _____

В. В каком направлении $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -обменники транспортируют Ca^{2+} и H^{+} ? Ca^{2+} или H^{+} должны быть указаны вместо номеров 9–12? Обозначьте соответствующие ионы (9–12).

- 9 – _____
 10 – _____
 11 – _____
 12 – _____

Г. В каком направлении Ca^{2+} -АТФазы и Ca^{2+} -каналы транспортируют Ca^{2+} ? На самом рисунке дорисуйте стрелки (8 стрелок), чтобы указать направление.

2. Многие внешние сигналы, действующие на растительную клетку, стимулируют рост цитоплазматической концентрации Ca^{2+} , используя этот ион как вторичный медиатор в процессах сигнальной трансдукции. На рисунке показаны основные этапы Ca^{2+} -зависимой трансдукции при действии на растения многих внешних стимулов.



Сопоставьте элемент трансдукции с его функцией и обозначением на рисунке. Заполните таблицу, вставляя буквенные и цифровые обозначения правильных вариантов.

Возможные участники Ca^{2+} -зависимой сигнальной трансдукции:

- а) АТФ;
- б) внешний стимул (сигнальная молекула);
- в) диацилглицерол;
- г) инозитол-1,4,5-трифосфат;
- д) митохондрия;
- е) рецептор внешнего стимула на плазматической мембране;
- ж) фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфат;
- з) фосфолипаза С;
- и) эндоплазматический ретикулум;
- к) Ca^{2+} -осцилляции;
- л) Ca^{2+} -связывающие регуляторные белки-мишени.

Функции основных участников Ca^{2+} -зависимой сигнальной трансдукции:

I – вторичный медиатор, стимулирующий открытие Ca^{2+} -каналов;
II – вторичный медиатор, стимулирующий открытие Ca^{2+} -чувствительных Ca^{2+} -каналов;

III – первичный медиатор, запускающий сигнальную трансдукцию;

IV – регуляция транспортной системы, восстанавливающей низкое содержание Ca^{2+} в цитоплазме;

V – предшественник вторичного медиатора;

VI – фермент, катализирующий синтез вторичных медиаторов, регулирующих Ca^{2+} -каналы;

VII – определение чувствительности клетки к внешнему стимулу, может активировать регуляторные ГТФ-связывающие белки плазматической мембраны;

VIII – специфичный Ca^{2+} -сигнал;

IX – стимуляция каскадов фосфорилирования/дефосфорилирования различных функциональных белков;

X – Ca^{2+} -депо.

Обозначение на схеме	Элемент сигнальной трансдукции	Функция
1		
2		
3		
4		

Окончание таблицы

Обозначение на схеме	Элемент сигнальной трансдукции	Функция
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		

3. Установите соответствия (отметьте знаком «✓»)

Стимулы	Открытие устьиц	Закрывание устьиц
Синий свет		
Зеленый свет		
Абсцизовая кислота		
Индолилуксусная кислота		
Низкая концентрация CO ₂ в замыкающих клетках		
Высокая концентрация CO ₂ в замыкающих клетках		

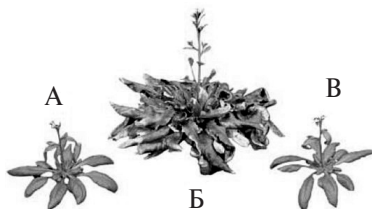
4. Какие из перечисленных соединений являются АФК, стимулирующими механизмы адаптации растений к стрессовым факторам?

- а) H₂O₂;
- б) H₂O;
- в) NO;
- г) H₂NO₃;
- д) •OH – гидроксильный радикал;
- е) ONOO⁻ – пероксинитритный анион;
- ж) активные формы кислорода только повреждают клеточные структуры, не являясь регуляторными молекулами.

5. Выберите из перечисленных вариантов способы защиты растительной клетки от абиотических и биотических стрессоров:

- а) синтез белков теплового шока;
- б) синтез фенольных соединений;
- в) синтез и активация антиоксидантных ферментов;
- г) синтез функциональных макромолекул и регуляторных белков;
- д) синтез защитных макромолекул – осмолитов.

6. В результате экспериментов с растениями *Arabidopsis thaliana* была обнаружена связь между экспрессией гена FLC (*FLOWERING LOCUS C*), способностью меристемы переходить к закладке соцветия и эффектами, наблюдаемыми при вернализации. Рассмотрите рисунок и выберите верный вариант ответа.



