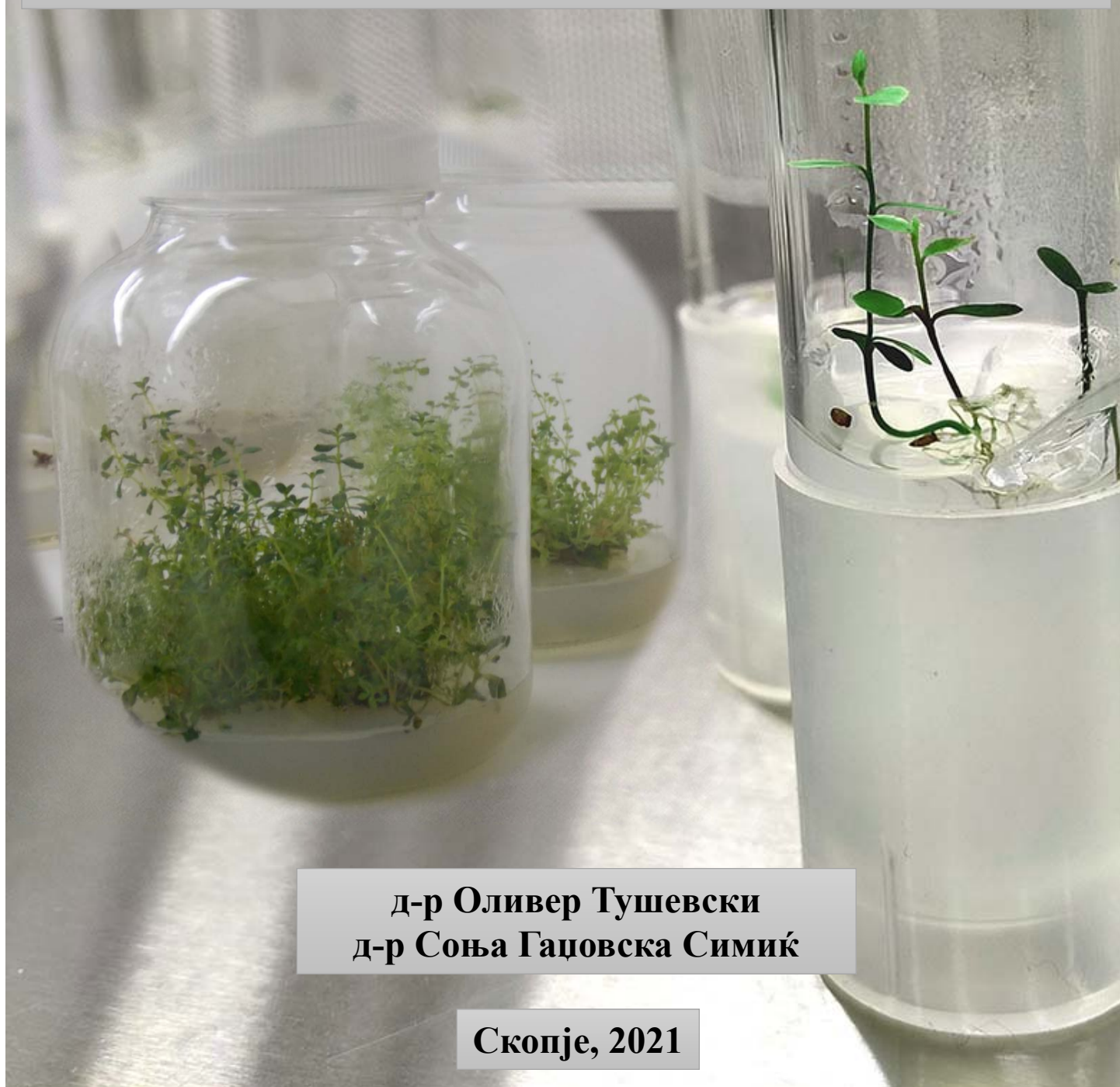


Универзитет „Св. Кирил и Методиј“-Скопје
Природно-математички факултет
Институт за биологија
Лабораторија за растителни *in vitro* култури

**ИНТЕРНА СКРИПТА ПО
ФИЗИОЛОГИЈА НА РАЗВИТОК НА РАСТЕНИЈАТА**



д-р Оливер Тушевски
д-р Соња Гацовска Симиќ

Скопје, 2021

СОДРЖИНА

1. ВОВЕД.....	4
1.1 Растителни хормони (фитохормони)	4
1.2 Растителни регулатори на растот	6
2. АУКСИНИ.....	8
2.1 Откривање на ауксините	8
2.2 Природни и синтетски ауксини	9
2.3 Физички и хемиски својства на ауксини	10
2.4 Конјугација и деградација на ауксини	10
2.5 Дистрибуција на ауксини кај растенијата.....	11
2.6 Биосинтеза на ауксини	12
2.6.1 Триптофан-зависни патишта.....	13
2.6.2 Триптофан-независни патишта.....	14
2.7 Транспорт на ауксини.....	15
2.7.1 Инфлукс на ауксини	16
2.7.2 Ефлукс на ауксини	16
2.7.3 Хемиосмотски модел за транспорт на ауксини.....	17
2.8 Физиолошко дејство на ауксини	19
2.8.1 Екстензија или елонгација на клетки (хипотеза на киселински раст)	19
2.8.2 Апикална доминација	21
2.8.3 Индукција на латерални и адвентивни корени.....	24
2.8.4 Одложување на абсцисија на листови	25
2.8.5 Развоток на цветни пупки	26
2.8.6 Стимулирање на развоток на плодови	26
2.8.7 Диференцијација на васкуларни ткива	27
2.9 Влијание на ауксини кај растителни <i>in vitro</i> култури.....	28
2.9.1 Стабилност на ауксини во хранлив медиум	28
2.9.2 Ефект на синтетските ауксини врз содржината на IAA	28
2.9.3 Примање и метаболизам на ауксини кај растителни <i>in vitro</i> култури	29
2.9.4 Влијание на ауксини врз раст на калусни култури.....	29
2.9.5 Влијание на ауксини врз култури на органи	30
2.9.6 Влијание на ауксини врз соматска ембриогенеза	30
3. ЦИТОКИНИНИ	31
3.1 Откривање на цитокинините	31
3.2 Природни и синтетски цитокинини	31
3.3 Биотестови за докажување на активноста на цитокинините	33
3.4 Биосинтеза на цитокинини.....	33
3.5 Транспорт на цитокинини	34
3.6 Конјугација и деградација на цитокинини	34
3.7 Физиолошко дејство на цитокинини.....	36
3.7.1 Клеточна делба.....	36
3.7.2 Регулација на клеточниот циклус.....	37
3.7.3 Морфогенеза и формирање на латерални пупки	38
3.7.4 Одложување на сенесценција на листови.....	39
3.8 Влијание на цитокинини кај растителни <i>in vitro</i> култури.....	40
3.8.1 Синтетски аналози на цитокинини.....	40
3.8.2 Антагонисти на цитокинини	41
3.8.3 Ефект на цитокинини врз раст и морфогенетски процеси	42
3.8.4 Интеракција помеѓу ауксини и цитокинини	43
4. ГИБЕРЕЛИНИ	45
4.1 Структура и класификација на гиберелини.....	45
4.2 Биосинтеза на гиберелини.....	46
4.3 Инхибитори на биосинтезата и дејството на гиберелините.....	49

4.4	Регулација на биосинтезата на гиберелини	49
4.5	Ауксините стимулираат биосинтеза на гиберелини	49
4.6	Физиолошко дејство на гиберелини	50
4.6.1	Стимулирање на елонгација на клетки и клеточна делба	50
4.6.2	Елонгација на интернодии и регулација на јувенилноста	51
4.6.3	Иницијација на цветови и детерминација на пол	52
4.6.4	Ртење на семе	52
4.6.5	Формирање на плодови	52
4.7	Механизам на дејство на гиберелини	53
4.8	Влијание на гиберелини кај растителни <i>in vitro</i> култури	54
4.8.1	Формирање на адвентивни изданоци	54
4.8.2	Ризогенеза	55
4.8.3	Ембриогенеза и развој на ембриони	55
4.8.4	Микропагација на растенија	55
5.	АБСЦИСИНСКА КИСЕЛИНА	56
5.1	Откривање на абсцисинска киселина	56
5.2	Структура на абсцисинска киселина	56
5.3	Биотестови за докажување на дејството на абсцисинска киселина	57
5.4	Биосинтеза, катаболизам и хомеостаза на абсцисинска киселина	57
5.5	Транслокација на абсцисинска киселина	59
5.6	Физиолошко дејство на абсцисинска киселина	60
5.6.1	Одбранбена улога на абсцисинска киселина при стрес фактори	60
5.6.2	Развој на семе	61
5.6.3	Толерантност кон десикација (сушење или дехидратација)	61
5.6.4	Дорманција на семе	61
5.6.5	Инхибиција на предвремено ртење и вивипарија	63
5.6.6	Дорманција на пупки	63
5.6.7	Антагонистичко дејство на АВА врз гиберелини	64
5.6.8	Затворање на стоми при воден стрес	64
5.6.9	Стимулирање на раст на корени и инхибиција на изданоци при воден стрес	64
5.7	Механизам на дејство на абсцисинска киселина врз затворање на стомите	65
5.8	Влијание на абсцисинска киселина врз растителни <i>in vitro</i> култури	67
5.8.1	Раст на калусни култури	67
5.8.2	Формирање на адвентивни изданоци и корени	67
5.8.3	Ембриогенеза	67
6.	ЕТИЛЕН	69
6.1	Откривање на етилен	69
6.2	Споредба на етилен и негасовити фитохормони	70
6.3	Биотестови за докажување на дејство на етилен и анализа на мутанти	70
6.4	Биосинтеза на етилен	71
6.5	Инхибитори на биосинтезата и дејството на етилен	73
6.6	Физиолошко дејство на етилен	74
6.6.1	Зреење на плодови	74
6.6.2	Епинастија на листови	75
6.6.3	Индукција на латерална експанзија на клетки	76
6.6.4	Прекинување на дорманција на пупки и семиња	77
6.6.5	Формирање на адвентивни корени и коренови влакненца	77
6.6.6	Сенесценција на листови	77
6.6.7	Абсцисија на листови	78
6.7	Влијание на етилен кај растителни <i>in vitro</i> култури	79
6.7.1	Продукција на етилен во <i>in vitro</i> услови	79
6.7.2	Акумулација на етилен во садови за култивирање	80
6.7.3	Ефект на етилен кај растителни <i>in vitro</i> култури	80
7.	БРАСИНОСТЕРОИДИ	82

7.1 Биосинтеза и транспорт на брасиностероиди.....	82
7.2 Физиолошко дејство на брасиностероиди.....	83
7.2.1 Свиткување на листови кај треви.....	83
7.2.2 Регулација на фотоморфогенеза.....	84
7.2.3 Други физиолошки ефекти.....	84
7.3 Мутанти за брасиностероиди.....	84
7.3.1 Брасинолид-сензитивни мутанти со нарушена биосинтеза на брасиностероиди.....	84
7.3.2 Брасиностероид-несензитивни мутанти (<i>bri</i>).....	85
7.4 Влијание на брасиностероиди кај растителни <i>in vitro</i> култури.....	85
8. ПОЛИАМИНИ.....	86
8.1 Дистрибуција на полиамини кај растенијата.....	86
8.2 Хомеостаза на полиамини.....	87
8.3 Биосинтеза на полиамини.....	87
8.4 Катаболизам на полиамини.....	88
8.5 Физиолошко дејство на полиамини.....	89
8.5.1 Јонски интеракции.....	90
8.5.2 Интеракција на полиамини со други фитохормони.....	90
8.5.3 Улога на полиамини во интеракции на растенијата со микроорганизми.....	91
8.5.4 Полиамини како сигнални молекули во одбранбени одговори на растенијата.....	91
8.6 Влијание на полиамини кај растителни <i>in vitro</i> култури.....	92
9. ЈАСМОНСКА КИСЕЛИНА.....	93
9.1 Биосинтеза на јасмонска киселина.....	93
9.2 Метаболизам и хомеостаза на јасмонска киселина.....	94
9.3 Физиолошко дејство на јасмонати.....	96
9.3.1 Инхибирање на раст.....	96
9.3.2 Формирање на трихоми.....	96
9.3.3 Развиток на цветови.....	96
9.3.4 Стимулирање на продукција на секундарни метаболити.....	96
9.3.5 Сенесценција на листови.....	96
9.3.6 Одбранбен одговор кон хербивори.....	97
9.3.7 Одбранбен одговор кон патогени организми.....	97
10. САЛИЦИЛНА КИСЕЛИНА.....	98
10.1 Биосинтеза на салицилна киселина.....	98
10.2 Физиолошко дејство на салицилна киселина.....	100
10.2.1 Инхибиција на сенесценција.....	100
10.2.2 Регулација на термогенеза.....	100
10.2.3 Системска стекната резистентност.....	101

1. ВОВЕД

Растителните организми имаат способност да перцепираат голем број надворешни сигнали и да реагираат на промените во животната средина преку различни одговори кои се поврзани со развитокот, морфогенезата и физиолошките процеси. Растенијата реагираат на надворешните сигнали преку биосинтеза на голем број соединенија со различна хемиска структура кои ја олеснуваат меѓуклеточната комуникација и влијаат врз различни аспекти од растот и развитокот. Кај вишите растенија, регулацијата на метаболизмот, растот и морфогенезата зависат од транспортот и редистрибуцијата на сигнални соединенија во различни делови од растителниот организам. Во XIX-тиот век, германскиот ботаничар Julius von Sachs покажал дека некои хемиски медијатори се одговорни за иницијацијата на растот на различни растителни органи. Подоцна било откриено дека овие медијатори или сигнални молекули ги преведуваат сигналите од животната средина во соодветни одговори на раст и развиток. Кај анималните системи и прокариотите биле откриени различни сигнални молекули кои биле идентификувани како хормони. Терминот **хормон** за прв пат бил користен пред околу стотина години во медицината како стимулативен фактор. Хормоните биле дефинирани како биолошки соединенија кои се продуцираат во специфични ткива, а потоа се транспортираат до оддалечени клетки со цел да индуцираат специфичен физиолошки одговор.

1.1 Растителни хормони (фитохормони)

Растителните хормони (фитохормони) се дефинираат како група на ендогени органски соединенија кои при многу ниски концентрации имаат регулаторна функција врз растот, развитокот и различни физиолошки процеси кај растенијата. Биосинтезата на фитохормоните се одвива во различни растителни органи или клеточни компартмани, а нивното дејство се остварува на местото на продукција или до оддалечени целни ткива. Во најголем број случаи, фитохормоните се синтетизираат во меристеми, листови и плодови во стадиум на развиток. Во зависност од нивната концентрација, растителните хормони можат да имаат негативни ефекти врз развитокот на растенијата. Исто така, антагонистичките и синергистичките интеракции помеѓу различните фитохормони дополнително ја зголемуваат комплексноста на дејството на фитохормоните кај растенијата. Некои фитохормони имаат способност да влијаат врз биосинтезата на други фитохормони или да интерферираат во нивните сигнални патишта на дејство. Фитохормоните можат да индуцираат различни одговори во различни ткива или во различен стадиум од развитокот на едно исто ткиво. Важно е да се напомене дека растителните ткива се разликуваат во сензитивноста кон фитохормоните, односно развитокот на ткивата зависи од соодветна концентрацијата на специфични фитохормони во одреден стадиум на развиток.

Постојат 5 главни класи на растителни регулатори на растот, како што се:

- **ауксини,**
- **citoкенини,**
- **гиберелини,**
- **етилен,**
- **абсцисинска киселина.**

Во последните децении се откриени други класи на соединенија кои се сметаат како растителни хормони, како **брасиностероиди, јасмонска киселина, салицилна киселина, олигосахарини и системин**. Исто така, некои липо-олигосахариди и хито-олигосахариди кои имаат потекло од микроорганизмите се сметаат како растителни

регулатори на растот, биејќи растителните клетки поседуваат специфични рецептори за овие соединенија.

Зависно од биосинтетското потекло, фитохормоните можат да се поделат во 4 групи:

- Прва група на фитохормони кои потекнуваат од изопреноидниот метаболизам се **цитокинини, гиберелини, брасиностероиди и абсцисинска киселина (Сл. 1.1)**.
- Втора група на фитохормони кои потекнуваат од аминокиселините се ауксини (**индол-3-оцетна киселина**) со потекло од триптофан, **етилен** кој се синтетизира од метионин и **полиамини** со потекло од аргинин или орнитин (Сл. 1.2).
- Трета група на фитохормони кои потекнуваат од липидите е **јасмонска киселина** која се синтетизира од α -линолеинска киселина.
- Четврта група на фитохормони кои потекнуваат од фенилпропаноидниот метаболизам е **салицилна киселина**.



Слика 1.1 Регулатори на растот кои потекнуваат од аминокиселини.



Слика 1.2 Регулатори на растот кои потекнуваат од изопреноидниот метаболизам.

1.2 Растителни регулатори на растот

Растителните регулатори на растот се широка категорија на соединенија кои вклучуваат синтетски аналози на фитохормоните, инхибитори на биосинтезата на хормони и блокатори на некои хормонски рецептори. Регулаторите на растот може да се дефинираат како синтетски соединенија кои индуцираат слични физиолошки ефекти кај растенијата како и фитохормоните. Растителните регулатори на растот се соединенија кои на директен и специфичен начин интерферираат со дејството на природните хормонски системи кај растенијата. Некои природни фитохормони се добиваат на синтетски начин или преку процесите на ферментација и се достапни во комерцијална форма. Според тоа, сите комерцијални соединенија кои егзогено се аплицираат кај растенијата се означени како растителни регулатори на растот.

Ауксините и цитокинините се најзначајни и најчесто користени соединенија кои ги регулираат растот и морфогенезата кај културите на растителни ткива и органи. Синтетските ауксини и цитокинини покажуваат еднаква или повисока биолошка активност во споредба со природните фитохормони. Важно е да се напомене дека не постојат алтернативни синтетски соединенија како замена за гиберелините и абсцисинската киселина. Егзогената апликација на етиленот како гас тешко се контролира во растителните *in vitro* култури. Затоа е неопходно садовите за култивирање на растителните ткива и органи да бидат цврсто затворени. Алтернативни соединенија кои се користат како замена за етиленот се некои други алкени и алкини како ацетилен и пропилен. Некои синтетски соединенија кои се искористуваат од растенијата можат да се хидролизираат, при што настанува ослободување на етилен од растителните ткива. Така на пр., соединението **етефон** или **етрел** (2-хлоретанфосфонска киселина) се користи како регулатор на растот кај растителни култури поради способноста на растителните ткива за негово метаболизирање и ослободување на етилен.

Регулацијата на ендегената содржина на регулатори на растот преку одржување на **хомеостаза** има големо значење врз растот и развитокот на растенијата. Всушност, хомеостазата спречува настанување на промени во концентрацијата на регулаторите на растот. Постојат бројни механизми преку кои растенијата ја регулираат интрацелуларната концентрација на регулаторите на растот. Големо значење имаат позитивните и негативните регулаторни процеси кои придонесуваат за одржување на интрацелуларната концентрација на регулаторите на растот (Сл. 1.3).



Слика 1.3 Механизми за одржување на хомеостазата на растителните регулатори на растот во растителната клетка.

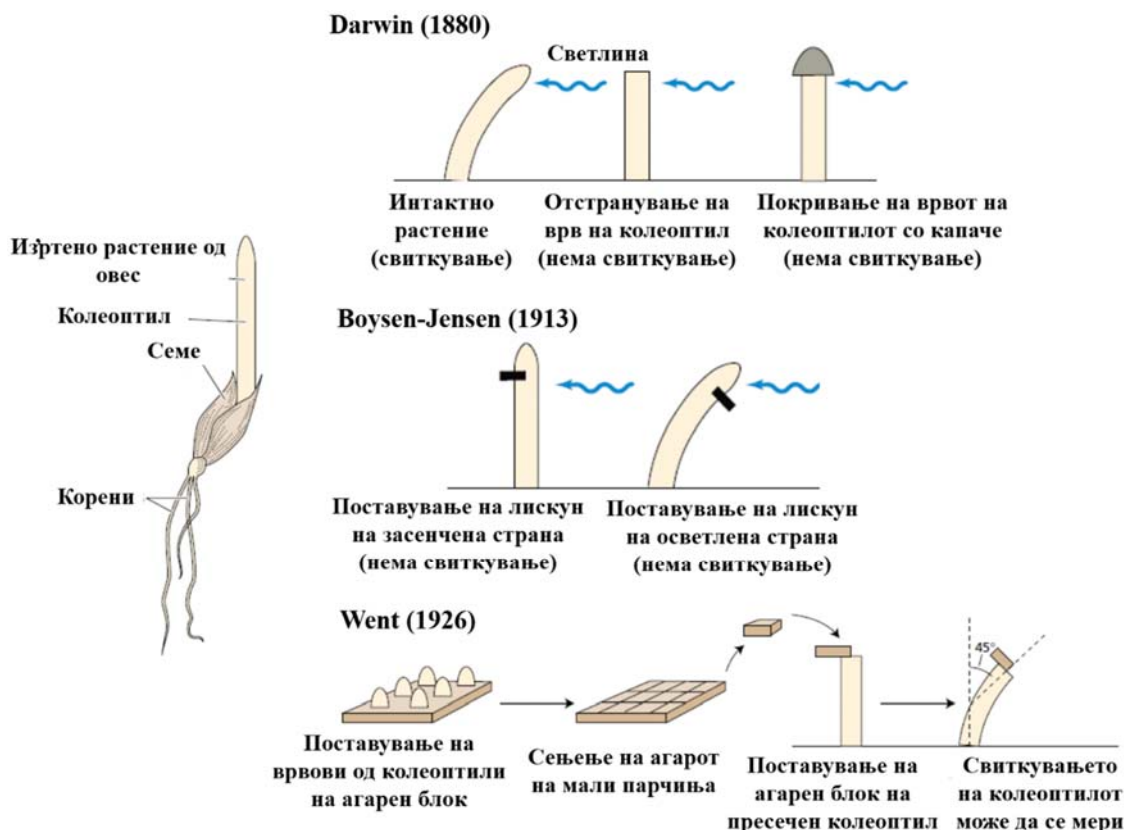
Позитивните регулаторни процеси на хомеостазата на регулаторите на растот опфаќаат инфлукс во клетките, биосинтеза, ослободување од внатрешни депоа и активација. Негативните регулаторни процеси на регулаторите на растот опфаќаат ефлукс од клетките, изолирање во интрацелуларните компартмани (вакуоли, лумен на ендоплазматичен ретикулум), инаktivација преку конјугација со други молекули (јаглехидрати, аминокиселини) и деградација. Фитохормоните можат да ја спречат сопствената биосинтеза преку модулирање на експресијата на соодветните гени за нивна биосинтеза. Овој тип на контрола на генетско ниво претставува заштитен механизам кој обезбедува доволна содржина на фитохормони во клетките. Хомеостазата не претставува ефикасна стратегија за одржување на концентрацијата на фитохормони во различни клетки во едно ткиво поради разликите во сензитивноста на клетките кон фитохормоните. Според тоа, сигналните дејства на фитохормоните кај растенијата се одредуваат преку неколку механизми, како што се генска експресија во специфични клетки, активација и транспорт на фитохормоните, како и активноста на рецепторите.

2. АУКСИНИ

Терминот ауксин потекнува од грчкиот збор „*auxein*“ што значи „да се зголеми“ или „да расте“. На клеточно ниво, ауксините ги контролираат основните процеси на клеточна делба и елонгација и затоа имаат значајна улога во формирањето на меристеми кај неорганизираните (недиференцирани) ткива и диференцираните органи. Кај организираните ткива, ауксините учествуваат во воспоставувањето на поларноста, а кај цели растенија ја стимулираат апликалната доминација и посредуваат во тропизмите.

2.1 Откривање на ауксините

Ауксинот е првиот откриен фитохормон кај растенијата уште од XIX-тиот век. Откривањето на ауксинот било потврдено преку експерименти на фототропизам, каде што било забележано дека собни растенија се ориентираат кон прозорецот поради потребата за светлина. Експериментите на Чарлс Дарвин покажале дека експозицијата на колеоптили од растението *Phalaris canariensis* кон унилатерална светлина овозможува пренесување на некои соединенија од горниот дел на колеоптилот надолу по стеблото, при што настанува свиткување на колеоптилот. Декапитацијата на колеоптилот спречува негово свиткување под дејство на светлина, што покажува дека врвот на колеоптилот е главно место за прецепција на светлина (Сл. 2.1).



Слика 2.1 Експерименти за откривање на ауксините.

Подоцна, Boysen-Jensen (1913) покажале дека поставувањето на лискуп од засенчената страна на колеоптилот го спречува базипеталниот проток на соединенија од

врвот на колеоптилот и не настанува негово свиткување. Од друга страна пак, фототропните движења се одвиваат кога лискунот се поставува на осветлената страна од колеоптилот (Сл. 2.1). Овие податоци покажуваат дека фототропните движења кај растенијата се одвиваат поради присуство на некој промотор на раст, а не поради дејство на некој инхибитор. Натамошните истражувања покажале присуство на соединение како стимулатор на растот кое поларно се транспортира од врвот на колеоптилот кон зоната на елонгација, при што настанува асиметричен раст. Во 1928 година, Went објавил квантитативен тест за свиткување на колеоптили кај *Avena sativa* (овес) познат како *Avena* тест, каде што степенот на свиткување на колеоптилот е пропорционален со содржината на стимулаторот на растот кој се транспортира од врвот кон базалниот регион. Експериментите на Went опфаќале поставување на врвови од колеоптили на агарен блок со цел да се акумулира факторот на раст. Агарните блокови кои го содржеле факторот на раст кога биле асиметрично поставени на пресечената површина од декапитирани колеоптили покажале одговор на свиткување (Сл. 2.1). Ова истражување е почетна точка во откривањето на ауксините бидејќи се потврдува постоење на регулатор на растот во врвот на колеоптилот. Во средината на XX-тиот век за прв пат бил изолиран природниот аускин индол-3-оцетна киселина (IAA) од пченкарно брашно.

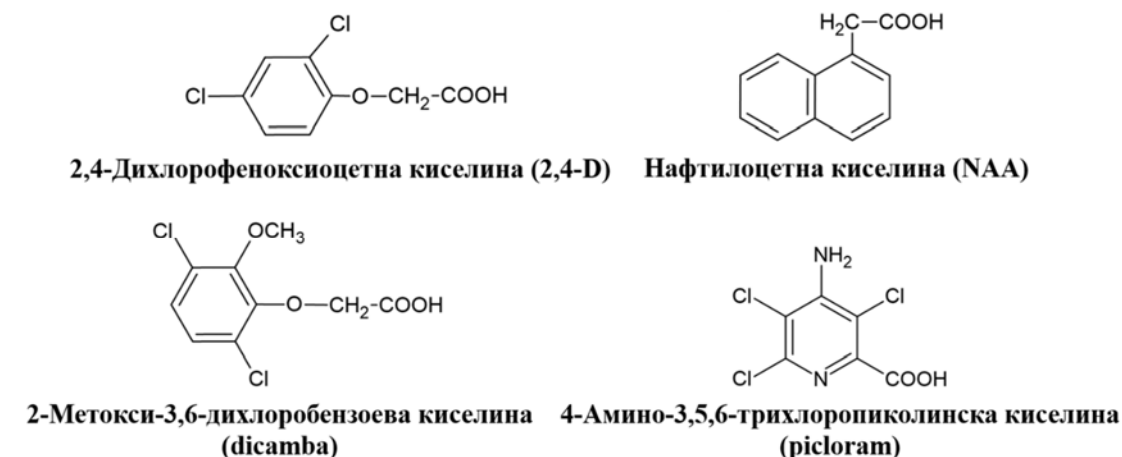
2.2 Природни и синтетски ауксини

Според хемиската структура, ауксините се ниско молекуларни органски соединенија кои содржат индолен или ароматичен прстен. Природни ауксини во растителните ткива се **индол-3-оцетна киселина (IAA)**, **индол-3-бутерна киселина (IBA)**, **фенилоцетна киселина (PAA)** и **4-хлоро-IAA** (Сл. 2.2). Исто така, во растителните ткива се детектирани прекурсори или деривати на IAA, како што се индол-3-пируват, индол-3-ацетамид, триптамин и триптофол.



Слика 2.2 Структура на природни ауксини.

Вообичаена пракса е користењето на синтетски ауксини во хранливиот медиум за култивирање на растителни клетки и ткива кои поседуваат слични биолошки ефекти како и природните ауксини. Најчесто употребувани синтетски ауксини се (Сл. 2.3): **2,4-дихлорофеноксиоцетна киселина (2,4-D)** и **нафтилоцетна киселина (NAA)**, а поретко се користат 4-хлорофеноксиоцетна киселина (4-CPA), 2,4,5-трихлорофеноксиоцетна киселина (2,4,5-T), 4-амино-3,5,6-трихлоропиколоинска киселина (picloram) и 2-метокси-3,6-дихлоробензоева киселина (dicamba). Ауксинот NAA има широка примена во хортикултурата како хормон за вкоренување, додека пак, 2,4-D претставува активна компонента на голем број комерцијални хербициди.



Слика 2.3 Структура на синтетски ауксини.

2.3 Физички и хемиски својства на ауксини

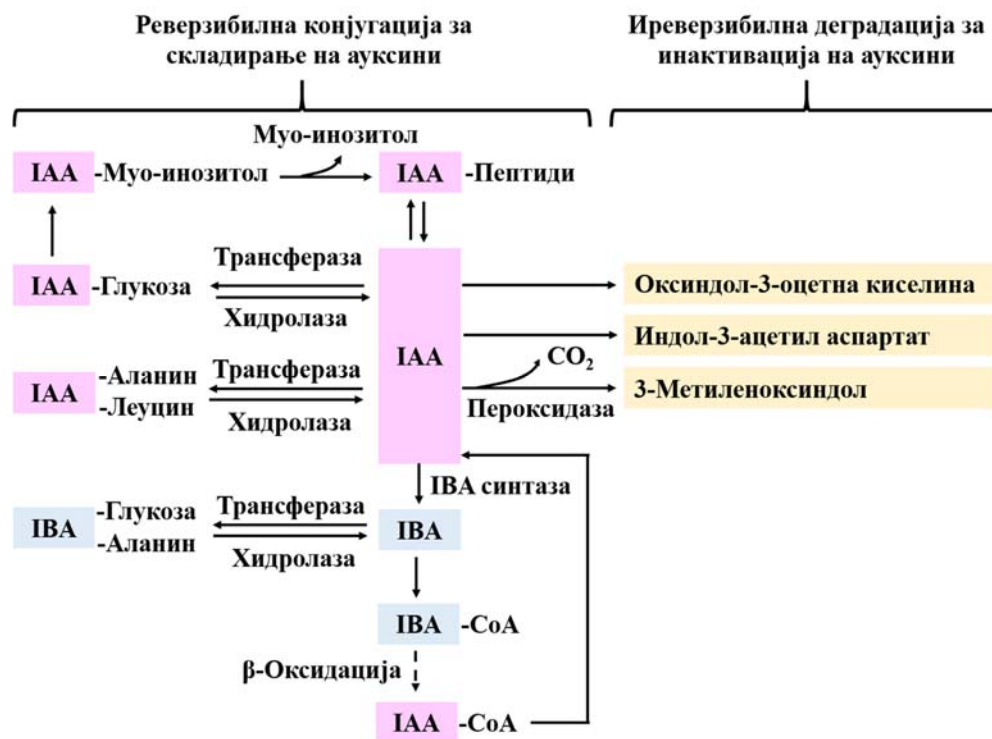
Ауксините во кристална форма имаат ниска растворливост во вода, а се раствораат во органски растворувачи (етанол, ацетон, диетил етер и диметилсулфоксид-DMSO) или водено-алкални раствори. Ауксинот IAA има ниска стабилност во хранливиот медиум бидејќи е подложен на оксидација по дејство на светлина (UV-зрачење) и оксиданти. Сите активни ауксини претставуваат слаби органски киселини. Поединечните ауксини покажуваат различна активност во зависност од растителниот вид, типот на орган, ткиво и клетки, како и од возраста и физиолошката состојба на растителното ткиво. Поради високиот степен на нестабилност во хранливиот медиум, IAA поретко се корисити за култивирање на растителни клетки и ткива во споредба со 2,4-D и NAA.

2.4 Конјугација и деградација на ауксини

Метаболизмот на ауксините опфаќа реакции на биосинтеза и модификација на структурата на молекулите. Високата концентрација на ауксините во растителните клетки може да има токсични ефекти. Затоа е неопходна хомеостатската контрола на интрацелуларната концентрација на ауксините преку нивна конјугација и деградација. Процесите на конјугација и деградација овозможуваат елиминирање на активните ауксини во услови на прекумерна акумулација во растителните клетки. Притоа, овие процеси се ефикасни во клетките кога е завршено дејството на ауксините.

Молекулите на ауксините во растителните клетки доминантно се застапени во конјугирана форма. При процесот на конјугација, ауксините ковалентно се поврзуваат со други ниско-молекуларни соединенија и на таков начин ја губат својата физиолошка активност. Ауксините во растителните ткива најчесто формираат 2 типа на конјугати: **амиди (пептиди)** или **гликозилни естри**. Амидите се добиваат преку формирање на пептидни врски помеѓу ауксините и аминокиселините аспартат, глутамат, аланин, глицин и валин. Еден од најчестите конјугати на IAA е индол-3-ацетиласпартат, како и бројни глукозилни естри на IAA (индол-3-ацетил- β -D-глукопираноза и индол-3-ацетил-*туо*-инозитол и индол-3-ацетилглукозил-рамноза). Конјугацијата на IAA со глюкоза и аминокиселините аланин и леуцин е реверзибилен процес и повеќето конјугирани форми на ауксините се складираат во вакуолата. Од конјугатот IAA-глюкоза се добива IAA-*туо*-инозитол, кој преку IAA-пептиди овозможува реверзибилно ослободување на

слободна форма на IAA (Сл. 2.4). Индол-3-бутерната киселина (IBA) може реверзибилно да се конјугира со аланин и глюкоза. Конверзијата на IBA во IAA може да настане преку β -оксидација на IBA-CoA. Конјугацијата на ауксините претставува механизам за складирање на IAA во клетките, одржување на стабилна концентрација на слободните ауксини, како и метаболизирање на вишокот на ауксини. Според тоа, реакциите на конјугација обезбедуваат флексибилен начин за регулација на ендегената содржина на ауксини во растителните клетки. Важно е да се напомене дека конјугираните ауксини се заштитени од оксидативното разградување, а молекулот на ауксин може да се ослободи од конјугираната форма под дејство на соодветни ензими.



Слика 2.4 Реакции на конјугација и деградација на ауксини.

Деградацијата на IAA е иреверзибилен процес на оксидација и целосно отстранување на интрацелуларните ауксини кои не се потребни за растителната клетка. Овој процес опфаќа оксидативна декарбоксилација на IAA и хемиска модификација на индолното јадро или страничниот синдиер под дејство на ензимот IAA-оксидаза/пероксидаза, при што се формираат голем број деградациони производи, како што е 3-метиленоксиндол. Исто така, IAA подлежи на иреверзибилни реакции на оксидација без карбоксилација, при што се добиваат оксиндол-3-оцетна киселина или индол-3-ацетил аспартат (Сл. 2.4).

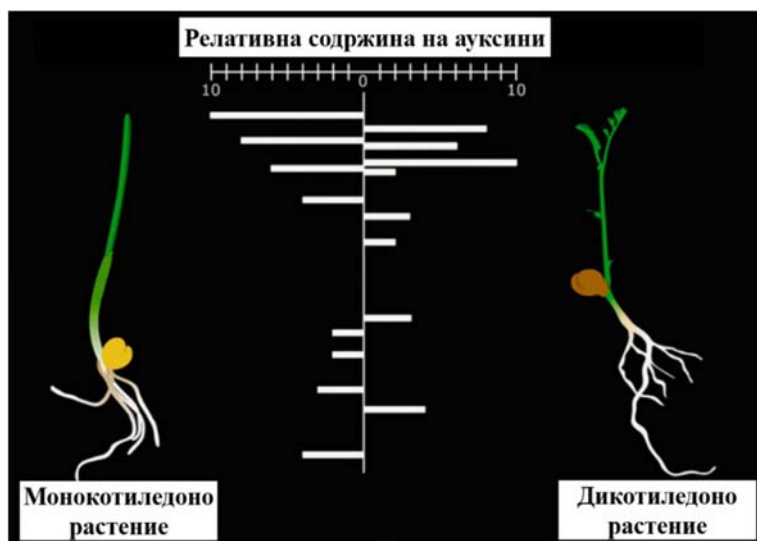
2.5 Дистрибуција на ауксини кај растенијата

Апикалниот врв на стеблото кај интактните растенија се карактеризира со највисока содржина на IAA. Од апикалниот врв IAA се транспортира базипетално кон основата на стеблото, при што се намалува концентрацијата на IAA. Овој градиент во концентрацијата на IAA е карактеристичен за монокотиледоните растенија, а кај дикотиледоните растенија највисока концентрација на IAA се забележува во субапикалната зона на стеблото која се карактеризира со брз раст на клетките. Важно е

да се напомене дека меристемските клетки во апикалниот врв на стеблото се активни места за биосинтеза на ауксините кои го стимулираат растот на клетките. Исто така, висока концентрација на ауксини поседуваат младите листови, цветовите, како и плодовите и семињата во фаза на развој. Познато е дека младите и брзо растечките органи имаат високи содржина на IAA, а со текот на развојот концентрацијата на ауксини се намалува. Концентрацијата на IAA во растителните органи може да варира во зависност од некои надворешни фактори, како што е светлината (бранова должина, интензитет и фотопериод). Кај растенијата можат да се забележат и диурнални (дневни) варијации во концентрацијата на IAA. Содржината на природни ауксини кај изолирани ткива (експлантати) зависи од растението-донатор, како и од неговата возраст (старост), годишната сезона и условите на растење.

2.6 Биосинтеза на ауксини

Активни места за биосинтеза на ауксините се меристемите и младите органи кои растат, како листови, апикални пупки, коренови врвови и соцветија (Сл. 2.5). Содржината на IAA во растенијата зависи од типот на ткиво и возраста на растението. Во вегетативните ткива, концентрацијата на IAA може да варира до 100 пати (5,7-570 pmol). Семињата вообичаено имаат висока содржина на IAA. Така на пр., ендоспермот од семето на пченка може да содржи до 300 pmol на IAA, а изданоците содржат значајно пониска концентрација на IAA (30 pmol).



Слика 2.5 Дистрибуција на ауксини кај монокотиледони и дикотиледони растенија. Релативна содржина на ауксини: 1-ниска содржина, 10-висока содржина.

Исто така, висока концентрација на ауксини содржат семињата од легуминозни растенија. Семињата од житни растенија главно содржат естерифицирана форма на IAA, а семињата од легуминозни растенија доминантно содржат пептидни конјугати на IAA. Високата содржина на IAA во кореновите врвови примарно се должи на транспортот на ауксини од другите места на биосинтеза, отколку од продукцијата во самиот коренов врв. Биосинтезата на ауксини била потврдена и во врвови на листови од дикотиледони растенија (Сл. 2.5). Со развојот на листовите, местото на биосинтеза на IAA постепено се менува кон основата на листовите и централниот регион на листот кој го претставува васкуларниот систем.

Биосинтезата на ароматичната аминокиселина триптофан како прекурсор на ауксините доминантно се одвива во хлоропластите преку патот на шикими киселината. Натомошните биосинтетски реакции на IAA можат да се одвиваат во цитоплазмата или хлоропластите. Околу 1/3 од IAA во клетките се наоѓа во хлоропластите, а остатокот во цитоплазмата на растителните клетки.

Биосинтезата на IAA во растителните клетки може да се одвива преку:

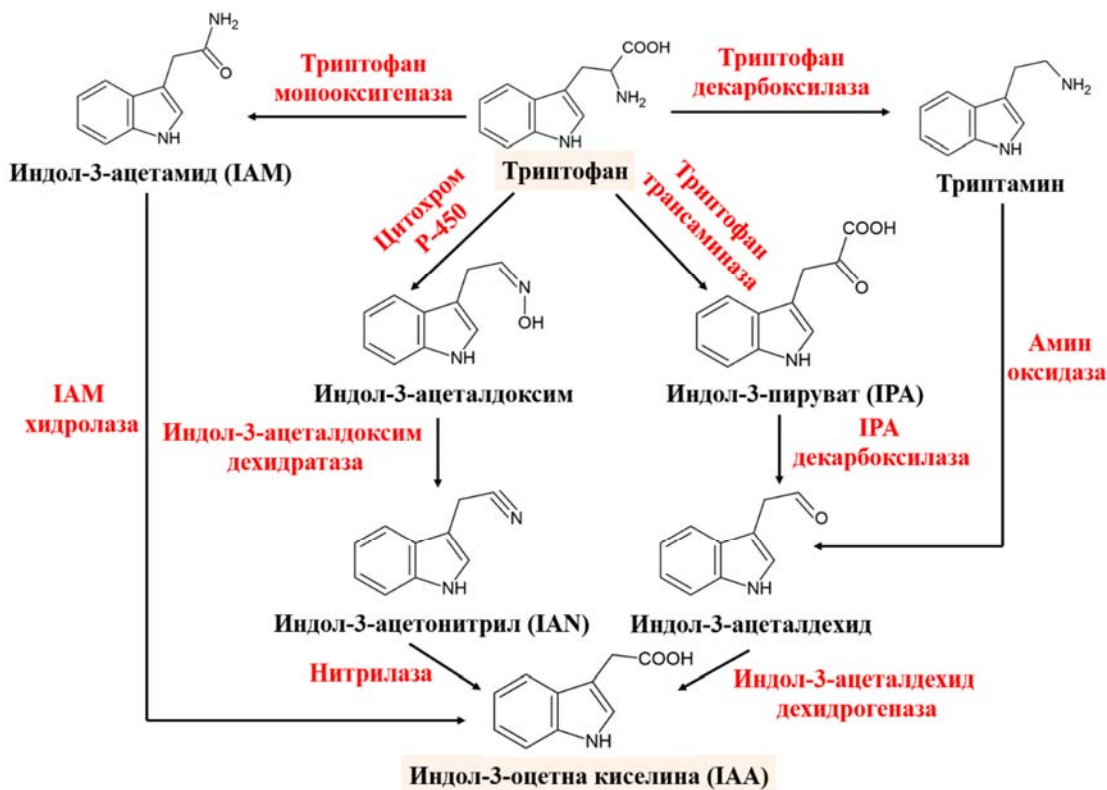
- триптофан-зависни патишта,
- триптофан-независни патишта.

2.6.1 Триптофан-зависни патишта

Растенијата имаат способност за конверзија на аминокиселината триптофан во IAA преку неколу биосинтетски патишта (Сл. 2.6).

1. Бактериски пат. Кај некои фитопатогени бактерии (*Agrobacterium tumefaciens*) и растенија трансформирани со овие бактерии, **триптофанот** се конвертира во **индол-3-ацетамид (IAM)** под дејство на ензимот триптофан монооксигеназа. Формираниот IAM се хидролизира до **IAA** со посредство на ензимот IAM хидролаза.

2. Индол-3-ацетонитрил (IAN) пат. Овој биосинтетски пат е карактеристичен за растенијата од фамилијата Brassicaceae и започнува со конвертирање на **триптофан** во **индол-3-ацеталдоксим** под дејство на цитохром P-450. Формираниот индол-3-ацеталдоксим со посредство на ензимот индолацеталдоксим дехидратаза преминува во **индол-3-ацетонитрил (IAN)**, кој потоа се хидролиза под дејство на ензимот нитрилаза до **IAA**.



Слика 2.6 Триптофан-зависни биосинтетски патишта на индол-3-оцетна киселина.