<https://www.europeanmedical.info/floral-stimulus/vernalization>

- а) растение А зацвело после длительного периода роста при низкой положительной температуре;
- б) растение Б зацвело после длительного периода роста при низкой положительной температуре;
- в) растение В, FLC-дефицитный мутант, зацвело только в результате вернализации;
- г) в растениях А и В обнаружен максимальный уровень мРНК FLC;
- д) повышенный уровень экспрессии гена FLC обнаружен только у растения Б.

2.5. ИННОВАЦИОННЫЕ ПОДХОДЫ К ОРГАНИЗАЦИИ ИСКУССТВЕННОГО ОСВЕЩЕНИЯ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ РАСТЕНИЙ

В XX в. сооружение устройств защищенного грунта приняло промышленные масштабы. Защищенным грунтом называют сооружения и земельные участки, в которых инженерными средствами, иногда с возможностью регуляции природных факторов, создается искус-

ственный микроклимат для культивирования растений. Защищенный грунт включает несколько видов культивационных сооружений разной степени сложности. Самым сложным из них является фитотрон – полностью замкнутая система.

Фитотрон – это комплекс для выращивания растений, где можно по желанию в нескольких камерах управлять одновременно и независимо друг от друга факторами внешней среды таким образом, чтобы анализировать в отдельности влияние каждого фактора и их взаимодействие, регулировать рост и развитие растений в соответствии с поставленной задачей. Чаще всего в таких климатических комплексах регулируют температуру и длительность освещения. Другие экологические факторы (влажность, спектральный состав света, содержание CO_2 , имитацию движения воздуха или дождя, корневое минеральное питание и т. д.), если нужно, можно регулировать в специальных камерах. Фитотроны – очень дорогие установки, поэтому они строятся для определенной программы исследований или же для достижения специфической цели. Научное и практическое значение культивирования растений в замкнутых регулируемых условиях обусловлено целым рядом причин и целей, среди которых:

1) исследование взаимодействия растений с окружающей средой, что позволит совершенствовать управление их продуктивностью;

2) решение проблем круглогодичного, независимого от климатических флуктуаций промышленного производства растительной продукции;

3) ускорение селекционного процесса;

4) культивирование декоративных растений для повышения комфортабельности помещений в условиях, исключающих использование естественного света или значительно его ограничивающих (например, кают ниже ватерлинии);

5) создание замкнутой биологической системы жизнеобеспечения, в которой растения будут первичным компонентом регенерации атмосферы, воды и важным источником продовольствия.

Разработка и применение современных биотехнологических методов для культивирования растений и создание регулируемой агроэкосистемы невозможно без детального исследования влияния факторов внешней среды на онтогенез растения и объяснения механизмов восприятия, преобразования внешних сигналов в физиологический ответ растения. За два столетия физиология растений накопила огромный объем знаний по физико-химической организации, интеграции и регуляции функциональных систем растительного организма и стала

теоретической основой высокоэффективного современного растениеводства, обеспечивая теоретическую базу для всех систем культивирования растений.

При выращивании растений в защищенном грунте основное внимание должно уделяться их фотосинтетической и фотоморфогенетической активности, так как в итоге именно они определяют количество и качество продукции. Рост и развитие растений в онтогенезе зависят от интенсивности (количество излучения, приходящееся на единицу площади за единицу времени), дозы (суммарное количество излучения на протяжении промежутка времени или этапа жизни) и длины волны излучения (энергии электромагнитной волны). Для роста и развития растений важными являются все части спектра ФАР, а также соотношение между ними. Необходимо растению и мягкое УФ-излучение.

Главная техническая задача любого тепличного бизнес-хозяйства – круглогодичное обеспечение оптимальных климатических условий для выращивания растительной продукции. А одним из основополагающих факторов микроклимата, влияющих на урожайность, является свет.

Хотя полупроводниковая светотехника развивается уже несколько десятилетий, ее потенциал в качестве эффективной альтернативы традиционным источникам освещения еще до конца не реализован. Сегодня светодиоды уже широко применяются в промышленном, уличном, офисном, бытовом и другом освещении. Однако их пока не удастся широко использовать для досветки или полностью искусственного освещения растений в тепличных хозяйствах. В последние годы с внедрением доступных по цене светодиодных технологий, позволяющих получить световой поток высокой интенсивности, появилась возможность их полноценного использования и для промышленного культивирования растений.