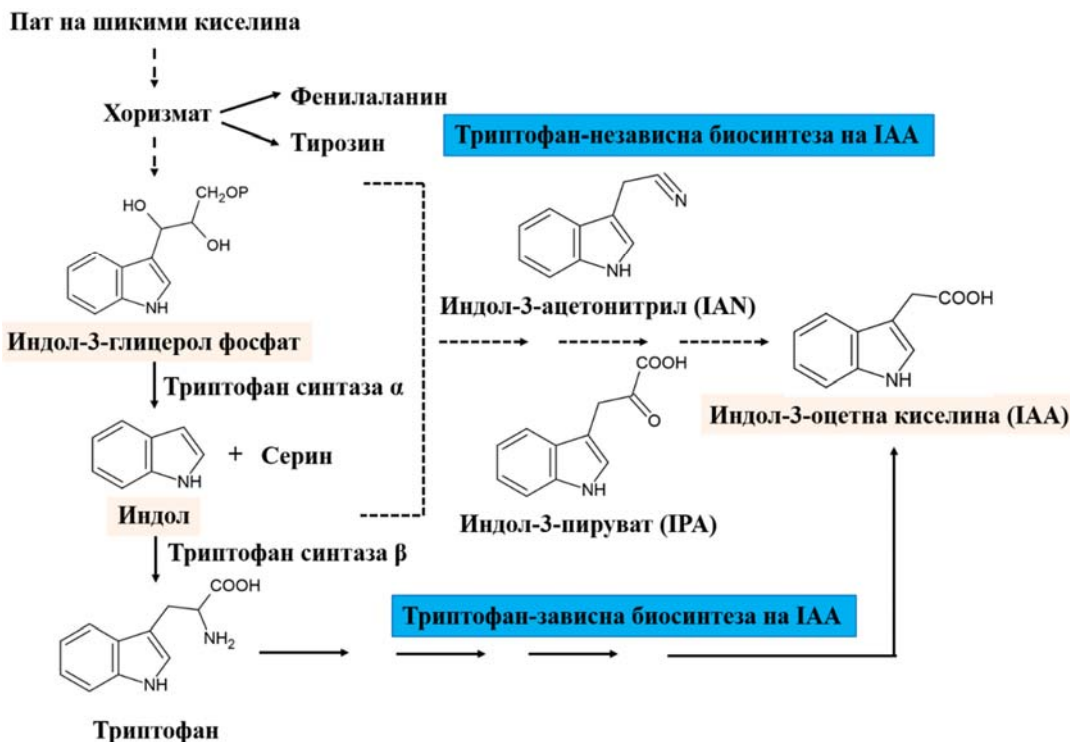
3. Индол-3-пируват (IPA) пат. Ова е доминантен биосинтетски пат кој се одвива кај растенијата. Биосинтетскиот пат започнува со трансминација на **триптофан** под дејство на ензимот триптофан трансминаза до **индол-3-пируват (IPA)**, кој потоа се декарбоксира до **индол-3-ацеталдехид** со посредство на ензимот IPA декарбоксилаза. Формираниот индол-3-ацеталдехид се оксидира до **IAA** под дејство на ензимот индол-3-ацеталдехид дехидрогеназа.

4. Триптамин (ТАМ) пат. Овој биосинтетски пат е доминантно застапен кај видовите од фамилијата Роасеае и опфаќа декарбоксилација на **триптофан** во **триптамин** под дејство на ензимот триптофан декарбоксилаза. Формираниот триптамин се деаминира со посредство на ензимот триптамин оксидаза и се добива **индол-3-ацеталдехид**. Во оваа точка од биосинтезата, триптаминскиот пат се вклучува во индол пируватниот пат за добивање на **IAA**. Ензимот индолацеталдехид оксидаза кој е одговорен за конверзија на индол-3-ацеталдехид во IAA има регулаторна улога во двата биосинтетски патишта.

Сите наведени биосинтетски патишта на IAA можат да се одвиваат кај растенијата, при што некои патишта можат да се одвиваат паралелно или само во одредени секвенци зависно од физиолошките услови.

2.6.2 Триптофан-независни патишта

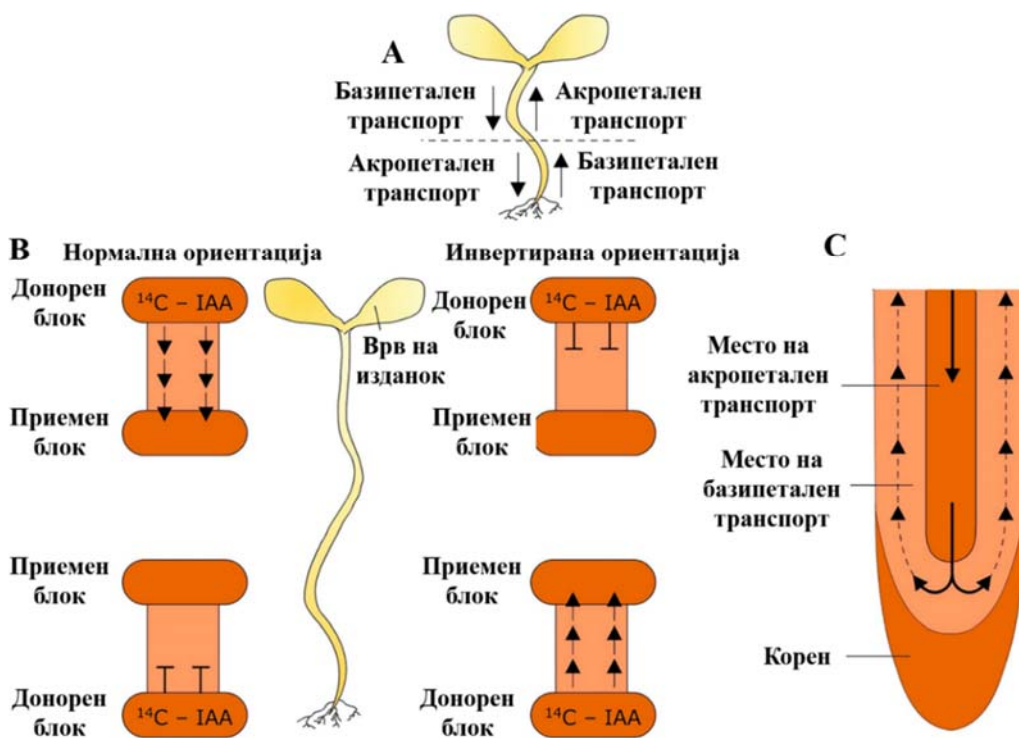
Кај триптофан-независниот пат, IAA може да се синтетизира од **индол** или **индол-3-глицерол фосфат**. Овој биосинтетски пат е потврден во перикарп од мутант на пченка (*orange pericarp-orp*), каде што двете субединици на ензимот триптофан синтаза немаат ензимска активност (Сл. 2.7). Овој мутант нема способност за конверзија на триптофан во IAA и неговото преживување зависи од егзогената суплементација со триптофан.



Слика 2.7 Триптофан-независни патишта на биосинтеза на индол-3-оцетна киселина.

2.7 Транспорт на ауксини

Изданоците и корените кај растенијата се карактеризираат со структурна поларност претставена со врв-основа која се базира на транспортот на ауксините. Поларниот транспорт на ауксините се одвива **базипетално**, односно од апикалниот кон базалниот дел на изданоците или корените (Сл. 2.8). Всушност, ауксините во надземните делови на растенијата се транспортираат од врвот на изданокот кон стеблото, а во подземните делови од кореновиот врв кон основата на коренот која граничи со стеблото. Овој тип на едонасочен транспорт на ауксините кај растенијата се означува како **поларен транспорт**. Ауксините се единствените фитохормони кои се карактеризираат со поларен транспорт кај растенијата. Лонгитудалниот градиент на ауксините од изданоците кон корените влијае врз процесите на елонгација на стебло, апикална доминација и сенесценција на листови. Транспортот на ауксините кај растенијата најчесто се одвива преку васкуларниот систем, особено преку ксилемскиот паренхим, како и преку флоемските цевки. Синтетизираните ауксини во листовите се транспортираат преку флоемските клетки до останатите делови на растението. Според тоа, флоемот е главен транспортен систем за **акропетално движење** (кон врвот) на ауксините во коренот.



Слика 2.8 Транспорт на ауксини кај растенија (A). Поларен транспорт на ауксини кај сегменти од хипокотили (B). Правец на транспорт на ауксини во корен (C).

Покрај транспортот на ауксини на долги растојанија преку спроводниот систем, постои и клеточен транспорт помеѓу растителните клетки. При овој интерклеточен транспорт, ауксинот излегува од една клетка преку клеточната мембрана, потоа дифундира преку средната ламела и преминува преку клеточната мембрана на друга клетка (апопластен транспорт). Процесот на навлегување на ауксините во клетката се означува како **инфлукс**, а нивното излегување од клетката е познато како **ефлукс**.

2.7.1 Инфлукс на ауксини

Постојат два главни механизми за инфлукс на ауксини во растителните клетки:

1. **Пасивна дифузија** на протонирана форма на IAA (IAAH) како липофилен молекул преку фосфолипидниот двослој на клеточните мембрани,
2. **Секундарен активен транспорт** на дисоцираната форма на IAA (IAA⁻) преку симпорт протеинскиот носач означен како AUX1.

Активноста на H⁺-АТРазата во нормални услови одржува ниска рН вредност во клеточниот сид (рН = 5,5). Според тоа, околу 25% од IAA во апопластот останува во протонирана форма (IAAH) која пасивно дифундира преку клеточната мембрана во насока на концентрацискиот градиент. Од друга страна пак, дисоцираната форма IAA⁻ има негативен полнеж и не може пасивно да поминува преку клеточната мембрана.

Секундарниот активен транспорт на ауксините се одвива со помош на протеински носач за инфлукс на ауксини означен како **AUX1** кој врши симпорт на 2H⁺ и IAA⁻. Секундарниот транспорт овозможува повисока интрацелуларна акумулација на ауксините во споредба со простата дифузија, бидејќи ауксините се внесуваат преку мембраната во клетката со посредство на протонската моторна сила. Протеинот AUX1 покажува униформна дистрибуција на мембраните од клетките кои учествуваат во поларниот транспорт на ауксините. Според тоа, поларниот транспорт на ауксините примарно се должи на нивниот ефлукс, отколку на инфлукс во растителните клетки.

2.7.2 Ефлукс на ауксини

Во цитоплазмата на растителната клетка која поседува неутрална рН средина (рН 7,2), речиси сите молекули на IAA дисоцираат како анјони (IAA⁻). Овие молекули се акумулираат во цитоплазмата, бидејќи клеточната мембрана не е пропустлива за IAA⁻. Сепак, најголем дел од интрацелуларните ауксини можат да излезат од клетката преку протеински носач за ефлукс на ауксини означен како **PIN**. Кај растенијата се потврдени неколку PIN протеини кои главно се локализирани на базалната страна на клетките. Терминот PIN потекнува од фенотипот на *Arabidopsis pin 1* мутантите кои се карактеризираат со игличести соцветија и стебла без листови, пупки и цветови (Сл. 2.9).



Слика 2.9 Фенотип на див тип и *pin 1* мутанти од *Arabidopsis thaliana*.

Кај *Arabidopsis* се идентификувани најмалку 7 *PIN* гени. Поларниот транспорт на ауксини кај *pin* мутантите е значајно редуциран и оваа особина може да се мимикрира преку блокирање на поларниот ауксински транспорт со одредени соединенија означени како **фитотропини**. Фитотропините се некомпетитивни инхибитори на поларниот ауксински транспорт, како што се 2,3,5-тријодобензоева киселина (TIBA) и N-1-нафтилфталамична киселина (NPA). Протеинот PIN1 главно е локализиран во кислемските паренхимски клетки во изданокот и коренот и има есенцијално значење за поларниот транспорт на ауксини. Протеинот PIN2 е локализиран во кората и епидермисот на коренот и го регулира базипеталниот транспорт на ауксините во корените. Протеинот PIN3 е локализиран во ендодермисот на изданокот и во кореновата капа и учествува во латералната дистрибуција на ауксините. Протеинот PIN4 е локализиран во неактивниот центар во коренот кој претставува слој од неколку клетки помеѓу кореновата капа и активниот меристемски регион и има значајна улога во формирање на резервоар на ауксини во апикалниот меристем на коренот. Протеинот PIN7 има клучна улога во формирањето и одржувањето на апикално-базален градиент во ембрионите (Таб. 2.1).

Табела 2.1 Локализација на различни протеини за ефлукс на ауксини кај растенијата.

Протеини за ефлукс	Локализација	Функција
PIN1	Паренхим на ксилем во изданок и корени	Базипетален транспорт на ауксини во изданок и акропетален транспорт во корен
PIN2	Корени	Базипетална редистрибуција на ауксини преку клетки на епидермис и кора
PIN3	Епидермални клетки на изданок, коренова капа и перицикл на корен	Латерална редистрибуција на ауксини
PIN4	Неактивен центар во корен	Воспоставување на резервоар за ауксини во апикалниот меристем на коренот
PIN7	Ембриони	Формирање на апикално-базален градиент за поларност на ембриони

Поларниот транспорт на ауксините се регулира преку рециклирање на PIN протеините помеѓу клеточната мембрана и различни ендомембрански компартмани. Овој процес вклучува секреција на везикули кои носат PIN протеини од нивното место на биосинтеза и нивно транспортирање до специфични места на клеточната мембрана од клетките кои учествуваат во транспортот на ауксини.

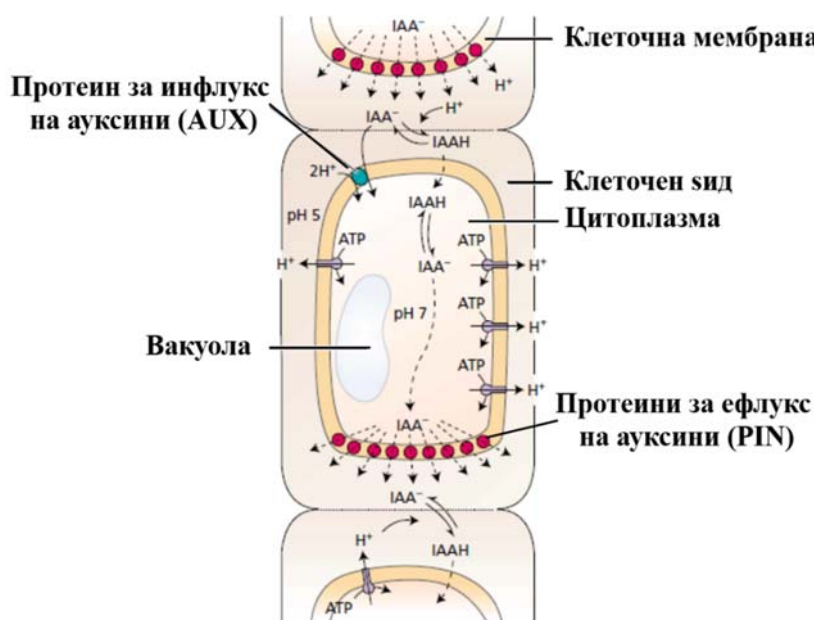
2.7.3 Хемиосмотски модел за транспорт на ауксини

Поларниот транспорт на ауксините во клетките уште се означува и како „хемиосмотска поларно дифузиона теорија“. Моделот за поларниот транспорт на ауксини опфаќа 3 клучни карактеристики:

1. Постојење на рН градиент или протонска моторна сила како движечка сила за транспорт на IAA преку клеточната мембрана.
2. Активност на протеински носач за инфлукс на ауксини.
3. Доминантна локализација на протеински носачи за ефлукс на ауксини на базалната страна на клетките.

Според овие три карактеристики, хемиосмотскиот модел за транспорт на ауксини може да се објасни преку следните фази (Сл. 2.10):

1. Ауксинот IAA претставува слаба киселина со липофилна структура. Апопластот во клеточниот сид има слабо кисела рН вредност од 5,5. Во оваа рН средина, 25% од IAA останува во протонирана форма (IAAH), а остатокот егзистира во анјонска форма (IAA⁻). Според тоа, апопластниот простор во клеточниот сид содржи протонирани (IAAH) и анјонски форми (IAA⁻) на индол-3-оцетна киселина.
2. Поради липофилната природа, IAAH дифундира од клеточниот сид преку клеточната мембрана во цитоплазмата.
3. Сепак, најголем дел од IAA преминува преку клеточната мембрана во анјонска форма како IAA⁻ со користење на симпорт протеините AUX1 кои се униформно дистрибуирани по должината на клеточната мембрана.
4. Во внатрешноста на клетката, цитоплазматската рН вредност изнесува околу 7, при што IAAH дисоцира на IAA⁻ и H⁺. На таков начин, ауксините остануваат заробени во внатрешноста на клетката, бидејќи IAA⁻ не може спонтано да дифундира преку клеточната мембрана.
5. Есенцијална компонента на хемиосмотскиот модел е базалната дистрибуција на PIN протеините кои се одговорни за воспоставување на поларност при ауксинскиот транспорт.
6. Главна движечка сила која предизвикува ефлукс на IAA⁻ надвор од клетката е негативниот потенцијал на клеточната мембрана кој изнесува од -200 до -300 mV.



Слика 2.10 Хемиосмотски модел за транспорт на ауксини.

Денес се познати неколку гени кои кодираат протеински носачи за транспорт на ауксини. Карактеристични претставници за овие гени кои се идентификувани кај *Arabidopsis thaliana* се *AUX1* генска фамилија која кодира протеински носачи за инфлукс на ауксини и *PIN* генска фамилија која кодира протеински носачи за ефлукс на ауксини и се експресираат во различни ткива и органи. Воспоставувањето и одржувањето на оваа дистрибуција се одвива со посредство на цитоскелетот (микрофиламенти) и секреторните патишта на протеините кои потекнуваат од Golgi-евиот апарат.

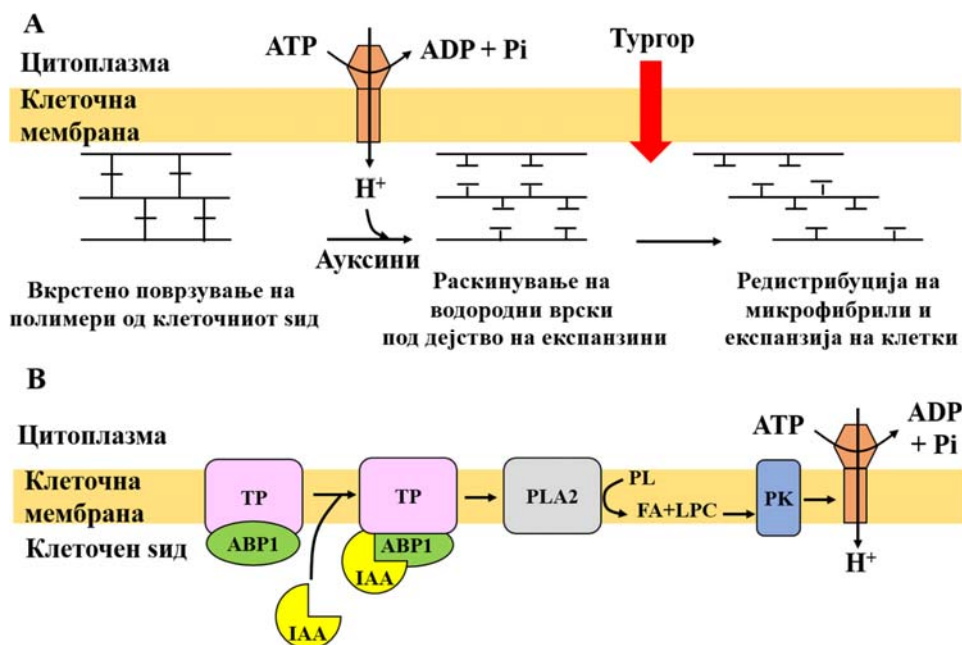
2.8 Физиолошко дејство на ауксини

2.8.1 Екстензија или елонгација на клетки (хипотеза на киселински раст)

Растителните клетки имаат способност за значајно зголемување на нивните димензии при кисела рН средина во споредба со неутрална средина. Овој феномен на „киселински раст“ ја објаснува екстензијата на клеточниот сид под дејство на ауксините. Според оваа хипотеза, ауксините предизвикуваат ацидификација на клеточниот сид (апопласт) преку ослободување на протоните надвор од растителните клетки под дејство на мембранските H^+ -АТРази. Киселата рН средина во апопластот активира ензимски процеси на олабавување на клеточниот сид.

Хипотезата на киселински раст на клетките опфаќа неколку процеси (Сл. 2.11):

1. Ауксините ја активираат мембранската H^+ -АТРаза што резултира со ацидификација на клеточниот сид.
2. Ниската рН средина во клеточниот сид ја зголемува активноста на експанзини што резултира со прекинување на водородните врски помеѓу целулозните микрофибрили.
3. Олабавувањето на целулозните микрофибрили во клеточниот сид овозможува експанзија на клетките.



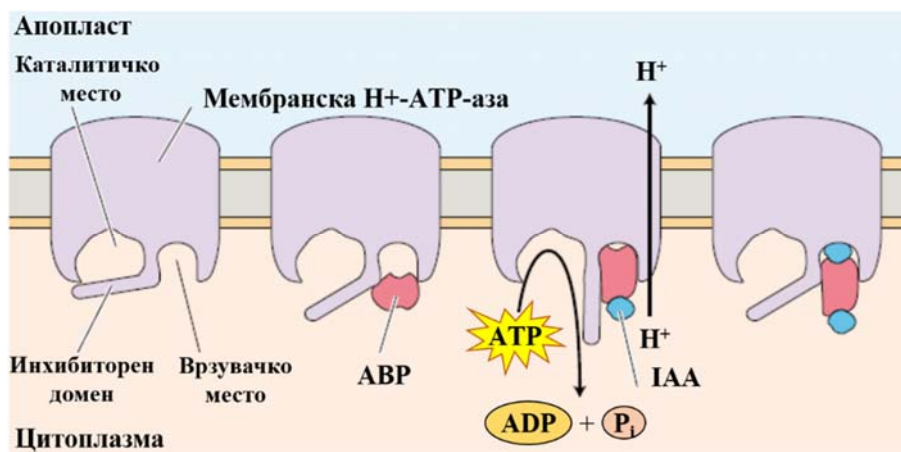
Слика 2.11 Механизам на експанзија на клетки. Полимерите од клеточниот сид составени од целулозни микрофибрили се цврсто поврзани помеѓу себе, при што се ограничува нивниот капацитет за експанзија. Ауксините ја активираат H^+ -АТРазата која предизвикува ацидификација на клеточниот сид преку испумпување на протони од цитоплазмата. Ниската рН вредност во клеточниот сид ги активира експанзините кои ги ракинуваат водородните врски кај полимерите. Тургоровиот притисок предизвикува редистрибуција на целулозните микрофибрили и експанзија на клетките (А). Модел на сигнална трансдукција на ауксините преку кој се прикажува дејството на ауксините врз H^+ -АТРазата (В). TP: трансмембрански протеин, ABP1: мембрански протеин за врзување на ауксини, PLA2: фосфолипаза A2, FA: масни киселини, LPC: лизофосфотидилхолин, PK: протеин киназа.

Ауксините предизвикуваат активација на H^+ -АТРази преку нивно врзување со мембранскиот протеин наречен АВР1 (auxin-binding protein 1). Протеинот АВР1 претставува ауксински рецептор кој е локализиран во ендоплазматичниот ретикулум и клеточната мембрана. Всушност, АВР1 формира комплекс со трансмембрански протеин кој овозможува липофилност за укотвување на АВР1 во мембраната. Овој комплекс (АВР1-трансмембрански протеин) потоа мигрира од ЕР до клеточната мембрана, каде што АВР1 се локализира и ориентира кон апопластната страна на клетката. Во оваа позиција, АВР1 се поврзува за молекулот на ауксин. Овој ауксин-АВР1-трансмембрански протеински комплекс иницира патишта на сигнална трансдукција кои овозможуваат активирање на АТР-азните протонски пумпи. Овие патишта на сигнална трансдукција под дејство на ауксините се одвива со посредство на ензимот фосфолипаза А2 (PLA2) која катализира разградување на фосфолипидите и ослободување на лизофосфолипиди и масни киселини. Формираните лизофосфолипиди ја активираат H^+ -АТРаза преку вклучување на каскадна реакција на протеин киназа (Сл. 2.11).