Повышенный интерес к использованию светодиодов во многом обусловлен тем, что они могут излучать свет любой длины волны, в том числе ближнего УФ- и ДК-диапазона. Общеизвестным является факт, что светодиодное освещение позволит выйти на новый уровень развития растениеводства защищенного грунта. LED-освещение позволит увеличить урожайность, ускорить накопление вегетативной биомассы, цветение и созревание плодов, стимулировать укоренение и прорастание. Источники света на основе светодиодов сегодня являются перспективным инструментом для управления ростом и развитием растений (рис. 2.1).



Рис. 2.1. Регуляция процессов морфогенеза с использованием LED-излучения

Многие исследования показали, что LED-облучатели можно использовать для повышения продуктивности культур. Создав оптимальный спектр освещения, регулируя системы фотосинтеза и фотоморфогенеза, можно управлять биохимическими процессами – биосинтезом первичных и вторичных метаболитов; модулировать морфоструктуры, формирование корневой системы, боковых побегов и листовой пластинки; активировать прорастание семян, цветение и плодоношение, такие адаптивные реакции, как транспирация, устойчивость растения к стрессовым факторам, работу антиоксидантных систем.

Особенности LED-излучения позволяют не только заменить инновационными энергоэффективными источниками света традиционно используемые люминесцентные и натриевые газоразрядные лампы, но и в соответствии с потребностями конкретного вида растения

на новом уровне регулировать продуктивность, накопление в растительном сырье продуктов первичного и вторичного метаболизма, тем самым повышая качество, экологическую безопасность, увеличивая сроки получения и хранения продукции.

Задание 1

В следующих вопросах выберите правильные ответы (их может быть несколько).

1. К замкнутым регулируемым вегетативным установкам относятся:

- | | |
|-------------------|---------------|
| 1) фитотрон; | 4) оранжерея; |
| 2) климатокамера; | 5) теплица. |
| 3) клиностат; | |
| а) 1, 2, 3, 4, 5; | г) 1, 2; |
| б) 1, 2, 3, 4; | д) 1. |
| в) 1, 2, 3; | |

2. Клиностат – это:

- а) замкнутая вегетационно-климатическая установка;
- б) закрытое сооружение с искусственно созданным климатом для культивирования растений;
- в) специальная стеклянная переносная конструкция с автономными условиями увлажнения;
- г) комплекс для культивирования растений, в котором можно регулировать одновременно и независимо факторы внешней среды;
- д) специальная конструкция для культивирования растений в условиях микрогравитации.

3. При культивировании овощных культур в условиях защищенного грунта оптимальной экологической концентрацией CO_2 в воздушно-газовой среде является величина в диапазоне:

- | | |
|---------------------|---------------------|
| а) 30–150 мкл/л; | г) 2000–5000 мкл/л; |
| б) 300–500 мкл/л; | д) 5000–7000 мкл/л. |
| в) 1000–2000 мкл/л; | |

4. Температурный оптимум фотосинтеза для C_4 -растений относительно высок. Он равен:

- | | |
|--------------|--------------|
| а) 15–25 °С; | г) 45–50 °С; |
| б) 25–30 °С; | д) 50–60 °С. |
| в) 30–45 °С; | |

5. Для обеспечения максимального накопления биомассы в единицу времени и оптимальной фотосинтетической активности используют следующий диапазон ФАР:

- а) 15–30 Вт/м²;
- б) 150–220 Вт/м²;
- в) 450–730 Вт/м².

6. Избыточная интенсивность излучения в сооружениях защищенного грунта приводит:

- а) к повышению концентрации вкусовых веществ;
- б) к уменьшению скорости роста;
- в) к образованию рыхлых и нестабильных тканей;
- г) к огрубению листьев;
- д) к образованию истонченных листьев и длинных стеблей.

7. К источникам света, позволяющим получить селективное излучение с высоким энергетическим выходом в оптическом диапазоне, относятся:

- а) металлогалогенные лампы;
- б) ксеноновые лампы;
- в) люминесцентные лампы;
- г) кварцевые галогенные лампы.