Постојат два механизми преку кои ауксините го стимулираат испумпувањето на протони во апопластот на растителната клетка (Сл. 2.12 и Сл. 2.13):

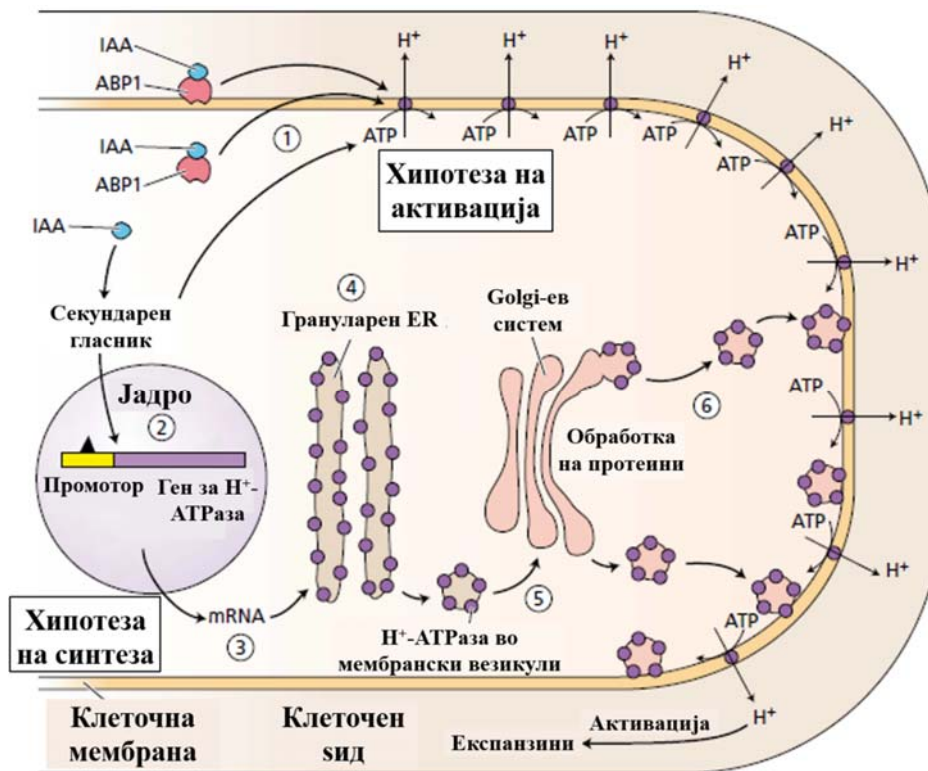
1. Активација на претходно постоечки H^+ -АТРази на клеточната мембрана,
2. Синтеза на нови H^+ -АТРази на клеточната мембрана.

Според првиот механизам (**хипотеза на активација**), ауксините имаат способност за директна активација на H^+ -АТРази на клеточната мембрана преку дејство на протеинските рецептори за ауксините означени како АВР. Во отсуство на ауксини (IAA), активноста на H^+ -АТРазата се инхибира под дејство на С-терминалниот домен на ензимот кој го блокира неговото каталитичко место. Рецепторот АВР поврзан со ауксинот стапува во интеракција со H^+ -АТРазата и предизвикува активирање на ензимот (Сл. 2.12).



Слика 2.12 Модел за активирање на мембранска H^+ -АТРаза под дејство на рецепторот АВР и ауксинот IAA (индол-3-оцетна киселина). Рецепторот АВР со IAA се врзува за врзувачкото место на H^+ -АТРазата и предизвикува конформациски промени на АВР. Потоа, АВР стапува во интеракција со инхибиторниот домен на H^+ -АТРазата и настанува активирање на ензимот. Врзувањето на IAA на второ место од АВР ја намалува интеракцијата со инхибиторниот домен на H^+ -АТРазата, при што настанува инхибирање на активноста на ензимот.

Според вториот механизам (**хипотеза на синтеза**), ауксините го стимулираат испумпувањето на протони во апопластот преку зголемување на синтезата на H^+ -АТРази. Се претпоставува дека стимулативниот ефект на ауксините врз испумпувањето на протони се базира на двата механизми, односно активирање и синтеза на мембранските H^+ -АТРази (Сл. 2.13).



Слика 2.13 Механизми на испумпување на протони во апопластот на растителните клетки. Хипотеза на активација: Ауксините се врзуваат за рецепторот ABP1 кој може да се наоѓа на површината на клетката или во цитоплазмата. Потоа, комплексот ABP1-IAA стапува во интеракција со мембранската H^+ -АТРаза која се активира и испумпува протони во апопластот (чекор 1). Активацијата на H^+ -АТРазата може да се одвива и со посредство на секундарни гласници, како што се калциумовите јони или интрацелуларната pH средина. Хипотеза на синтеза: Секундарните гласници индуцирани под дејство на ауксините ја активираат експресијата на гени (чекор 2) кои кодираат мембранска H^+ -АТРаза (чекор 3). Овој протеин се синтетизира на грануларниот ендоплазматичен ретикулум (ЕР), (чекор 4) и преку секреторните патишта се насочува кон клеточната мембрана (чекори 5 и 6). Зголемувањето на степенот на испумпување на протони се должи на зголемување на бројот на протонските пумпи на клеточната мембрана.

2.8.2 Апикална доминација

Апикалната доминација претставува инхибиција на растот на аксиларните (латерални) пупки преку континуирана меристемска активност на врвот на изданокот. Овој процес може да се демонстрира преку декапитација на врвот на стеблото кај тревестите растенија. Од физиолошки аспект, инхибираниот раст на аксиларните пупки

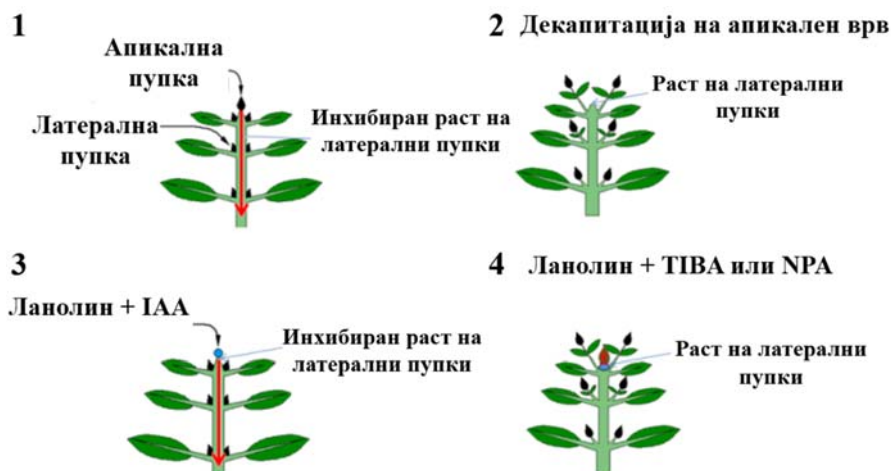
при апикална доминација се разликува од дорманцијата на пупките. При дорманција на пупките, врвните и латералните пупки остануваат во дормантна состојба кај растенијата кои природно вегетираат во умерените или ладните региони на Земјата. Растот на овие пупки се регулира под дејство на температурата или фотопериодот. Од друга страна пак, апикалната доминација го одредува начинот на разгранување на растенијата.

Зависно од степенот на апикална доминација, тревестите растенија можат да се групираат во 3 категории:

1. Растенија со силна апикална доминација (*Helianthus annuus* и *Tradescantia* sp.) кои покажуваат низок степен или воопшто не покажуваат латерално гранење.
2. Растенија со средна или парцијална апикална доминација кои покажуваат одреден степен на гранење (*Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum* и *Vicia faba*).
3. Растенија со слаба или без апикална доминација кои покажуваат значајно гранење (*Coleus* и *Arabidopsis*).

Растенијата со силна или парцијална апикална доминација покажуваат поголем степен на инхибиција на аксиларните пупки кои се во близина на врвниот изданок на стеблото. Кај овие растенија, ефектот на апикална доминација се намалува при поголема оддалеченост од врвниот меристем, каде што постои висок степен на гранење.

Физиолошките основи на апикалната доминација започнале да се проучуваат преку експерименти со апликација на ланолинска паста која содржи IAA врз пресечени врвови на изданоци од *Vicia faba*, при што било забележано инхибирање на растот на латералните пупки (Сл. 2.14). Од друга страна пак, апликацијата на други фитохормони (citoкенини, гиберелини или абсцисинска киселина) не покажале сличен ефект врз инхибиција на растот на латералните пупки. Ова инхибиторно дејство врз растот на латералните пупки може да се елиминира преку апликација на ланолинска паста на декапитирано стебло која содржи инхибитори на ауксинскиот транспорт, како што се TIBA или NPA (Сл. 2.14).



Слика 2.14 Ефекти на ауксини врз апикалната доминација. Синтетизираниите ауксини од апикалната пупка го инхибираат растот на латералните пупки (1). Декапитацијата на апикалниот врв на стеблото го стимулира растот на латералните пупки (2). Апликацијата на ауксин (IAA) врз пресеченото стебло го инхибира растот на латералните пупки (3). Апликацијата на инхибитори на ауксинскиот транспорт (TIBA или NPA) го стимулираат растот на латералните пупки (4). IAA: Индол-3-оцетна киселина, TIBA: 2,3,5-тријодобензоева киселина, NPA: N-1-нафтилфаламична киселина.

Сите овие експерименти потврдуваат дека ауксините кои се синтетизираат во врвот на изданокот го инхибираат растот на латералните пупки како резултат на нивниот базипетален транспорт.

Моделите кои ги прикажуваат механизмите на апикална доминација опфаќа неколку фази (Сл. 2.15 и Сл. 2.16):

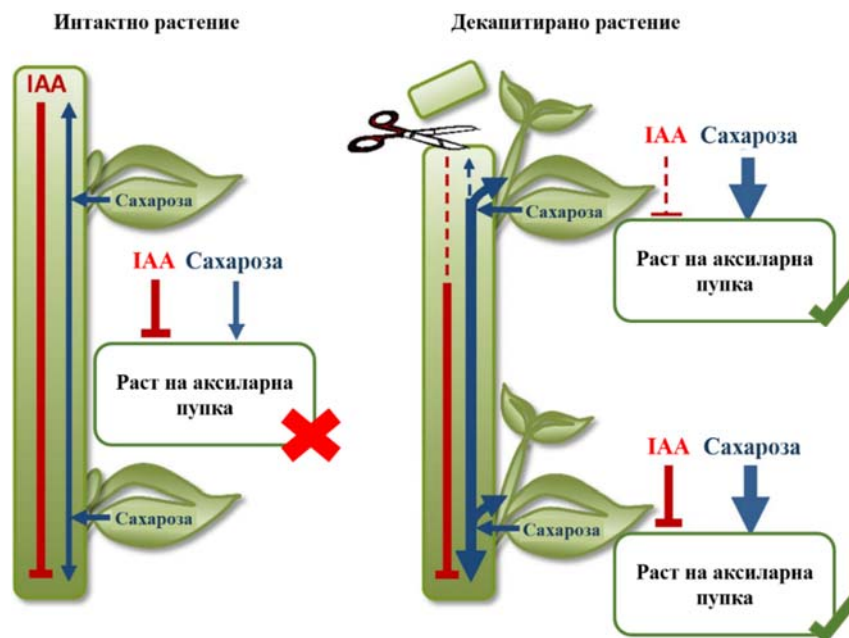
1. Иницијалниот сигнал за раст на аксиларна пупка се зголемува со достапноста на сахароза во пупката. При декапитација на стеблото, концентрацијата на сахароза која потекнува од листовите започнува да се намалува во регионот на стеблото кој е во непосредна близина на аксиларната пупка. Ова намалување во концентрацијата на сахароза во стеблото настанува поради транспортот на сахарозата во аксиларната пупка. Според тоа, апикалната доминација се регулира преку ограничување на достапноста на сахароза во аксиларните пупки кај интактните растенија, а континуирираниот раст на аксиларната пупка зависи од трошењето на ауксини во стеблото во близина на пупката.

2. Активацијата на растот на аксиларните пупки како резултат на декапитација на апикалната пупка зависи од снабдувањето со цитокинини и способноста на аксиларната пупка за ефлукс на ауксини.

4. Стриголактоните (терпеноидни деривати) претставуваат негативни регулатори на базипеталниот транспорт на ауксините од врвот на изданокот. Во тој контекст, стриголактоните ја редуцираат способноста на стеблото за акумулација на ауксини.

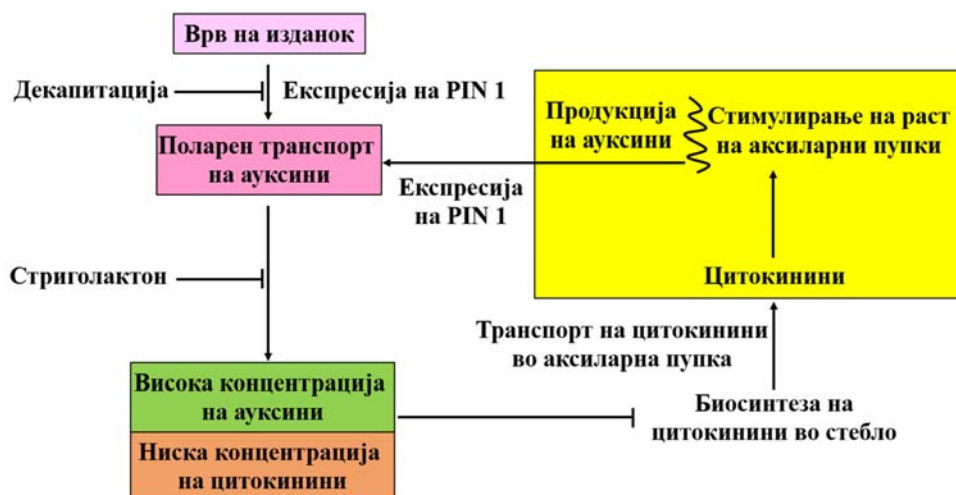
5. Ауксините се позитивни регулатори на синтезата на стриголактони и ја инхибираат синтезата на цитокинини во стеблото. Како резултат на декапитација на врвот на изданокот се губи изворот на ауксини и се елиминира супресијата на гените за биосинтеза на цитокинини, при што настанува активација на овие гени.

6. Зголемената биосинтеза на цитокинини во супресираниите аксиларни пупки стимулира нивна меристемска активност, што резултира со раст на аксиларните пупки.



Слика 2.15 Регулација на апикална доминација преку достапност на сахароза. Ширината на полните линии ја прикажува застапеноста на соединенијата, а испрекинатите линии прикажуваат ниска концентрација на соединенијата. IAA-Индол-3-оцетна киселина.

Цитокинините учествуваат во прекинување на апикалната доминација, бидејќи апликацијата на овие фитохормони кај интактните растенија го стимулира растот на аксиларните пупки. Познато е дека цитокинините кои се вклучени во прекинувањето на апикалната доминација се синтезираат локално во аксиларните пупки.

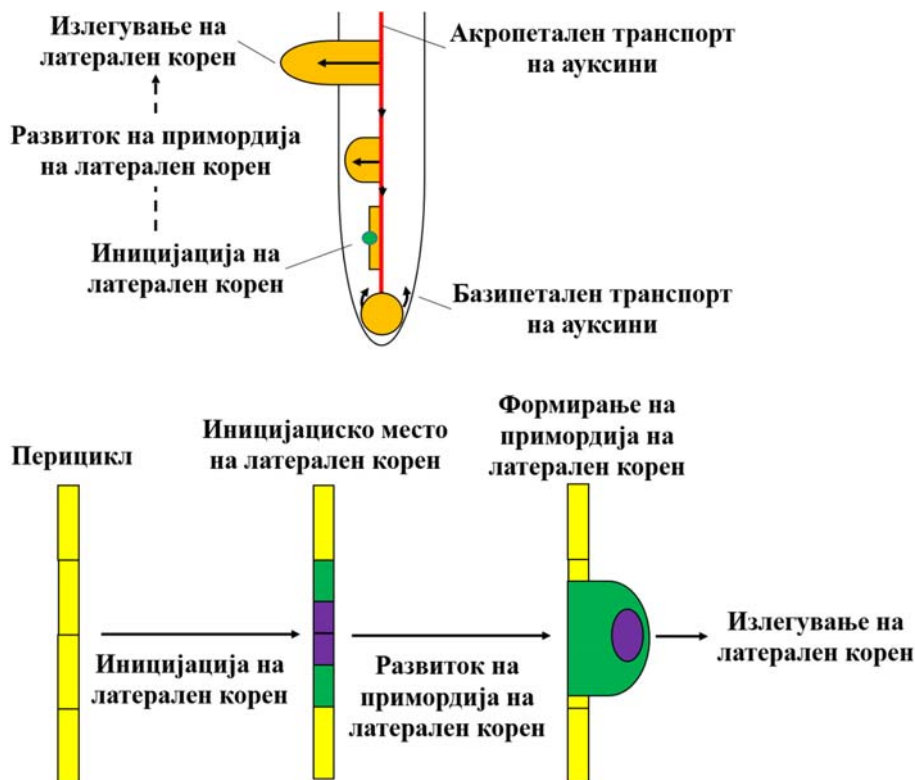


Слика 2.16 Шематски модел кој ја прикажува интеракцијата помеѓу ауксините, стриголактоните и цитокинините во контрола на апикалната доминација.

2.8.3 Индуksiја на латерални и адвентивни корени

Латералните примордии на коренот се иницираат преку локализирани клеточни делби во перициклот што резултира со протрузија на диференцирана зона на перициклот. Формираната латерална примордија на коренот пенетрира преку клетките од кората како резултат на развојот на сопствен врв на коренот и коренова капа. Притоа, кореновиот врв излегува од епидермисот на коренот во форма на латерален корен. На сличен начин, адвентивните корени се иницираат преку клеточни делби на паренхимските клетки кои се во близина на васкуларните ткива во стеблото. Потоа, примордијата на коренот се диференцира како нов адвентивен корен.

Формирањето на латерални корени зависи од постоењето на локален градиент на ауксини преку воспоставување на рамнотежа помеѓу процесите на биосинтеза и транспорт на ауксините (Сл. 2.17). Ауксините дејствуваат преку регулација на клеточниот циклус за време на иницијацијата на латералните корени. Покрај стимулативниот ефект на ауксините врз иницијацијата на латерални корени, овие процеси можат да се регулираат под дејство на други фитохормони. Во тој контекст, зголемената содржина на етилен ја инхибира иницијацијата на латералните корени. Исто така, ефектот на ауксините може да се антагонизира под дејство на абсцисинската киселина која го блокира клеточниот циклус за време на транзицијата од G1 до S фаза. На сличен начин, цитокинините ја инхибираат иницијацијата на латералните преку блокирање на транзицијата на клеточниот циклус од G2 до M фаза. Во тој контекст, експресијата на гените за биосинтеза на цитокинини во клетките на перициклот ја нарушуваат клеточната делба и го редуцираат формирањето на латералните корени. Цитокинините индуцираат деградација на PIN1 протеините, при што настанува намалување на содржината на ауксини во меристемските клетки. Од друга страна, деградацијата на цитокинини во клетките на перициклот ја зголемува иницијацијата на латерални корени.



Слика 2.17 Процес на формирање на латерални корени.

2.8.4 Одложување на абсцисија на листови

Отпаѓањето на листовите, цветовите и плодовите од живите растенија се нарекува **абсцисија**. Овие растителни органи отпаѓаат од одреден регион кој се нарекува **зона на абсцисија**, која се наоѓа во близина на лисната дршка. Процесот на абсцисија на листовите кај растенијата започнува со диференцијација на посебен клеточен слој познат како **слој на абсцисија** во рамки на зоната на абсцисија. За време на сенесценција на листовите настанува деградација на клеточните сидови на клетките во слојот на абсцисија кои стануваат меки и слаби. На таков начин, листовите отпаѓаат како резултат на омекнатите и слаби клеточни сидови од слојот на абсцисија.

Младите листови се карактеризираат со висока содржина на ауксини, која прогресивно се намалува кај зрелите листови, а сенесцентните листови пред да отпаднат имаат ниска содржина на ауксини. Улогата на ауксините при абсцисија на листовите може да се потврди преку отстранување на зрела лиска од зрел лист, а лисната дршка се остава интактна на стеблото. Отстранувањето на лиската го забрзува процесот на формирање на слој на абсцисија во лисната дршка. Од друга страна пак, апликацијата на ланолинска паста со IAA на пресечената површина од лисната дршка го спречува формирањето на слојот на абсцисија. Овие експерименти потврдуваат дека:

- транспортираните ауксини од лиската ја спречува абсцисијата на листот,
- абсцисијата се индуцира за време на сенесценција на листовите кога се намалува продукцијата на ауксини.

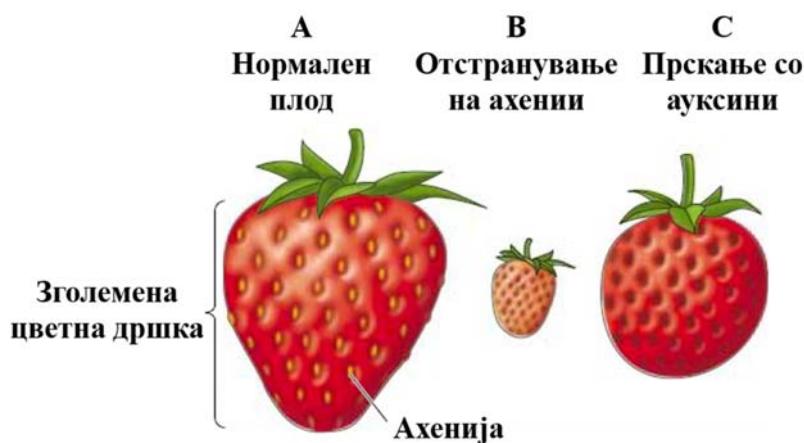
Важно е да се напомене дека етиленот претставува позитивен регулатор на абсцисијата на листовите.

2.8.5 Развитие на цветни пупки

Поларниот транспорт на ауксини има големо влијание врз активноста на цветниот меристем и развиток на цветот. Во тој контекст, *pin1* мутантот на *Arabidopsis* кој не поседува протеини за ефлукс на ауксини има абнормални цветови. Ова покажува дека отсуството на протеини за ефлукс на ауксини предизвикува прекинатото снабдување на цветниот меристем со ауксини и нарушување на нормалниот развиток на цветови. Протеинот PIN1 кодира трансмембрански протеин кој е локализиран на базалниот регион на клетките и учествува во ефлуксот на ауксините. Сепак, нарушувањето на ауксинскиот поларен транспорт не ја спречува транзицијата од вегетативен кон репродуктивен раст, бидејќи *pin1* мутантите сè уште формираат соцветија. Третманот на растенијата со инхибитори на поларниот ауксински транспорт (NPA) води кон формирање на игличесто соцветие. Според тоа, инхибицијата на поларниот транспорт на ауксини води кон акумулација на ауксини во меристемот до одредена концентрација која е инхибиторна за формирање на нови примордии.