8. К основным физиологическим ответам растения на механическую стимуляцию относятся:

- а) уменьшение скорости роста;
- б) увеличение скорости роста;
- в) увеличение толщины клеточной стенки;
- г) уменьшение толщины клеточной стенки;
- д) индукция синтеза этилена.

9. Клетки корневой системы, отвечающие за восприятие изменения в напряженности гравитационного поля, находятся в зоне:

- а) корневых волосков;
- б) элонгации;
- в) меристемы;
- г) корневого чехлика.

10. В условиях защищенного грунта обогащение воздуха углекислым газом ускоряет:

- а) при недостатке освещения и пониженной температуре – нарастание вегетативной массы;
- б) при достаточном освещении и благоприятной температуре – развитие генеративных органов;

в) при недостатке освещения и пониженной температуре – развитие генеративных органов;

г) при достаточном освещении и благоприятной температуре – нарастание вегетативной массы.

11. Яровизация – это явление стимуляции при низкой положительной температуре процесса:

а) прорастания семян;

б) удлинения гипокотилия;

в) цветения;

г) образования плодов;

д) созревания плодов.

12. Регуляцию градиента дневной и ночной температур при культивировании растений используют для получения:

а) компактных декоративных растений;

б) декоративных растений с уменьшенным размером листовой пластинки;

в) растений с измененной пигментацией.

13. Применение при культивировании растений в замкнутых системах DROП-метода означает:

а) длительное выращивание растений при отрицательном суточном температурном градиенте;

б) выращивание растений при положительном суточном температурном градиенте;

в) кратковременное снижение температуры в конце светового дня до субоптимальных значений;

г) кратковременное снижение температуры в начале светового дня до субоптимальных значений.

ТЕМЫ ДЛЯ РЕФЕРАТОВ И ТВОРЧЕСКИХ СООБЩЕНИЙ

1. Особенности питания растений при гидропонных методах культивирования.

2. Влияние интенсивности и спектрального состава света на синтез вторичных метаболитов.

3. Использование светодиодов при культивировании растений.

4. Способы стимуляции цветения высших растений.

5. Влияние избыточной интенсивности излучения на фотосинтетический аппарат.

6. Организация корнеобитаемой среды в условиях микрогравитации.

7. История изучения фоторецепции в синей области спектра.

8. Фоторецепция и физиологическая роль красного света в растении.

9. Системы сигнальной трансдукции в растительной клетке.

10. Роль кальция как универсального медиатора сигнальной трансдукции в процессах роста и развития растений.

11. Участие цАМФ в качестве универсального модулятора внутриклеточного метаболизма.

12. Стрессоустойчивость. Получение стресс-толерантных трансгенных растений.

13. Метод биологического контроля за ростом и формированием элементов продуктивности злаков.

14. Основные направления исследований при создании трансгенных растений с повышенной продуктивностью.

15. Клеточные и молекулярные механизмы действия цитокининов в растениях.

16. Физиологические эффекты ауксинов.

17. Роль гиббереллинов в процессе прорастания семян.

18. Применение гормональных регуляторов роста в растениеводстве.

19. Роль негормональных регуляторов роста в растениеводстве.
20. Способы стимуляции партенокарпических плодов.
21. Эффективность фотосинтеза и перспективы повышения продуктивности культурных растений.
22. Зависимость эффективности фотосинтеза от концентрации CO_2 .
23. Роль яровизации в продуктивности растений.
24. Связь фотоморфогенеза с процессами фотосинтеза.
25. Фотоморфогенетические реакции растений.
26. Функциональная организация, научное и практическое значение фитотрона.
27. Клеточные технологии как перспективное направление биотехнологии растений.
28. Растения как биореакторы.
29. Перспективы развития тепличного хозяйства в Республике Беларусь.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Веселов, С. Ю. Использование антител для количественного определения, очистки и локализации регуляторов роста растений : автореф. дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.04 / С. Ю. Веселов ; Башкир. гос. мед. ун-т. – Уфа, 1998. – 50 с.

Владимиров, Ю. А. Физико-химические основы фотобиологических процессов : учеб. пособие / Ю. А. Владимиров, А. Д. Потапенко. – М. : Высш. шк., 1989. – 199 с.

Гавриленко, В. Ф. Большой практикум по фотосинтезу : учеб. пособие / В. Ф. Гавриленко, Т. В. Жигалова. – М. : Академия, 2003. – 256 с.