2.8.6 Стимулирање на развиток на плодови

Голем број истражувања потврдуваат дека ауксините учествуваат во регулација на развиток на плодови. Ауксините се продуцираат во поленот, ендоспермот, како и во ембрионот на семето и се претпоставува дека опрашувањето претставува иницијален сигнал за раст на плодот. Опрашувањето стимулира раст на семеновиот зачеток, при што започнува развиток на плодот. По оплодувањето, растот на плодот може да зависи од ауксините кои се синтетизираат во семињата. За време на иницијалниот стадиум на раст на плодот, ендоспермот на семето има значен придонес во снабдувањето со ауксини. Во натамошниот период од развитокот на плодот, главен извор на ауксини претставува ембрионот во фаза на растење. Влијанието на ауксините кои се продуцираат од ахениите на плодовите од јагодата врз растот на цветната дршка се прикажани на [Сл. 2.18](#).



Слика 2.18 Плодот од јагода претставува зголемена цветна дршка, чиј раст се регулира под дејство на ауксините кои се продуцираат од „семињата“ кои претставуваат ахении како вистински плодови (А). При отстранување на ахениите се спречува нормалниот раст на цветната дршка (В). Прскањето на цветната дршка без ахении со индол-3-оцетна киселина (IAA) овозможува нормален раст и развиток на цветната дршка (С).

2.8.7 Диференцијација на васкуларни ткива

Локализираните и транспортираните ауксини имаат клучна улога во диференцијацијата на васкуларните ткива, особено на ксилемските елементи (ксилогенеза). Кај растечко стебло или корен, прокамбијалните снопчиња се диференцираат акропетално, односно кон врвот на изданокот или коренот, соодветно. Исто така, во овие прокамбијални снопчиња се одвива акропетално диференцирање на примарните ксилемски и флоемски елементи.

Ефектот на ауксините врз ксилогенезата има двојно значење:

- ауксините делуваат како сигнал за индукција на васкуларни ткива,
- „канализацијата“ на ново диференцирани васкуларни снопчиња водат кон поларен транспорт на ауксини.

1. Локализираниот ефект на ауксините во индукција на ксилогенеза може да се потврди преку апликација на ауксини на експлантат кој потекнува од различни растенија. Во такви услови, додавањето на соодветни концентрации на IAA или NAA во хранливиот медиум кој содржи експлантати од различни растенија води кон диференцијација на трахеидни елементи. Првата фаза при васкуларна диференцијација е дедиференцијација на зрелите клетки, а втората фаза на индукција на васкуларните елементи ја регулираат ауксините и цитокинините. Ауксините се неопходни за процесот на ксилогенеза без да се одвива поларниот транспорт на ауксини на долги растојанија.

2. Ксилогенезата кај повредени ткива од интактно растение го прикажува значењето на поларниот транспорт на ауксините врз ксилогенезата. Формираниот градиент на ауксините преку базипеталниот транспорт ја регулира диференцијацијата на васкуларното ткиво во изданокот. Новите васкуларни елементи се развиваат во насока на претходно постоечки васкуларни снопчиња и потоа се спојуваат со нив (Сл. 2.19). Повреденото место во стеблото функционира како извор на ауксини, а постоечкото васкуларно ткиво во стеблото делува како резервоар на ауксини. Овој модел на извор-резервоар се нарекува „канализациски модел“ за проток на ауксините кој води кон повторно воспоставување на континуирани снопчиња на васкуларни елементи.



Слика 2.19 Диференцијација на ксилемот (ксилогенеза) се одвива околу повредата на растителното ткиво, при што се следи правецот на транспортот на ауксините.

Процесот на ксилогенеза опфаќа радијална експанзија на клетките, акумулација на секундарен клеточен сид, лигнификација и постепена деградација на јадрото и цитоплазматаската содржина. Исто така, ауксините имаат улога и во крајната фаза од ксилогенезата (губење на клеточната содржина и клеточна смрт) преку индуцирана биосинтеза на етилен.

2.9 Влијание на ауксини кај растителни *in vitro* култури

Ауксините имаат широка примена при култивирање на растителни ткива и органи во *in vitro* услови и претставуваат значајна компонента во хранливиот медиум. Ауксините во комбинација со цитокинините стимулираат раст на калуси, клеточни суспензии и органи, а можат да го регулираат и правецот на морфогенеза.

Клеточната делба се регулира преку комбинирано дејство на ауксините и цитокинините кои влијаат врз различни фази од клеточниот циклус. Ауксините влијаат врз репликацијата на DNA, а цитокинините ги контролираат процесите кои водат до митоза. Нормалните клеточни делби зависат од синхронизацијата помеѓу S фазата и клеточната делба, што покажува дека е неопходно да се оптимизираат концентрациите на ауксини и цитокинини во хранливиот медиум. Недостатокот на ауксини кај култури на клетки може да предизвика запирање на клеточниот циклус во G2 фаза, додека пак, отсуството на цитокинини го оневозможува влегувањето на клетките во фаза на митоза.

Изборот на ауксини и нивната концентрација во хранливата подлога зависи од:

- типот на раст или развој на растителните ткива или органи,
- степенот на примање и транспорт на аплицираните ауксини од експлантатите,
- инактивација (оксидација или конјугација) на ауксините во хранливиот медиум и во самиот експлантат,
- природната содржина на ендогено синтетизирани ауксини во експлантатот,
- сензитивноста на растителното ткиво кон ауксините и другите фитохормони,
- интеракцијата помеѓу аплицираните ауксини и природните ендогени соединенија во растителното ткиво.

При ниски концентрации (0,1 - 10 μM), ефектот на ауксините се зголемува со зголемување на нивната концентрација, а високите концентрации ($> 10 \mu\text{M}$) најчесто имаат инхибиторен ефект. Овој инхибиторен ефект на ауксините најчесто се поврзува со зголемување на продукцијата на етилен при висока концентрација на ауксини.

2.9.1 Стабилност на ауксини во хранлив медиум

Ауксинот IAA и до одреден степен IBA се термолабилни соединенија кои се деградираат за време на автоклавирањето. Исто така, ауксинот IAA е нестабилен во хранливиот медиум на собна температура. Во услови на темно, содржината на IAA во хранливиот медиум без инокулиран растителен материјал може да се намали за повеќе од 10 пати за време од 1 месец. Степенот на намалување на содржината на IAA се забрзува во присуство на светлина и минерални MS соли. Така на пр., содржината на IAA во течен MS медиум при фотопериод од 16 часа се намалува од $1,75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ до $0,05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ за време од 2 недели. Стабилноста на IAA во цврстиот медиум е значајно повисока во споредба со течниот медиум, бидејќи кислородот учествува во реакциите на оксидативна деградација. Од друга страна, IBA е постабилен ауксин во споредба со IAA, бидејќи 75% од вкупната содржина на IBA останува непроменета за време од 1 месец. Синтетските ауксини NAA и 2,4-D не подлежат на процеси на оксидација. Сепак, апсорпцијата на синтетските ауксини од растителните ткива овозможува нивна брза деградација или конјугација и лесна подложност на ензимски модификации.

2.9.2 Ефект на синтетските ауксини врз содржината на IAA

Синтетските ауксини кои егзогено се аплицираат во хранливиот медиум за култивирање на растителните ткива значајно влијаат врз ендогената содржина на IAA.

Ендогената содржина на IAA може значајно да се намали во присуство на 2,4-D, дури и при зголемување на достапноста на аминокиселината триптофан како прекурсор во биосинтезата на IAA. Овие податоци покажуваат дека 2,4-D директно интерферира во биосинтезата на IAA или ги интензивира реакциите на конјугација/деградација на IAA. Од друга страна пак, намалувањето на екзогената концентрација на 2,4-D и NAA овозможува зголемување на ендогената концентрација на слободната форма на IAA кај култури на клетки од тутун. Се претпоставува дека индолните синтетски ауксини имаат протективно дејство врз IAA од природна деструкција преку конкуренција со ензимите IAA оксидази/пероксидази.

2.9.3 Примање и метаболизам на ауксини кај растителни *in vitro* култури

Ауксинот IAA и синтетските ауксини NAA и 2,4-D во хранливиот медиум брзо се примаат од страна на култивираниите ткива при pH вредност од 5-6. Овие ауксини се апсорбираат во клетките како цели молекули преку дифузија или со помош на протеински транспортери. Сепак, дисоцијација на ауксините предизвикува нивно задржување во клетките, бидејќи плазмалемата е непропустлива за анјонските форми на ауксините. Ефлуксот на анјоните на IAA и NAA од клетките може да се изврши само со помош на протеините за ефлукс. Покрај примањето на ауксините преку површината на растителните ткива, овие фитохормони можат да се примаат и со дифузија преку повредените површини. Притоа, степенот на примање на ауксини од растителните експлантати е пропорционално со нивната концентрација во хранливиот медиум.

2.9.4 Влијание на ауксини врз раст на калусни култури

Ауксините се неопходни фитохормони за индукција на калуси од растителните експлантати. Аплицираните ауксини во хранливиот медиум имаат способност да ја нарушат генетски програмираната физиологија и претходно диференцираната состојба на растителните ткива. Клетките реагираат на ауксините на таков начин што преминуваат во дедиференцирана состојба и започнуваат активно да се делат. Всушност, ауксините предизвикуваат зголемен степен на метилација на DNA на клетките, при што настанува репрограмирање на диференцираните клетки. Според тоа, хиперметилацијата предизвикува дедиференцијација на клетките кои во недиференцирана состојба можат да добијат способност за натамошна морфогенеза или ембриогенеза. Најчесто користен ауксин за иницијација на калуси е 2,4-D. Сепак, калусните култури кои се одржуваат на 2,4-D покажуваат висок степен на соматска варијабилност и затоа се препорачува користење на NAA или IAA. За индукција на калуси од експлантати на дикотиледони растенија најчесто се користи комбинација од ауксини и цитокинини. Индукцијата на калуси кај монокотиледоните може да се постигне само со примена на висока концентрација на ауксини без присуство на цитокинини. Важно е да се напомене дека ауксините стимулираат дисперзија на клетките во суспензија, а цитокинините предизвикуваат клеточна агрегација. Цитокинините имаат стимулативно дејство врз формирање на хлорофил кај калусните култури, додека пак, ауксините имаат инхибиторен ефект врз синтезата на хлорофил. Така на пр., присуството на 2,4-D во хранливиот медиум ја намалува продукцијата на хлорофил кај калусни култури од грашок, домати и компир. Исто така, високата концентрација на IAA во хранливиот медиум го инхибира развитокот на хлоропласти кај калуси од цикорија (*Cichorium intybus*). Сепак, ауксините IAA и NAA имаат понизок инхибиторен ефект врз синтезата на хлорофил во споредба со 2,4-D.

2.9.5 Влијание на ауксини врз култури на органи

Ауксините се користат како фитохормони за иницијален раст на меристеми на корени или изданоци. Често пати, цитокинините се користат за мултипликација на културите на изданоци. Исто така, високата концентрација на цитокинини во комбинација со ниска концентрација на ауксини се применуваат за ефикасна мултипликација на изданоци. При мултипликацијата, неопходно е да се користи соодветна концентрација на ауксини која ќе обезбеди раст на културите без да се индуцира калусно ткиво во основата на изданоците.

Ризогенезата (вкоренување) на изданоците може да се постигне преку оптимизирање на содржината на ауксини и цитокинини во хранливиот медиум. Сепак, ризогенезата најчесто се индуцира само во присуство на ауксини, бидејќи цитокинините можат да го инхибираат развитокот на корени.

Важно е да се напомене дека некои растителни органи, ткива или клетки имаат способност да растат без присуство на ауксини во хранливиот медиум и овие растителни култури се означуваат како **автономни** или **хабитуирани култури на ауксини**.

2.9.6 Влијание на ауксини врз соматска ембриогенеза

Процесот на соматска ембриогенеза често пати се индуцира на медиум кој содржи висока концентрација на 2,4-D. Сепак, натамошниот развиток на формираните ембриони се инхибира ако не се редуцира концентрацијата на ауксини во медиумот. Всушност, ауксините индуцираат ембриогена детерминација на клетките од калуси или клеточни суспензии, а истовремено спречуваат овие индуцирани клетки да се развијат во ембриони. Од друга страна пак, постојат голем број примери за успешна индукција на соматски ембриони на медиум со ниска концентрација на ауксини, дури и без присуство на ауксини. Се претпоставува дека ембриогенезата зависи од високата содржина на ендогени ауксини во клетките, а подоцна оваа концентрација на ауксини се редуцира од страна на клеточниот метаболизам со цел да се овозможи развиток на ембрионите.

3. ЦИТОКИНИНИ

Цитокинините се регулатори на растот на растенијата кои ја стимулираат клеточната делба (цитокинеза). Исто така, цитокинините имаат значајно влијание врз развитокот на растенијата и голем број физиолошки процеси, како сенесценција на листови, мобилизација на хранливи материи, апикална доминација, формирање на апикални меристеми на изданок, развиток на цветови, прекинување на дорманција на пупки и ртење на семе. Цитокинините можат да влијаат врз некои процеси на развиток кои се поврзани со светлината (диференцијација на хлоропласти, раст на листови).

3.1 Откривање на цитокинините

Првиот цитокинин бил откриен од DNA на сперматозоиди кај харинга (риба од родот *Clupea*) од страна на Miller и сор., (1955). Во средината на минатиот век биле испитувани голем број соединенија за нивната способност за одржлива пролиферација на култивирани ткива од тутун. Експериментите потврдиле дека егзогената апликација на автоклавирана DNA од сперматозоиди на харинга во вештачки хранлив медиум ја стимулира клеточната делба на клетките од тутун. Според тоа, деградационите производи на DNA имаат стимулативен ефект врз клеточната делба кај култивирани растителни ткива. Соединението кое било идентификувано како стимулатор на клеточните делби било именувано како **кинетин**, а подоцна како **6-фурфуриламинопурин** (Сл. 3.1). Кинетинот е природно соединение кое не се синтетизира кај растенијата и затоа се означува како синтетски цитокинин.

3.2 Природни и синтетски цитокинини

Во подоцнежните истражувања, од незрелиот ендосперм на пченка (*Zea mays*) било изолирано соединение со слична биолошка активност како и кинетинот. Ова соединение покажало стимулативен ефект врз делбата на култивирани растителни клетки и било идентификувано како **зеатин** [*trans*-6-(4-хидрокси-3-метил-2-бутениламино) пурин]. Поради присуството на двојна врска во страничниот синцир, молекулот на зеатин поседува две конфигурации познати како *cis*- и *trans*-изомери (Сл. 3.1), кои можат да интерконвертираат под дејство на ензимот *cis-trans* изомераза. Притоа, *trans*-изомерот на зеатинот има повисока биолошка активност, а неговиот *cis*-изомер се наоѓа во повисока концентрација кај растенијата, особено во семињата од *Cicer* (леблебија). Препаратите од морски треви се користат за стимулирање на растот на растенијата во *in vitro* услови бидејќи претставуваат богат извор на природен *cis*-зеатин.

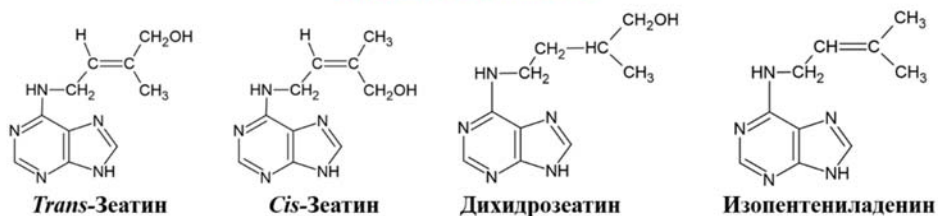
Денес се изолирани голем број природни цитокинини, како што се **зеатин**, **изопентениладенин (iPA)** и **дихидрозеатин** (Сл. 3.1). Дихидрозеатинот како природен метаболит на зеатинот поседува цитокининска активност кој не подлежи на оксидација поради неговиот заситен страничен синцир и затоа се смета како резервна форма на зеатинот. Цитокининот iPA во растителните ткива може да се конвертира во зеатин.

Голем број синтетски соединенија биле испитувани за нивната цитокининска активност, како што се **бензиладенин** или **бензиламинопурин (BAP)**, ***N,N'*-дифенилуреа** и **тидiazурон (TDZ)**, (Сл. 3.1).

Според хемиската структура, цитокинините се поделени во две основни групи:

- **деривати на пуринската база аденин** (зеатин, дихидрозеатин, изопентениладенин, бензиладенин и кинетин),
- **деривати на фенилуреа** (*N,N'*-дифенилуреа и тидiazурон).

Природни цитокинини

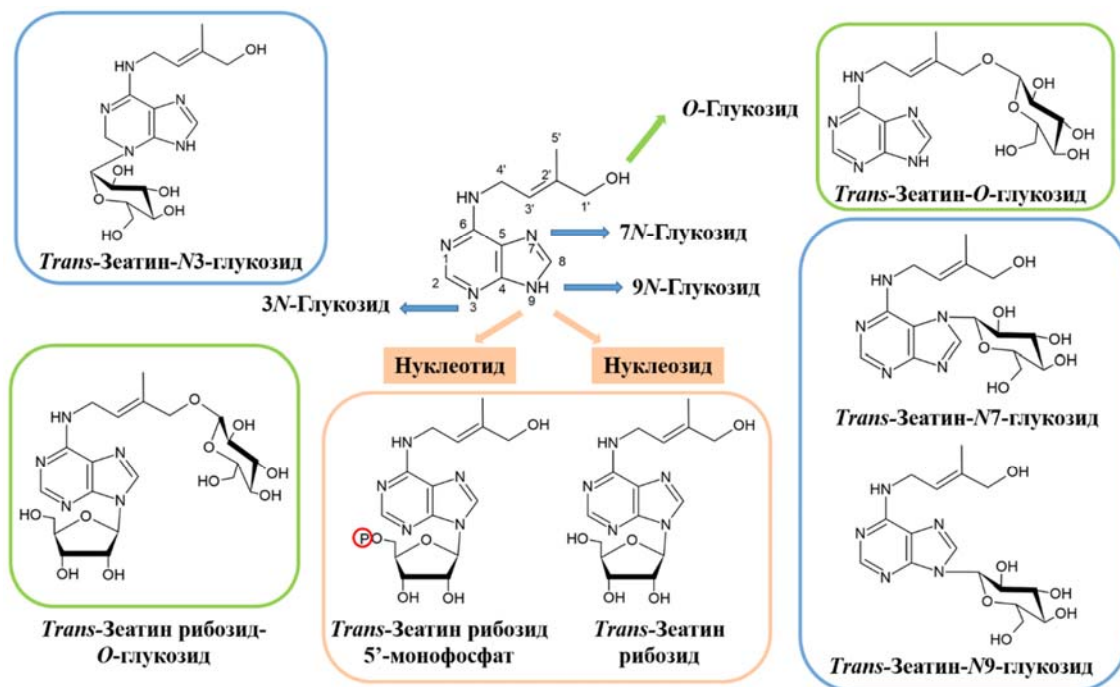


Синтетски цитокинини



Слика 3.1 Структура на природни и синтетски цитокинини.

Цитокинините се застапени кај сите растителни видови во слободна или конјугирана форма. Конјугираните цитокинини (Сл. 3.2) можат да бидат присутни во форма на **нуклеозиди** или **рибозиди** (моносахаридот рибоза е поврзана за атомот N₉ од пуринскиот прстен), **нуклеотиди** или **риботиди** (рибозата содржи фосфатна група) или **гликозиди** (дополнителен јаглехидрат е поврзан за атомите N₃, N₇ или N₉ од пуринскиот прстен). Богат извор на цитокинини претставува кокосовото млеко кое содржи висока концентрација на *trans*-зеатин рибозид.



Слика 3.2 Конугирани форми на цитокинини.

Слободните цитокинини можат да се секретираат од страна на некои фитопатогени бактерии, како *Corynebacterium fascians* и *Agrobacterium tumefaciens*. Така на пр., бактеријата *A. tumefaciens* може да предизвика инфекција на повредени растителни ткива и да индуцира **тумори на вратот на коренот** кај растенијата (Сл. 3.3). Исто така, бактеријата *C. fascians* е главен предизвикувач на абнормален раст кај растенијата познат како **“вештерска метла”**, при што се стимулира растот на латералните пупки под дејство на бактериските цитокинини (Сл. 3.3).



Слика 3.3 Прекумерната експресија на цитокинини предизвикува формирање на туморно ткиво (А) и абнормално локализиран меристеми или “вештерска метла” (В).

3.3 Биотестови за докажување на активноста на цитокинините

Активноста на цитокинините врз стимулирањето на клеточната делба претставува основа за спроведување на различни биотестови.

1. Културите на срцевина од стебло кај тутун можат да се користат како биотест за цитокинините. Активноста на цитокинините врз клеточната делба се докажува преку зголемување на свежата биомаса на овие култури во присуство на цитокинини во споредба со контролните култури.

2. Одложување на сенесценција на листови. Цитокинините ја одложуваат сенесценцијата на листовите преку инхибирање на деградацијата на хлорофил. Активноста на цитокинините може да се докаже преку одложена сенесценција на лисни дискови во раствор со цитокинин за време од 48-72 часа во споредба со контролата.

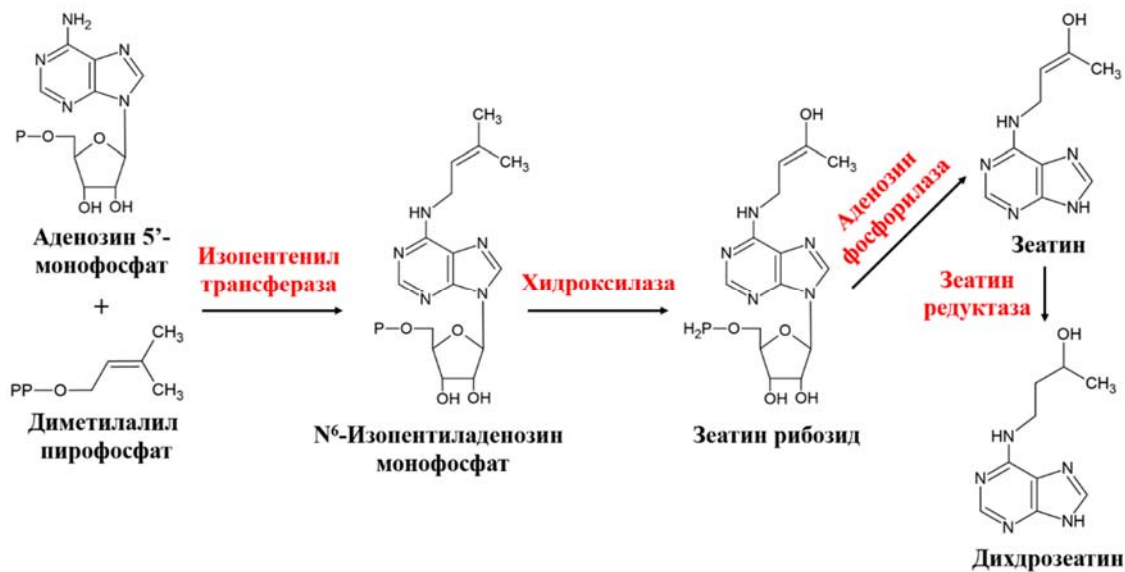
3. Експанзија на изолирани котиледони. Активноста на цитокинините може да се потврди и преку зголемување на изолирани котиледони кои се поставени во раствор со цитокинин во споредба со контролни котиледони.