Генетика развития растений : учебник / Л. А. Лутова [и др.] ; под ред. С. Г. Инге-Вечтомова. – 2-е изд., перераб. и доп. – СПб. : Н-Л, 2010. – 432 с.

Генетические основы селекции растений. Общая генетика растений : в 2 т. / А. В. Кильчевский [и др.]. – Минск : Белорус. наука, 2008. – Т. 2. – 551 с.

Гормоны растений: регуляция концентрации, связь с ростом и водным обменом / Д. С. Веселов [и др.]. – М. : Наука, 2007. – 158 с.

Джамеев, В. Ю. Внутриклеточный сигналинг у растений : учеб. пособие / В. Ю. Джамеев. – Харьков : АССА, 2015. – 224 с.

Иммуноферментная система для определения цитокининов / Г. Р. Кудоярова [и др.] // Физиология растений. – 1990. – Т. 37. – С. 193–199.

Кефели, В. И. Методы определения регуляторов роста и гербицидов / В. И. Кефели, Р. Х. Турецкая ; под ред. Ю. В. Ракитина. – М. : Наука, 1966. – 198 с.

Козловская, И. П. Корнеобитаемая среда в защищенном грунте / И. П. Козловская. – Минск : Технопринт, 2002. – 512 с.

Конев, С. В. Фотобиология / С. В. Конев, И. Д. Волоотовский. – Минск : БГУ, 1979. – 385 с.

Круг, Г. Овощеводство / Г. Круг. – М. : Колос, 2000. – 532 с.

Кузнецов, В. В. Физиологические механизмы адаптации и создание стресс-толерантных трансгенных растений / В. В. Кузнецов // Купревичские чтения VII «Проблемы экспериментальной ботаники» : сб. ст. / Ин-т эксперимент. ботаники НАН Беларуси ; отв. ред. Н. А. Ламан. – Минск, 2009. – С. 5–78.

Кулаева, О. Н. Новейшие достижения в изучении механизма действия фитогормонов / О. Н. Кулаева, О. С. Прокопцева // Биохимия. – 2004. – Т. 69. – С. 293–310.

Кулаева, О. Н. Новейшие достижения и перспективы в области изучения цитокининов / О. Н. Кулаева, В. В. Кузнецов // Физиология растений. – 2002. – Т. 49. – С. 626–640.

Куперман, Ф. М. Морфофизиология растений / Ф. М. Куперман. – М. : Высш. шк., 1977. – 288 с.

Мокроносков, А. Т. Онтогенетический аспект фотосинтеза / А. Т. Мокроносков. – М. : Наука, 1981. – 196 с.

Пильщикова, Н. В. Физиология растений с основами микробиологии / Н. В. Пильщикова. – М. : Мир, 2004. – 184 с.

Рокицкий, П. Ф. Введение в статистическую генетику / П. Ф. Рокицкий. – Минск : Вышэйшая школа, 1974. – 448 с.

Романов, Г. А. Как цитокинины действуют на клетку / Г. А. Романов // Физиология растений. – 2009. – Т. 56. – С. 295–319.

Сельскохозяйственная биотехнология и биоинженерия : учебник / В. С. Шевелуха [и др.] ; под ред. В. С. Шевелухи. – 4-е изд., перераб. и доп. – М. : Ленанд, 2015. – 704 с.

Тарчевский, И. А. Сигнальные системы клеток растений / И. А. Тарчевский. – М. : Наука, 2002. – 294 с.

Тихомиров, А. А. Светокультура растений: биофизические и биотехнологические основы : учеб. пособие / А. А. Тихомиров, В. П. Шарупич, Г. М. Лисовский. – Новосибирск : Сибир. отд-ние РАН, 2000. – 389 с.

Фотосинтез и биопродуктивность: методы определения / Дж. М. О. Скерлок [и др.] ; пер. с англ. Н. Л. Гудскова [и др.] ; под ред. и с предисл. А. Т. Мокроноскова, А. Г. Ковалева. – М. : Агропромиздат, 1989. – 460 с.

Чиков, В. И. Эволюция представлений о связи фотосинтеза с продуктивностью растений / В. И. Чиков // Физиология растений. – 2008. – Т. 55. – С. 140–154.