3.4 Биосинтеза на цитокинини

Биосинтетскиот пат на цитокинините (Сл. 3.4) започнува со пренесување на изопентенилска група од **диметилалил пирофосфат (DMAPP)** на **аденозин 5'-монофосфат (5'-AMP)** под дејство на ензимот изопентенил трансфераза (IPT), при што се формира **N⁶-изопентиладенозин монофосфат (iPMP)**.

Конверзијата на DMAPP и AMP во iPMP се одвива во пластидите, бидејќи изопреноидното соединение DMAPP се синтетизира во овие клеточни органели. Потоа настанува хидроксилација на страничниот синџир на iPMP под дејство на ензими од групата на цитохром P450 монооксигеназа и се добиваат соединенија со структура на **зеатин**, како што е **зеатин рибозид**. Овие реакции на хидроксилација се одвиваат во мембраните на ендоплазматскиот ретикулум. Со посредство на ензимите од

метаболизмот на пурините (аденозин фосфорилаза), зеатин рибозидот може да се конвертира во **trans**- или **cis**-зеатин. Ензимот зеатин редуктаза катализира редукција на двојната врска на изопентенилскиот страничен синцир од зеатинот, при што се формира **дихидрозеатин** (Сл. 3.4).



Слика 3.4 Биосинтеза на цитокинини.

3.5 Транспорт на цитокинини

Главно место за биосинтеза на цитокинините кај растенијата е апикалниот меристем на коренот. Всушност, клетките од базалниот меристем претставуваат важно место за биосинтеза на цитокинините. Синтетизираните цитокинини се транспортираат преку ксилемот во изданоците заедно со водата и минералните материи. При отстранување на изданокот од вкоренето растение, ксилемскиот сок продолжува да се секретира од кореновиот систем. Притоа, транспортот на ксилемскиот сок продолжува да се одвива без да се намали концентрацијата на цитокинини. Ова претставува главен доказ дека цитокинините се синтетизираат во корените. Некои надворешни фактори, како што е водениот стрес може значајно да ја намали содржината на цитокинини во ксилемскиот ексудат. Исто така, цитокинините се синтетизираат и во други активно растечки растителни органи, како на пр., млади ембриони во семето, млади листови и плодови.

Цитокинините во ксилемскиот ексудат главно се транспортираат во форма на зеатин рибозид до листовите, каде што овие нуклеозиди се конвертираат во слободни бази или гликозилирани деривати. Цитокининските гликозиди можат да се акумулираат во висока концентрација во листовите и семињата. Сепак, цитокининските гликозиди не поседуваат цитокининска активност поради тоа што се акумулираат во различни компартмани и на таков начин се ограничува нивната достапност до целните клетки.

3.6 Конјугација и деградација на цитокинини

Хомеостазата на цитокинините во растителните клетки се регулира преку процесите на транспорт, конјугација, синтеза и деградација. Слободните цитокинини можат да се конвертираат во нивните соодветни нуклеозиди и нуклеотиди под дејство на ензимите од метаболизмот на пурини. Голем број растителни ткива го содржат ензимот

цитокинин оксидаза кој врши разградување на страничниот синџир на цитокинините зеатин, зеатин рибозид, изопентениладенин и нивните *N*-гликозиди (Сл. 3.5). Цитокинините со заситен страничен синџир како дихидрозеатин и неговите конјугати не подлежат на деградација од страна на цитокинин оксидаза. Ензимот цитокинин оксидаза иреверзибилно ги инактивира цитокинините и на таков начин се регулираат ефектите на цитокинините. Активноста на цитокинин оксидаза се индуцира при висока концентрација на цитокинини во растителните ткива.



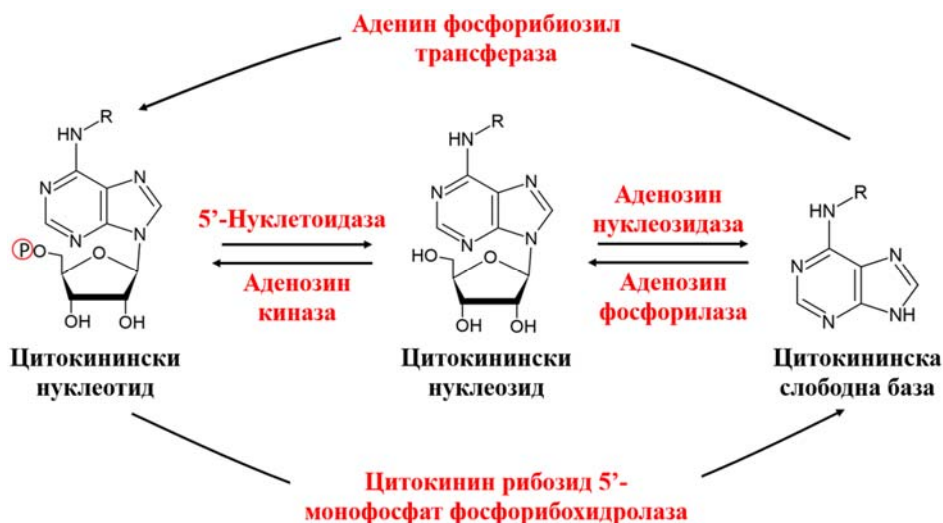
Слика 3.5 Деградација на цитокинини.

Содржината на цитокинини може да се регулира и преку конјугација на овие фитохормони на различни позиции. Конјугацијата се одвива преку поврзување на цитокинините со јаглехидрати или аминокиселини. Гликозилацијата на цитокинините (Сл. 3.2) може да настане на позиција N-3, N-7 или N-9 од структурата на аденинот (*N*-гликозилација) или на ОН групата од изопентенилскиот страничен синџир (*O*-гликозилација). Притоа, *N*-гликозилацијата е иреверзибилен процес и резултира со инактивација на цитокинините, додека пак, *O*-гликозилацијата може да биде реверзибилен процес. При *O*-гликозилација на цитокинините (Сл. 3.2) најчесто се врши адиција на молекули на глукоза или ксилоза и овие гликозидни цитокинини се резистентни на деградација под дејство на цитокинин оксидазите. Конјугацијата со аминокиселини претставува реверзибилна реакција и најчесто се одвива преку адиција на аланин на позицијата N-9. Важно е да се напомене дека конјугираните форми на цитокинините не покажуваат цитокининска активност.

Конјугацијата на страничните синџири на цитокинините може да се елиминира под дејство на ензимите β -глукозидази, при што се добиваат слободни форми на цитокинините кои покажуваат биолошка активност. Дормантните семиња најчесто содржат висока содржина на цитокинински гликозиди, а ниска содржина на слободни цитокинини. При иницијација на процесот на ртење на семето се активираат ензимите гликозидази кои предизвикуваат рапидно зголемување на содржината на слободни цитокинини, а намалување на цитокининските гликозиди. Реверзибилната модификација на цитокинините преку адиција на јаглехидрати или аминокиселини претставува важен механизам за создавање на резервни форми, бидејќи конјугираните цитокинини се акумулираат во вакуолата.

Егзогено аплицираните цитокинински азотни бази и нуклеозиди кај растенијата брзо се метаболизираат до соодветни нуклеотиди, а потоа до други форми (Сл. 3.6). Формирањето на нуклеотидите има клучна улога во метаболизирањето на егзогените цитокинини во растителните клетки. Реакциите на интерконверзија на цитокининските азотни бази, нуклеозиди и нуклеотиди се одвиваат под дејство на ензими од биосинтетскиот пат на пурините. Ензимот аденин фосфорибозилтрансфераза ја катализира конверзијата на слободните цитокинински бази во соодветни нуклеотиди. Ензимот аденозин киназа врши фосфорилација на цитокининските нуклеозиди до соодветни нуклеотиди. Исто така, ензимот аденозин фосфорилаза катализира конверзија

на цитокининските бази до соодветни нуклеозиди. Ензимите 5'-нуклеотидаза и нуклеозидаза катализираат формирање на соодветни цитокинински нуклеозиди и слободни бази, соодветно.



Слика 3.6 Интерконверзија на цитокинински азотни бази, нуклеозиди и нуклетоди.

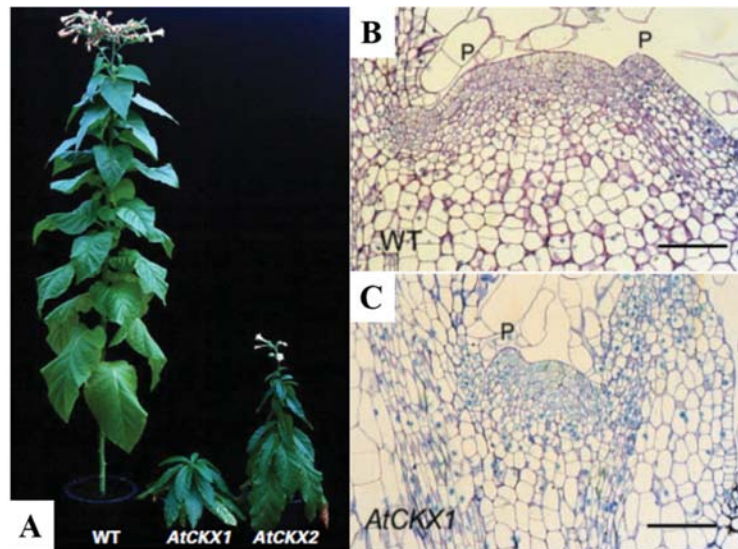
Цитокинин рибозид 5'-монофосфат фосфорибохидролаза е специфичен ензим од метаболизмот на цитокинините кој овозможува ослободување на слободните бази од нуклетодите (Сл. 3.6).

3.7 Физиолошко дејство на цитокинини

3.7.1 Клеточна делба

Присуството на ауксини во вештачкиот хранлив медиум предизвикува зголемување на растителните клетки, меѓутоа клетките не се делат. Егозгената апликација на цитокинини во хранливиот медиум индуцира делба на клетките и нивна диференцијација. Според тоа, присуството на ауксини и цитокинини во иста концентрација предизвикува формирање на недиференцирани калусни ткива. Притоа, зголемувањето на концентрацијата на цитокинини во хранливиот медиум индуцира раст на изданоци, а зголемувањето на концентрацијата на ауксини стимулира формирање на корени.

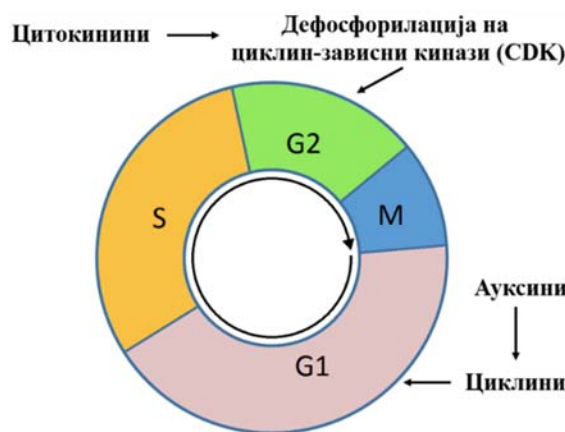
Индуцираната експресија на *ipt* генот (кодира ензим изопентенил трансфераза) кој е одговорен за зголемена синтеза на цитокинини во растителните клетки предизвикува формирање на ектопични меристеми (абнормално локализирани меристеми). Според тоа, зголемената концентрација на цитокинини е неопходна за иницијација на клеточни делби. Од друга страна пак, прекумерната експресија на гените за цитокинин оксидаза (*AtCKX1* и *AtCKX2*) предизвикува намалување на ендегената содржина на цитокинини во растителните ткива. На таков начин се инхибира растот на изданоките преку намалување на клеточната делба во апикалниот меристем на изданокот (Сл. 3.7). Сите овие податоци покажуваат дека ендегените цитокинини имаат значајна улога во регулација на клеточната делба.



Слика 3.7 Фенотип на див-тип растенија (WT) и трансформирани растенија од тутун (*Nicotiana tabacum*) со прекумерна експресија на гените *AtCKX1* и *AtCKX2* за цитокинин оксидаза (A). Апикален меристем на изданок кај див-тип тутун (B) и трансформиран тутун со прекумерна експресија на генот *AtCKX1* (C).

3.7.2 Регулација на клеточниот циклус

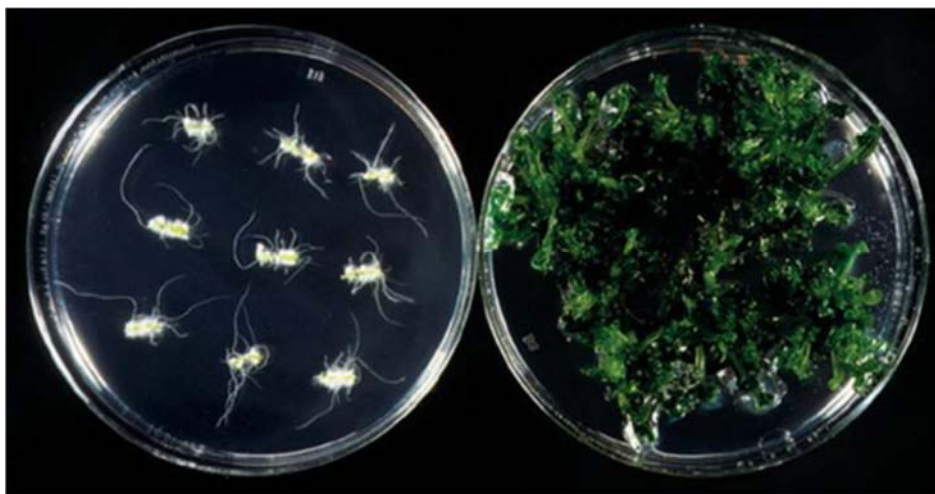
Цитокинините ја регулираат пролиферацијата на клетките и влијаат врз процесот на митоза. Всушност, цитокинините во комбинација со ауксините го контролираат клеточниот циклус при транзиција G1/S и G2/M. Ауксините и цитокинините учествуваат во регулацијата на клеточниот циклус преку контрола на активноста на циклин-зависните кинази (CDK). Ауксините ја регулираат експресијата на генот кој ги кодира CDK. Сепак, индуцираните CDK под дејство на ауксините не поседуваат ензимска активност. Затоа, цитокинините индуцираат отстранување на инхибиторната фосфатна група од CDK преку дефосфорилација и на токов начин настанува нивна активација. Ова дејство на цитокинините овозможува воспоставување на врска помеѓу цитокинините и ауксините во регулацијата на клеточниот циклус (Сл. 3.8).



Слика 3.8 Интеракција помеѓу ауксини и цитокинини во регулација на клеточниот циклус преку модификација на активноста на циклин-зависни протеин кинази (CDK) и циклази. G1-Фаза на раст, S-Синтеза на DNA, G2-Фаза на раст и подготовка за митоза, M-Митоза (клеточна делба).

3.7.3 Морфогенеза и формирање на латерални пупки

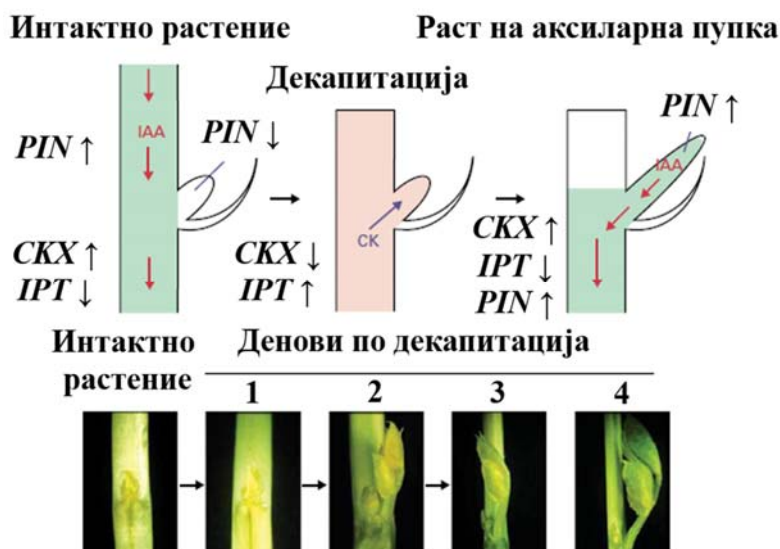
Ауксините и цитокинините имаат значајно влијание врз морфогенетските процеси кај растенијата. Во тој контекст, високиот однос ауксин:citoкинин стимулира формирање на корени, а нискиот однос ауксин:citoкинин индуцира развиток на изданоци (Сл. 3.9).



Слика 3.9 Калусно ткиво кај *Arabidopsis* може да се индуцира под дејство на ауксин (IBA) и цитокинин (*trans*-зеатин) во хранливиот медиум. Субкултивираното калусно ткиво на медиум во присуство на ауксин формира само корени (лево), а на медиум со цитокинини формира само изданоци (десно).

Цитокинините го регулираат растот на аксиларните (латерални) пупки и ја инхибираат апикалната доминација. Познато е дека синтезираните ауксини од апикалните пупки се транспортираат базипетално и го инхибираат растот на аксиларните пупки. На таков начин се стимулира растот на изданокот, а се ограничува латералното разгранување. Од друга страна пак, цитокинините се синтезираат во коренот и се транспортираат акропетално, при што го стимулираат растот на латералните пупки. Директната апликација на цитокинини на аксиларните пупки ги стимулира клеточните делби и растот на пупките. Отстранувањето на апикалната пупка (декапитација) го елиминира инхибиторниот ефект на ауксините врз растот на аксиларните пупки.

Моделот на интеракции помеѓу ауксините и цитокинините во контрола на апикалната доминација е прикажан на Сл. 3.10. Кај интактното растение, ауксинот индол-3-оцетна киселина (IAA) од апикалната пупка ја стимулира експресијата на *PIN1* (протеин за ефлукс на ауксини) и *CKX* (citoкинин оксидаза), а ја инхибира експресијата на *IPT* (изопентенил трансфераза). Ниската содржина на цитокинини кај интактното растение го спречува развитокот на аксиларната пупка. По 1 ден од декапитацијата се намалува содржината на IAA во стеблото, при што се зголемува експресијата на *IPT*, а се намалува експресијата на *PIN1*. *De novo* синтезираните цитокинини во стеблото се транспортираат во дормантната аксиларна пупка и се стимулира нејзиниот развиток. По растот на аксиларната пупка (2 дена по декапитацијата), *de novo* синтезата на IAA од новоформираниот апикален врв повторно ја инхибира експресијата на *IPT*, а ја индуцира експресијата на *CKX* и *PIN1*.



Слика 3.10 Интеракции помеѓу ауксини и цитокинини во контрола на апикалната доминација.

3.7.4 Одложување на сенесценција на листови

Цитокинините ја одложуваат сенесценцијата (стареењето) на растителните органи преку спречување на деградацијата на протеините, активирање на синтезата на протеини и искористување на хранливите соединенија од соседните ткива. Третманот на изолирани листови со цитокинини предизвикува одложување на сенесценцијата, при што третираните листови остануваат зелени долг временски период, а нетретираните листови од ист стадиум на развој добиваат жолта боја и опаѓаат (Сл. 3.11). Улогата на цитокинините врз сенесценцијата може да се испитува преку трансформација на растенија од тутун со химерен ген кој поседува специфичен промотор за експресија на *ipt* генот. Високата содржина на цитокинини кај трансформирани растенија го спречуваат стареењето, а натамошната експресија на *ipt* генот се намалува со цел да се оневозможи прекумерна продукција на цитокинини.



Слика 3.11 Трансгено растение од тутун со прекумерна експресија на *ipt* ген (лево) и див-тип на тутун (десно). Високата ендогена содржина на цитокинини кај трансформирани растенија ја инхибира сенесценцијата на листовите.

Третманот на етилоирани листови со цитокинини предизвикува развиток на хлоропласти со силно развиен гранален систем и интензивна синтеза на фотосинтетски ензими при осветлување на растенијата. Според тоа, цитокинините во комбинација со други фактори (светлина) ја регулираат биосинтезата на фотосинтетските пигменти и протеините.

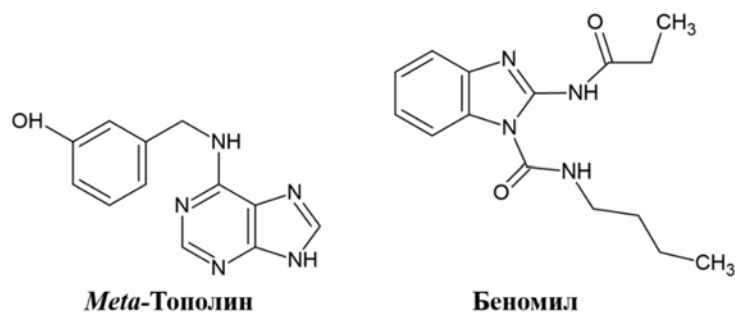
3.8 Влијание на цитокинини кај растителни *in vitro* култури

Цитокинините претставуваат есенцијална компонента во хранливиот медиум за мултипликација на растенијата во *in vitro* услови, а во комбинација со ауксините ја стимулираат клеточната делба и ја контролираат морфогенезата. Најчесто користени природни цитокинини во медиумот за култивирање на растителните клетки ткива се: *trans*-зеатин, изопентенил аденин (iP) и дихидрозеатин.

Ендогените цитокинини се присутни во интактните растенија, а изолираните растителни ткива и мали органи во *in vitro* услови немаат способност за синтеза на доволно количество на цитокинини за одржување на нивниот раст. Во тој контекст, ткивата и органите кај дикотиледоните растенија зависат од егзогената апликација на цитокинини во хранливиот медиум. Од друга страна пак, калусите и клеточните суспензии од монокотиледоните имаат способност да растат на медиум без присуство на ауксини и цитокинини поради високата ендогена содржина на зеатин, зеатин рибозид и iP. Според тоа, растот на растителните ткива на хранлив медиум без цитокинини се должи на способноста на клетките за продукција на доволни количества на природни цитокинини кои обезбедуваат клеточна делба.

3.8.1 Синтетски аналози на цитокинини

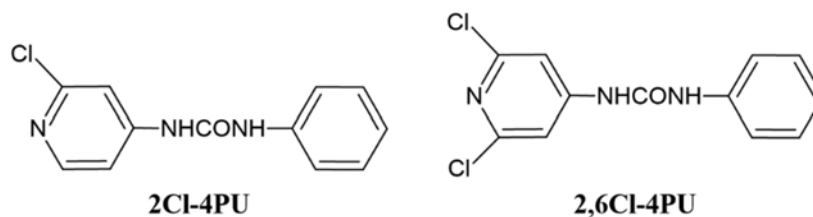
Супституирани пурински (аденински) цитокинини. Природните цитокинини iP и зеатин многу ретко се користат во комерцијалните лаборатории за размножување на растенијата поради нивната висока цена. За микропропагација на растенијата во *in vitro* услови најчесто се користат синтетски цитокинини, како што се кинетин и бензиладенин (BA). Постојат и други хемиски аналози на природните цитокинини кои претставуваат N₆-супституирани деривати на аденинот и се карактеризираат со висока цитокининска активност. Некои од овие хемиски аналози покажуваат повисока активност од кинетинот или BA и најчесто се користат за индукција на развиток на органи (морфогенеза). Така на пр., **тополините** како хидроксилирани деривати на BA се ароматични природни цитокинини кои можат да се користат во истражувачки цели за култивирање на растенија во *in vitro* услови (Сл. 3.12).



Слика 3.12 Структура на супституирани пурински цитокинини.

Некои соединенија со цитокининска активност имаат фунгицидни својства. Фунгицидот **беномил** (Сл. 3.12) кој има слична структура на пуринските цитокинини имаат способност за стимулирање на растот на калусни култури кај различни растителни видови. Сепак, неопходно е да се користат ниски концентрации од овие фунгициди со цитокининска активност бидејќи во висока концентрација можат да имаат фитотоксично дејство.

Фенилуреа-тип цитокинини. Природните цитокинини можат да се додаваат во хранливиот медиум за култивирање на растителни клетки и ткива во форма на органски комплекси, како што е квасочен екстракт или кокосово млеко. Кокосовото млеко содржи неколку биолошки активни природни цитокинини, како зеатин и *N,N'*-дифенилуреа. Сепак, најчесто користени фенилуреа-тип цитокинини кои индуцираат клеточна делба кај култури на калуси се ***N,N'*-дифенилуреа**, **тидиазурон** и други фенилуреа-супституирани деривати. Кај некои растителни видови, тидиазуронот (*N*-фенил-*N'*-1,2,3-тиадиазол-5-ил уреа) покажува повисока ефикасност во регенерација на адвентивни изданоци во споредба со пуринските цитокинини бензиалденин и кинетин. Иако TDZ покажува висок капацитет за мултипликација на изданоци, формираните изданоци се карактеризираат со хиперхидрираност, слаб квалитет и ограничен капацитет за елонгација. Тидиазуронот е прифатен како ефикасен цитокинин за комерцијална микропропагација на дрвенести растенија од фамилијата Oleaceae. Останати фенилуреа-тип цитокинини кои се користат за култивирање на растенијата во *in vitro* услови се (Сл. 3.13): **2Cl-4PU** или *N*-(2-хлоро-4-пиридил)-*N'*-фенилуреа и **2,6Cl-4PU** или *N*-(2,6-дихлоро-4-пиридил)-*N'*-фенилуреа).



Слика 3.13 Структура на фенилуреа-супституирани цитокинини.

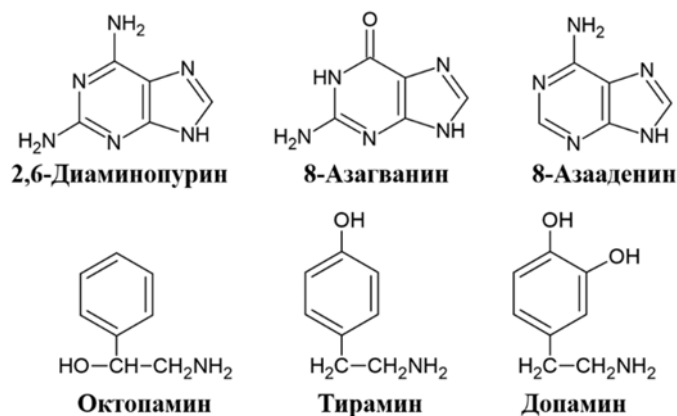
Фенилуреа-супституираните цитокинини имаат исти целни места на дејство во растителните клетки како и пуринските цитокинини поради нивните слични структури карактеристики и воспоставувањето на ист тип на интеракции со цитокининските рецептори. Фенилуреа-супституираните цитокинини можат да ја стимулираат акумулацијата на ендогените пурински цитокинини поради тоа што претставуваат инхибитори на ензимот цитокинин оксидаза.

3.8.2 Антагонисти на цитокинини

Некои хемиски аналози на азотните бази од RNA можат да имаат антагонистичко дејство врз цитокинините. Главни антагонисти на цитокинините се **2,6-диаминопурин**, **8-азагванин** и **8-азааденин** кои имаат способност да го инхибираат растот на растителните клетки (Сл. 3.14).

Антагонистите на цитокинините можат реверзибилно да го стопираат растот на клетките кои зависат од присуството на цитокинини. Инхибиторниот ефект на овие антагонисти може да се елиминира под дејство на ВА. Важно е да се напомене дека цитокининските антагонисти имаат инхибиторен ефект врз растот само кај калусни клетки кои имаат способност за делба. Од друга страна пак, калусните клетки во

стационарна фаза кои немаат способност за делба не се сензитивни кон дејството на цитокининските антагонисти. Според тоа, цитокининските антагонисти најверојатно влијаат врз специфични биохемиски процеси од клеточниот циклус.



Слика 3.14 Структура на антагонисти на цитокинини.

Иако цитокининските антагонисти ја инхибираат клеточна делба, овие соединенија немаат антагонистички ефекти врз останатите физиолошки процеси кои се под контрола на цитокинините (иницијација и раст на аксиларни изданоци). Исто така, антицитокининска активност поседуваат некои соединенија кои се слични на **октопаминот**, како што се невротрансмитерите **тирамин** и **допамин** (Сл. 3.14).

3.8.3 Ефект на цитокинини врз раст и морфогенетски процеси

Клеточна делба. Клеточната делба се регулира преку комбинирано дејство на ауксини и цитокинини, при што секоја класа од овие соединенија влијаат врз различни фази од клеточниот циклус. Ауксините влијаат врз репликацијата на DNA, а цитокинините влијаат врз процесите кои водат кон митоза. Според тоа, ауксините се сметаат како иницијатори на клеточниот циклус, а цитокинините претставуваат промотори на клеточниот циклус. Нормалните клеточни делби зависат од синхронизација помеѓу S фазата и клеточната делба од клеточниот циклус, што покажува дека е неопходно да се оптимизираат концентрациите на ауксини и цитокинини кај растителните култури.

Цитокинините претставуваат неопходни компоненти во хранливиот медиум за стимулирање на клеточната делба кај растителните клетки и ткива во *in vitro* услови. Во отсуство на цитокинините настанува одложување на метафазата од клеточната делба, бидејќи цитокинините ја регулираат синтезата на протеини кои учествуваат во формирање на делбеното вретено. Кај растителните култури со ограничено количество на ендогени цитокинини, делбата на клеточните јадра се стопира во одредена фаза од клеточниот циклус. Ако се изврши субкултивирање на растителните ткива на медиум во присуство на цитокинини, тогаш настанува синхронизирана делба на клетките.

Индукцијата на калус од ткива на дикотиледоните растенија зависи од присуството на ауксини и цитокинини во хранливиот медиум. Сепак, неопходно е краткотрајно култивирање на калусите на медиум во присуство на цитокинини, а подоцна да се субкултивираат на медиум со истиот цитокинин и со дополнително додавање на ауксини. Предтретманот на растителните ткива со егзогени цитокинини овозможува континуирано набљудување со регулатори на растот кои се неопходни за клеточната

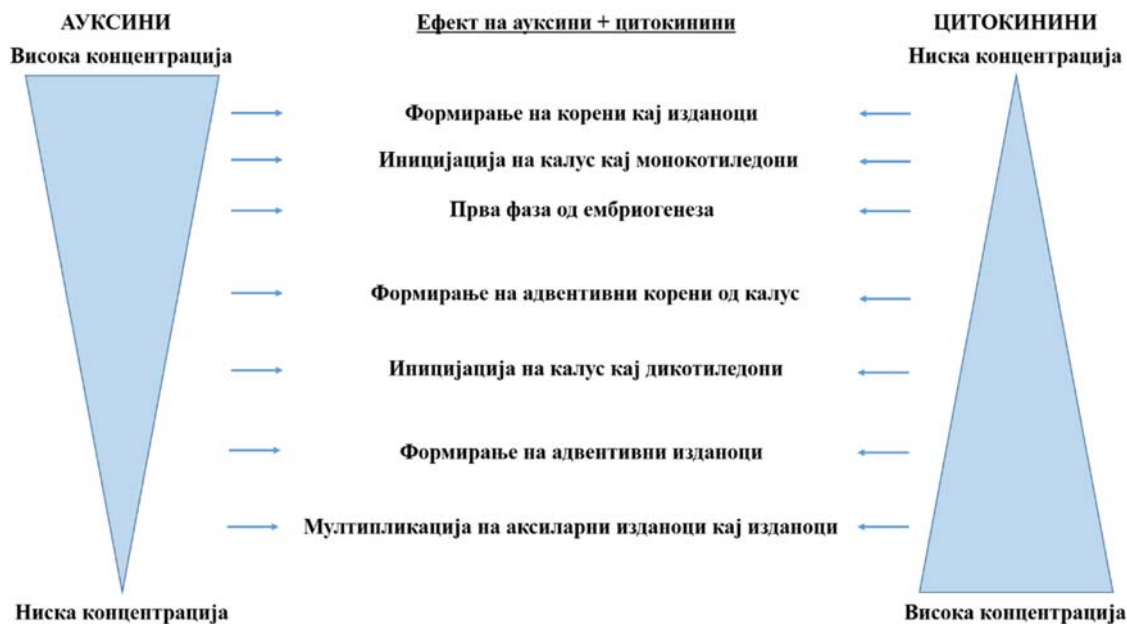
делба, бидејќи ендегените цитокинини подлежат на брза деградација. Според тоа, цитокинините во комбинација со ауксините во хранливиот медиум претставуваат главни фактори за регулација на клеточниот циклус, клеточната делба и контрола на диференцијацијата на растителните култури.

Формирање на изданоци. Цитокинините се ефикасни регулатори на растот за стимулирање на иницијација на изданоци. За овој процес најчесто се применува комбинација на цитокинини и ауксини кои во соодветна концентрација овозможуваат органогенеза на изданоци. Исто така, растот на аксиларни изданоци може да се постигне со користење на еден или повеќе цитокинини во фазата на мултипликација од микропропагација. Високата содржина на цитокинини може да предизвика развиток на голем број мали или хиперхидрирани изданоци кои немаат способност за елонгација.

Инхибиција на формирање на корени. Високите концентрации на цитокинини ($0,5-10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) ја инхибираат индукцијата и растот на корени кај изданоците и го спречуваат стимулативниот ефект на ауксините врз ризогенезата (вкоренување). Затоа, цитокинините не се додаваат во хранливиот медиум за вкоренување на изданоци за да се добијат регенерирани растенија. Изданоците можат да се субкултивираат повеќе пати на медиум за вкоренување во присуство на ауксини за да се намали содржината на ендегени цитокинини во изданоците.

3.8.4 Интеракција помеѓу ауксини и цитокинини

Формирањето на изданоци од култури на калуси може да се постигне со примена на ниска концентрација на ауксини и висока содржина на цитокинини во хранливиот медиум. Органогенезата кај културите на ткива и органи се контролираат преку интеракцијата помеѓу ауксините и цитокинините. Оптимизирањето на концентрацијата на ауксини и цитокинини во хранливиот медиум има големо значење за иницијација на раст или диференцијација кај културите на растителни ткива и органи (Сл. 3.15).



Слика 3.15 Релативни концентрации на ауксини и цитокинини кои се неопходни за раст и морфогенеза кај растенијата.

Постојат неколку примери кога релативниот однос на ауксините и цитокинините во хранливиот медиум не предизвикуваат карактеристични ефекти врз растот и диференцијацијата на растителните култури:

- мултипликација на аксиларни изданоци кај некои растенија може да се стимулира во присуство на ауксини во комбинација со ниска концентрација на цитокинини,
- ткивата кај некои монокотиледони растенија можат да формираат калуси само при висока содржина на ауксини, а цитокинините не претставуваат есенцијални фитохормони за индукција на овој процес,
- органогенезата кај монокотиледоните може да се стимулира преку субкултивирање на растителните ткива на медиум без присуство на ауксини или со редуцирање на концентрацијата на ауксинот 2,4-D или негова замена со други ауксини (IAA или NAA).

Формирањето на адвентивни меристеми на изданокот и коренот кај растителните култури зависи од балансот помеѓу ауксините и цитокинините во хранливиот медиум. Соодветните концентрации на секој тип на регулатор на растот зависи од растителниот вид, условите на култивирање и интеракциите помеѓу регулаторите на растот.

4. ГИБЕРЕЛИНИ

Гиберелините претставуваат фитохормони кои ја стимулираат елонгацијата на клетките и влијаат врз различни процеси на развојот кај растенијата како елонгација на стеблото, ртење на семето, контрола на јувенилноста, дорманција, цветање, детерминација на полот, индукција на ензими, како и сенсација на листови и плодови.

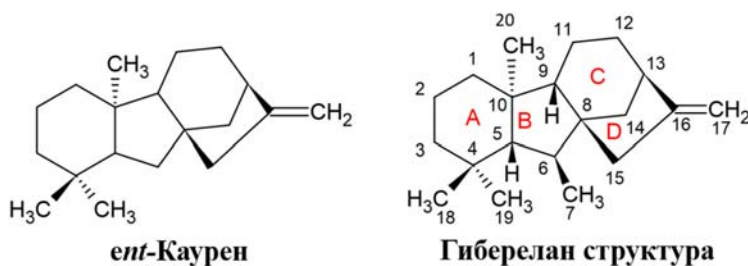
Во триесеттите години на минатиот век, јапонските научници го испитувале фунгалното заболување кај оризот (*Oryza sativa*) кое предизвикува прекумерен раст на растенијата (Сл. 4.1). Истражувањата кај овие т.н. „луди растенија“ покажале дека издолжувањето на стеблото било индуцирано од некое соединение кое се секретира од фунгата што ги инфицира растенијата. Ова соединение било изолирано од филтрат на култивираната фунга и било идентификувано како **гиберелин**, според фунгата *Gibberella fujikuroi* (денес именувана како *Fusarium fujikuroi*) која ги инфицира растенијата од ориз. Подоцна било потврдено дека ова активно соединение може да го стимулира растот и кај други растенија (пченка, просо, сусам и овес).



Слика 4.1 Растенија од ориз (*Oryza sativa*) инфицирани со фунгата *Gibberella fujikuroi*.

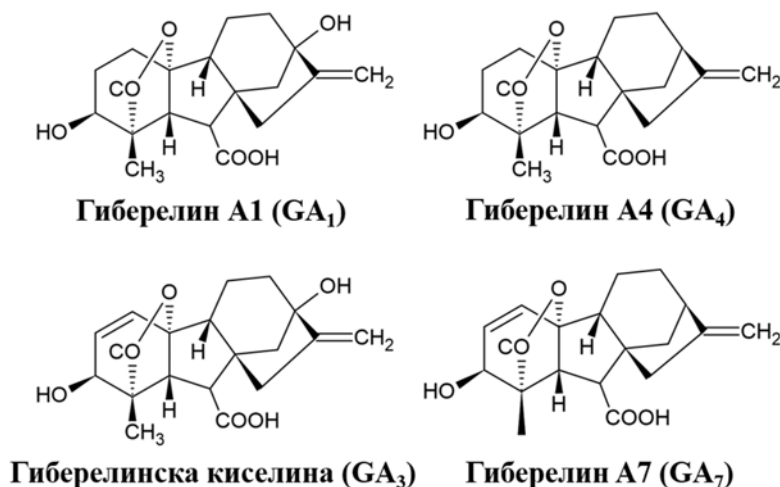
4.1 Структура и класификација на гиберелини

Според хемиската структура, гиберелини претставуваат **тетрациклични дитерпенски киселини** со 19 или 20 C-атоми. Гиберелините потекнуваат од соединението означено како *ent*-каурен и поседуваат гибереланска структура (Сл. 4.2).



Слика 4.2 Основна структура на гиберелини.

Кај растенијата се идентификувани голем број гиберелини, а само мал број имаат биолошка активност како фитохормони. Според тоа, сите гиберелини не се физиолошки активни бидејќи некои од нив се биосинтетски прекурсори или катаболити на активните гиберелини. Гиберелините со C-19 структура претставуваат биолошки активни фитохормони. Најчести биоактивни гиберелини кај растенијата се **GA₁**, **GA₃**, **GA₄** и **GA₇** (Сл. 4.3). Поради киселата природа, гиберелините се означуваат како **гиберелински киселини (GA)**. Гиберелинските киселини се именуваат како GA₁ до GA_n според нивното откривање, а GA₃ е првиот гиберелин со целосна идентификувана структура. До денес се идентификувани 126 гиберелини кај растенијата, фунгите и бактериите.

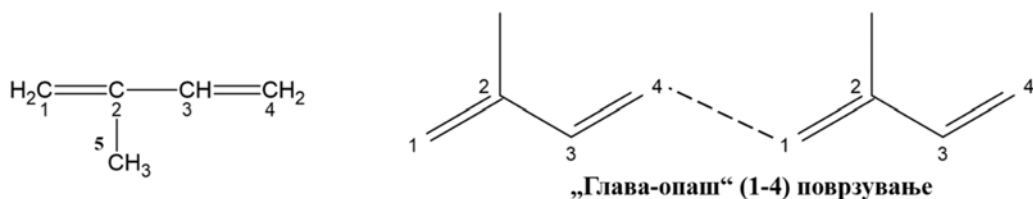


Слика 4.3 Структура на активни гиберелини.

Активните гиберелини во растителните клетки најчесто се присутни во слободна неконјугирана форма. Сепак, постојат голем број гиберелински гликозиди кои се формираат преку ковалентно поврзување на молекулот на гиберелин со јаглехидратна компонента. Овие гиберелински конјугати доминираат кај некои семиња. Јаглехидратната компонента најчесто е глюкоза која може да се поврзе за молекулот на гликозидот преку карбоксилната група при што се добива гиберелински гликозид или преку хидроксилната група за да се добие гиберелински гликозилен етер. Гликозилацијата на гиберелините претставува главен механизам за нивна инактивација.

4.2 Биосинтеза на гиберелини

Гиберелините како тетрациклични дитерпеноиди (C₂₀) се изградени од 4 основни изопреноидни единици составени од 5 јаглородни атоми. Изопреноидната C₅ единица се нарекува **изопрен (C₅H₈)**, а нивното меѓусебно поврзување се одвива преку т.н. „**глава-опаш**“ правило (Сл. 4.4).



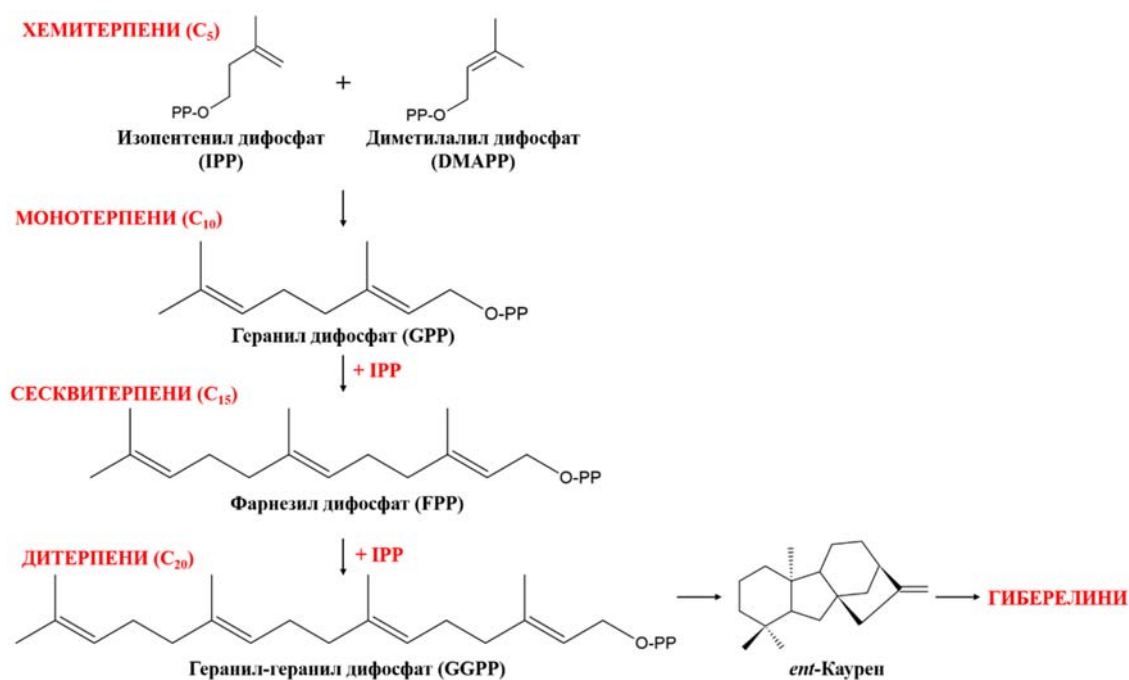
Слика 4.4 Структура на изопрен и поврзување на изопренски единици.

Гиберелините се синтетизираат преку терпеноидниот пат во пластидите, а потоа се модифицираат во ендоплазматскиот ретикулум и цитоплазмата како биолошки активни форми. Биосинтетскиот пат на гиберелините опфаќа 3 фази во различни клеточни компартмани (Сл. 4.5 и Сл. 4.6):

ФАЗА 1: Продукција на терпеноидни прекурсори и *ent*-каурен во пластиди.

Почетниот молекул во биосинтезата на гиберелините е изопентенил дифосфат (IPP) кој може да се формира во пластидите од зелените растителни ткива од глицералдеhid-3-фосфат и пируват (Сл. 4.5). Формираниот IPP може да изомеризира во диметилалил пиродфосфат (DMAPP). Во ендоспермот на семињата, IPP може да се формира и во цитоплазмата на клетките од мевалонска киселина која претходно се добива од ацетил-CoA. Според тоа, IPP како почетен прекурсор во биосинтезата на гиберелините може да да има потекло од различни клеточни компартмани и различни растителни ткива.