The sunflower dwarf mutant dw1: effect of gibberellic acid treatment / F. Cecconi [et al.] // HELIA. – 2002. – № 36. – P. 161–166.

Biochemistry & Molecular Biology of Plants / A. Trevaas [et al.] // American Society of Plant Physiologists – Signal Perception and Transduction. – 2000. – Ch. 18. – P. 930–978.

Biostimulants research in some horticultural plant species – A review / N. Paradiković [et al.] // Food and energy security. – 2019. – Vol. 8, iss. 2.

Husen, A. Carbon and fullerene nanomaterials in plant system / A. Husen, K. S. Siddiqi // J. of Nanobiotechnology. – 2014. – Vol. 12. – P. 16–26.

Plant cell and tissue culture : in 6 vol. / ed.: J. W. Pollard, J. M. Walker. – Humana Press, 1990. – Vol. 6: Methods in molecular biology. – 597 p.

Rao, R. S. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites / R. S. Rao, G. A. Ravishankar // Biotechnology Advances. – 2002. – Vol. 20. – P. 101–153.

Verpoorte, R. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites / R. Verpoorte, A. Contin, J. Memelink // Phytochemistry Review. – 2002. – Vol. 1. – P. 13–25.

Zaytseva, O. Carbon nanomaterials: production, impact on plant development, agricultural and environmental applications / O. Zaytseva, G. Neumann // Chemical and Biological Technologies in Agriculture. – 2016. – Vol. 3, № 1. – P. 17–43.

СОДЕРЖАНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ	3
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	8
РАЗДЕЛ 1. ЛАБОРАТОРНЫЕ ЗАНЯТИЯ	9
<i>Лабораторная работа 1.</i> Влияние условий культивирования растений на интенсивность флуоресценции хлорофилла в листьях	9
<i>Лабораторная работа 2.</i> Определение фитогормонподобной активности регуляторных препаратов с помощью биотестов	21
<i>Лабораторная работа 3.</i> Распределение цитокининов в корне под действием гипотермии и освещения различного спектрального состава	29
<i>Лабораторная работа 4.</i> Активность амилазы в прорастающих семенах и участие в этом процессе гиббереллина	35
<i>Лабораторная работа 5.</i> Оценка цитотоксичности наночастиц <i>in vitro</i> с использованием культур растительных тканей	40
<i>Лабораторная работа 6.</i> Участие вторичных медиаторов в светозависимых реакциях растений	47
<i>Лабораторная работа 7.</i> Участие H_2O_2 и ионов кальция в трансдукции гравитационного стимула	53
<i>Лабораторная работа 8.</i> Влияние света на накопление продуктов первичного и вторичного метаболизма в листьях и культуре <i>in vitro</i> катарантуса розового	60
<i>Лабораторная работа 9.</i> Антиоксидантная активность экстрактов лекарственных растений	68

РАЗДЕЛ 2. ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ И КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ СТУДЕНТОВ	73
2.1. Фотосинтез и продуктивность растений	73
2.2. Роль процессов фотоморфогенеза в формировании элементов продуктивности	84
2.3. Молекулярные и клеточные основы применения регуляторов роста	92
2.4. Сигнальная регуляция развития растений	100
2.5. Инновационные подходы к организации искусственного освещения при культивировании растений	107
ТЕМЫ ДЛЯ РЕФЕРАТОВ И ТВОРЧЕСКИХ СООБЩЕНИЙ	114
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	116

Учебное издание

Молчан Ольга Викторовна
Филиппова Светлана Николаевна

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ ОСНОВЫ
РЕГУЛЯЦИИ ПРОДУКТИВНОСТИ
КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ**

Учебно-методическое пособие

Редактор *О. В. Лысковец*
Художник обложки *Т. Ю. Таран*
Технический редактор *В. П. Явуз*
Компьютерная верстка *О. В. Гасюк*

Подписано в печать 25.10.2021. Формат 60×84/16. Бумага офсетная.
Цифровая печать. Усл. печ. л. 6,97. Уч.-изд. л. 7,10.
Тираж 40 экз. Заказ 322.

Белорусский государственный университет.
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/270 от 03.04.2014.
Пр. Независимости, 4, 220030, Минск.

Республиканское унитарное предприятие
«Издательский центр Белорусского государственного университета».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 2/63 от 19.03.2014.
Ул. Красноармейская, 6, 220030, Минск.