Формираните молекули на IPP претставуваат изопренски единици кои преку реакции адиција овозможуваат формирање на интермедиерни соединенија со 10 C-атоми (геранил дифосфат-GPP), 15 C-атоми (фарнезил дифосфат-FPP) или 20 C-атоми (геранилгеранил дифосфат-GGPP). Добиениот GGPP е прекурсор во биосинтезата на гиберелини (Сл. 4.5) и други терпеноидни соединенија како што се каротеноидите и етеричните масла.



Слика 4.5 Биосинтетски пат на терпеноиди за добивање на гиберелини.

По формирањето на GGPP започнува да се одвива специфичниот пат за биосинтеза на гиберелините. Реакциите на циклизација кои овозможуваат конвертирање на GGPP во *ent*-каурен го претставуваат првиот чекор во биосинтеза на гиберелините (Сл. 4.6). Ензимите кои се одговорни за катализирање на овие реакции од биосинтезата на гиберелините се локализирани во пропластидите на меристемските клетки од изданокот, а не се присутни во зрелите хлоропласти. Според тоа, зелените листови ја губат способноста за синтеза на гиберелини од IPP откако ќе настане диференцијација на нивните хлоропласти.

ФАЗА 2: Оксидации во ендоплазматски ретикулум и добивање на GA₁₂ и GA₅₃.

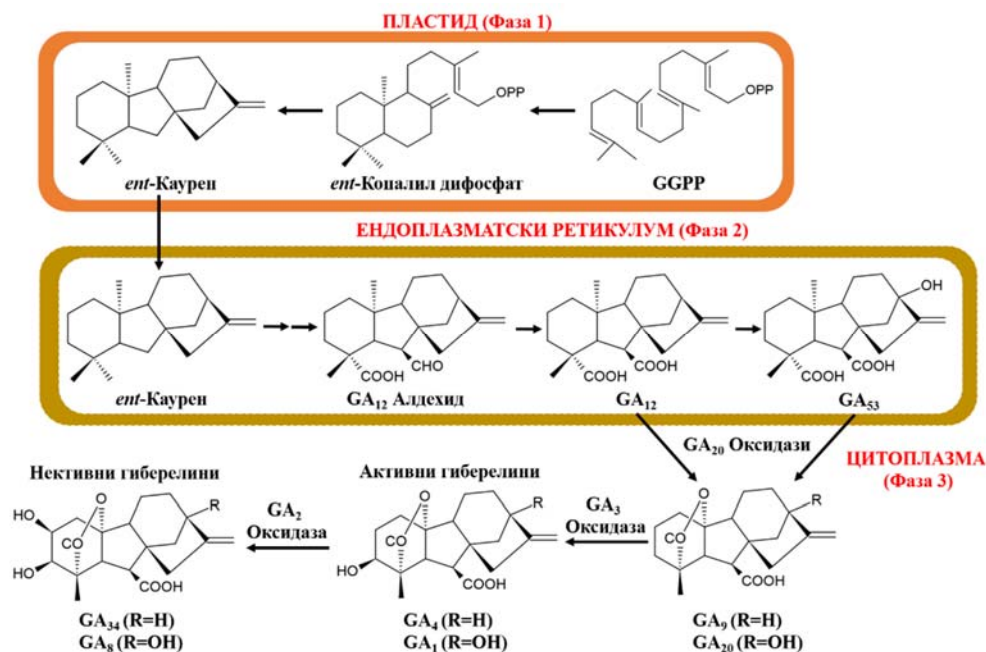
Кауренот се транспортира од пластите до ендоплазматскиот ретикулум и се оксидира до кауренска киселина под дејство на ензимот каурен оксидаза кој е локализиран во хлоропластната мембрана. Натамошните конверзии до GA₁₂ се одвиваат во ендоплазматскиот ретикулум. Метилната група на *ent*-кауренот се оксидира до карбоксилна киселина (COOH), при што се врши модификација на структурата и се добива GA₁₂-алдехид, кој подлежи на оксидација за да се добие GA₁₂ (Сл. 4.6). Според тоа, GA₁₂ е првиот гиберелин кој се формира преку овој биосинтетски пат. Голем број гиберелини се хидроксилирани на позиција C₁₃, а од нив се формира GA₅₃. Сите ензими кои се вклучени во овие реакции се P450 монооксигенази локализирани во ендоплазматскиот ретикулум.

ФАЗА 3: Формирање на останати гиберелини од GA₁₂ или GA₅₃ во цитоплазма.

Натамошните чекори од биосинтезата на гиберелините се одвиваат во цитоплазмата под дејство на ензимите диоксигенази. Кај растенијата се одвиваат две главни промени:

- хидроксилација на C₁₃ или C₃ или на двете позиции во ендоплазматски ретикулум,
- сукцесивна оксидација на C₂₀ (CH₃ → CH₂OH → CHO)

Краен чекор од овој оксидациски процес е губење на C₂₀ како CO₂ од структурата на гиберелините. Ако овие реакции вклучуваат гиберелини кои се хидроксилирани на позиција C₁₃, тогаш се добива GA₂₀. Формируваниот GA₂₀ потоа се конвертира во биолошки активна форма GA₁ преку хидроксилација на C₃ позиција (Сл. 4.6).



Слика 4.6 Специфични патишта на биосинтеза на гиберелини.

Клучни ензими кои се вклучени во метаболизмот на гиберелините се: **GA 20-оксидаза**, **GA 3-оксидаза** и **GA 2-оксидаза**. Ензимот GA 20-оксидаза ги катализира сите реакции кои вклучуваат сукцесивни оксидациски чекори на позиција C-20 преку отстранување на C-20 во форма на CO₂. Ензимот GA 3-оксидаза функционира како 3β-хидроксилаза и додава хидроксилна група на C-3 позиција за да се формираат активните гиберелини GA₁ и GA₄. Ензимот GA 2-оксидаза врши инактивирање на GA₁ и GA₄ преку адиција на хидроксилна група на C-2.

4.3 Инхибитори на биосинтезата и дејството на гибберелините

Синтетските соединенија кои ги блокираат биосинтетските патишта на гибберелините се нарекуваат **антигиберелини** и можат да се поделат во 3 категории:

- амониумови, фосфониумови и сулфониумови соли кои ги инхибираат реакциите на циклизација (**хлормекват хлорид-ССС**),
- хетероциклични азотни соединенија кои го инхибираат ензимот *ent*-каурен оксидаза (**анцимидол**),
- деривати на ацилциклохександион кои ги инхибираат последните фази од биосинтезата на гибберелини, односно ензимите хидроксилази (**прохексадион**).

Сепак, овие инхибитори немаат специфично дејство врз гибберелините, бидејќи можат да влијаат и врз биосинтетските патишта на стеролите и абсцисинската киселина.

4.4 Регулација на биосинтезата на гибберелини

Незрелите семиња и плодовите во развојот содржат највисока содржина на гибберелини кај растенијата. Ензимите за биосинтеза на гибберелини се локализирани во клетките на млади и активно растечки пупки, листови и апикални интернодии. Кај *Arabidopsis*, генот *GA20ox* примарно се експресира во апикалните пупки и младите листови кои претставуваат главни места во биосинтезата на гибберелини. Синтетизираните гибберелини во изданоците можат да се транспортираат до останатите растителни органи преку флоемот. Исто така, гибберелините се идентификувани во екстрактите од корени, што покажува дека корените учествуваат во биосинтезата на овие фитохормони, кои потоа се транспортираат преку ксилемот до изданоците.

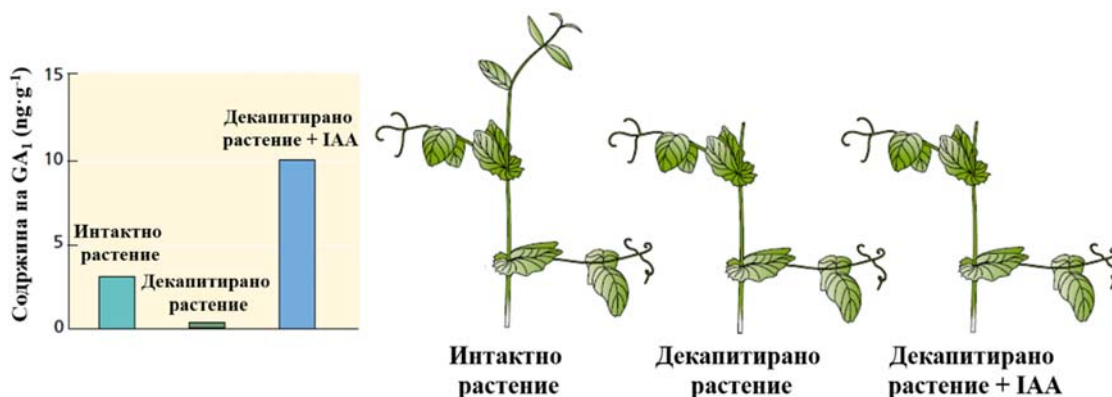
Метаболизмот на гибберелините се регулира преку активирање или инхибирање на транскрипцијата на гените кои кодираат ензими за биосинтеза или деградација на гибберелините. Така на пр., апликацијата на гибберелини кај растенијата предизвикува намалена експресија на биосинтетскиот ген *GA20ox* и зголемена транскрипција на генот *GA2ox* за инактивирање на гибберелините. Од друга страна, мутацијата која предизвикува намалување на содржината на активните гибберелини кај растенијата стимулира зголемена транскрипција на биосинтетскиот ген *GA20ox* и намалена експресија на генот за деградација *GA2ox*.

Физичките фактори од надворешната средина (фотопериод и температура) можат да влијаат врз содржината на активните гибберелини преку нивните ефекти врз транскрипцијата на гените кои се одговорни за специфични реакции од биосинтетскиот пат. Некои семиња кои имаат способност за ртење само во присуство на светлина можат да ртат во услови на темно доколку се третираат со гибберелини. Стимулираното ртење на семето под дејство на светлина настанува како резултат на зголемената содржина на GA₁ поради индуцираната транскрипција на генот за *GA3ox* кој врши конверзија на GA₂₀ во активен GA₁. Кај некои растенија, ниската температура претставува главен предуслов за ртење на семето. Сепак, присуството на гибберелини може да го замени третманот со ниска температура кој е неопходен за ртење на семето.

4.5 Ауксините стимулираат биосинтеза на гибберелини

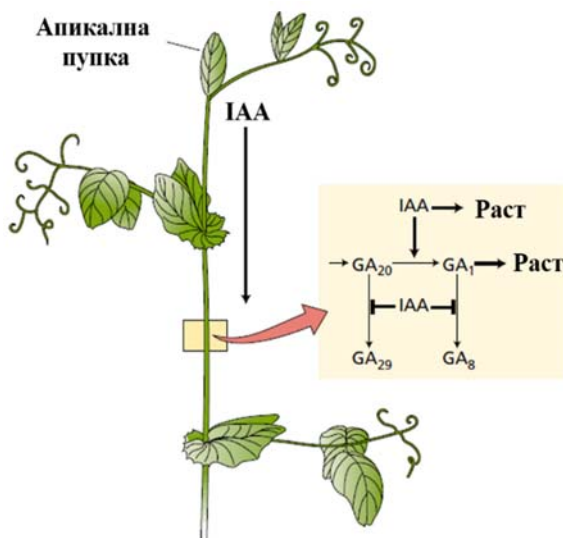
Познато е дека гибберелините ја стимулираат биосинтезата на ауксини, а воедно и ауксините имаат способност за индуцирана синтеза на гибберелини. Во тој контекст, декапитацијата на растенија од грашок предизвикува намалена елонгација на стеблото поради отстранување на апикалниот врв како примарен извор на ауксини, при што

настанува значајно намалување на содржината на ауксини и GA_1 во апикалниот дел од стеблото. Овие промени се должат на ефектот на ауксините, бидејќи апликацијата на ауксин на декапитираниот врв ја зголемува ендегената содржина на GA_1 (Сл. 4.7).



Слика 4.7 Декапитацијата на апикалниот врв на растенијата ја редуцира ендегената содржина на GA_1 , а апликацијата на IAA (ауксин) ја зголемува ендегената содржина на GA_1 .

Всушност, присуството на ауксини ја стимулира транскрипцијата на генот *GA3ox* за синтеза на активниот гиберелин GA_1 , а ја инхибира транскрипцијата на генот *GA2ox* за инактивирање на гиберелините. Според тоа, апикалната пупка го стимулира растот на растенијата преку директна биосинтеза на ауксини, како и преку ауксин-индуцирана биосинтеза на GA_1 (Сл. 4.8).



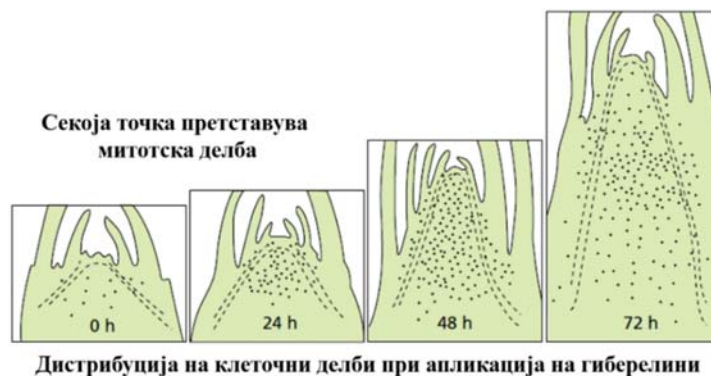
Слика 4.8 Биосинтезата на ауксинот индол-3-оцетна киселина (IAA) од апикалната пупка стимулира биосинтеза на гиберелинска киселина (GA_1), а воедно ја спречува инактивацијата на GA_1 .

4.6 Физиолошко дејство на гиберелини

4.6.1 Стимулирање на елонгација на клетки и клеточна делба

Гиберелините имаат стимулативен ефект врз елонгација на клетките и клеточната делба. Третманот со гиберелини значајно ја интензивира митотската делба во субапикалниот регион на меристемот на изданокот кај растенијата (Сл. 4.9). За разлика

од ауксините, гибберелините ја зголемуваат екстензивноста на клеточниот сид без да предизвикаат ацидификација. Всушност, механичката екстензија на клеточниот сид под дејство на гибберелините настанува како резултат на активирање на ензимот ксилоглюкан ендотрансгликозилаза, кој ја олеснува пенетрацијата на експанзините во целулозните микрофибрили и предизвикува релаксација на клеточните сидови. Експанзините претставуваат протеини во клеточниот сид кои предизвикуваат релаксација на клеточните сидови во кисела средина преку ослабување на водородните врски помеѓу полисахаридите. Степенот на клеточна елонгација зависи од екстензивноста на клеточниот сид и осмотски регулираното примање на водата.



Слика 4.9 Егзогената апликација на гибберелини кај растенијата индуцира елонгација на интернодиите на стеблото преку зголемување на клеточните делби

4.6.2 Елонгација на интернодии и регулација на јувенилноста

Ефектот на гибберелините врз елонгација на стеблото бил испитуван кај растенијата кои растат во форма на розета. Овие растенија претставуваат карактеристичен пример за појава на дварфизам (цуцест раст), кај кои отсуството на елонгација на интернодиите резултира со помал простор помеѓу формираните листови.



Слика 4.10 Ефект на гибберелинска киселина врз издолжување на стебло кај *Arabidopsis*.

Егзогената апликација на гибберелини стимулира елонгација на интернодиите кај голем број растителни видови (Сл. 4.10). Овој ефект на гибберелините предизвикува намалување на дебелината на стеблото и големината на листовите, како и добивање на светло зелена боја на листовите. Елонгацијата на интернодиите настанува како резултат

на дејството на гиберелините врз интеркаларниот меристем (меристем во близина на основата на интернодијата).

Исто така, гиберелините ја регулираат транзицијата од јуvenilна во адултна фаза од растот на растенијата. Голем број повеќегодишни растенија не цветаат пред да достигнат одреден стадиум на зрелост. Според тоа, растенијата се наоѓаат во јуvenilен стадиум на развојот пред да започне процесот на цветање. Апликацијата на гиберелини кај бршленот (*Hedera helix*) може да предизвика реверзија од зрела во јуvenilна состојба. Од друга страна пак, апликацијата на гиберелините GA₄ и GA₇ може да индуцира транзиција на јуvenilните четинари во репродуктивна фаза. Според тоа, гиберелините ја регулираат јуvenilноста во двата правци во зависност од растителниот вид (зрела кон јуvenilна состојба или обратно).

4.6.3 Иницијација на цветови и детерминација на пол

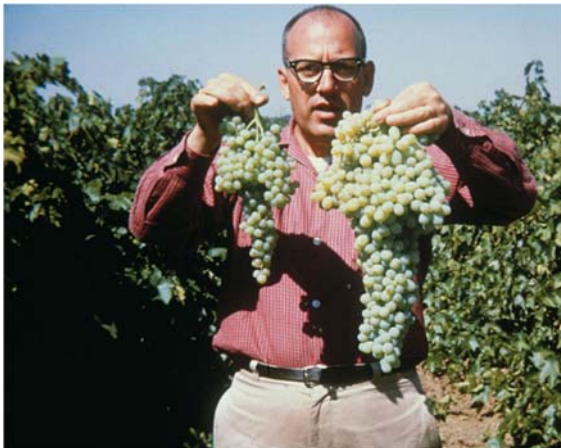
Гиберелините можат да го заменат долгиот ден или третманот со ниска температура за иницијација на цветање кај голем број растителни видови. Според тоа, гиберелините се сметаат како стимул за цветање на растенијата. Кај растенијата со еднополови цветови, детерминацијата на полот може генетски да се регулира или да зависи од дејството на факторите од животната средина или нутритивниот статус. Така на пр., експозицијата на растенијата од пченка на краток ден и студени ноќи ја зголемува ендегената содржина на гиберелини кои индуцираат феминизација на машките метличести цветови. Од друга страна пак, присуството на гиберелини кај дикотиледоните растенија (краставица и спанаќ) имаат спротивен ефект, односно стимулираат формирање на машки цветови.

4.6.4 Ртење на семе

Гиберелините имаат значајна улога за ртење на семето поради тоа што учествуваат во вегетативниот раст на ембрионот, го намалуваат слојот на ендосперм околу ембрионот кој го ограничува растот или поради мобилизација на хранливите резерви кои се акумулирани во ендоспермот. Познато е дека некои семиња имаат потреба од светлина или ниска температура за индукција на процесот на ртење. Кај овие семиња, дорманцијата на семињата може да се надмине преку егзогена апликација на гиберелини. Според тоа, гиберелините претставуваат природни регулатори на голем број физиолошки процеси кои се поврзани со ртење на семето. Така на пр., апликацијата на гиберелините ја стимулира продукција на голем број хидролази, особено енизимот α -амилаза во алеуронскиот слој на семето кај житните растенија. Поради тоа, гиберелините имаат широка примена во индустријата за добивање на слад (изртени житарки) при производство на пиво.

4.6.5 Формирање на плодови

Растенијата од винова лоза кои формираат безсемени плодови имаат комерцијална примена и најчесто се прскаат со гиберелини за да се зголеми должината на цветните дршки. Нискиот степен на елонгација на поединечните цветни дршки е главна причина за формирање на компактни гроздови со ограничен раст на поединечните зрна на грозјето. Егзогената апликација на GA₃ ја стимулира елонгацијата на цветните дршки и целите плодови, а притоа се зголемува и нивниот сладок вкус (Сл. 4.11). Исто така, гиберелините ја одложуваат сенесценцијата на плодовите кај цитруските растенија, при што плодовите се одржуваат подолг временски период на растенијата.



Слика 4.11 Гиберелинската киселина (GA₃) има стимулативен ефект врз растот на безсемено грозје. Гроздот од левата страна е контрола, а гроздот од десна страна е третиран со GA₃ за време на развитокот на плодовите.

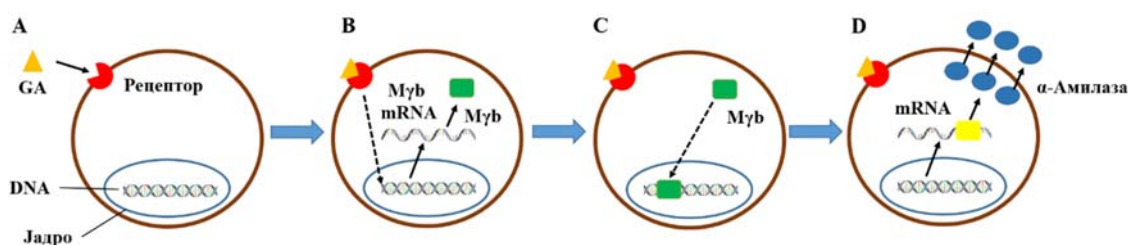
4.7 Механизам на дејство на гиберелини

Механизмот на дејство на гиберелините бил откриен преку проучување на нивниот ефект врз стимулирање на синтезата на α -амилаза во алеуронскиот слој на семето од житарици (Сл. 4.12). Зрната од житариците се составени од 3 главни дела: диплоиден ембрион, триплоиден ендосперм и семенова обвивка наречена перикарп (споена семенова обвивка со сид на плод). Ембрионот има специјален апсорптивен орган наречен скутелум кој учествува во апсорпција на растворливите хранливи резерви од ендоспермот и нивно пренесување до ембрионот. Ендоспермот е составен од централен дел исполнет со скроб кој е опкружен со алеуронски слој. Клетките од алеуронскиот слој содржат вакуоли за акумулирање на протеини кои се наречени протеински телца. За време на ртење на семето, хранливите резерви во ендоспермот се хидролизират под дејство на ензимите α - и β -амилази до мономерни соединенија и потоа се транспортираат до ембрионот. Главна функција на клетките од алеуронскиот слој е синтеза и ослободување на хидролитички ензими, а потоа настанува нивна програмирана смрт.



Слика 4.12 Механизам на дејство на гиберелините (GA) во семе од житарици.

Познато е дека GA_3 ја стимулира хидролизата на скробот преку зголемување на транскрипцијата на mRNA за α -амилаза. Индуцираната синтеза на α -амилаза под дејство на гибберелините опфаќа *de novo* синтеза на ензимот, без притоа да се активираат претходно постоечките ензими. Покрај индуцираната синтеза на α -амилаза, во мобилизацијата на резервните хранливи материи во ендоспермот учествуваат и протеолитичките ензими (протеази), β -амилаза и други ензими кои учествуваат во деградација на скробот. Зголемената експресија на генот за α -амилаза под дејство на гибберелините се одвива со помош на специфичен транскрипциски фактор (Myb) кој се врзува за промоторниот регион на генот за α -амилаза. Во овие промоторни региони на генот за α -амилаза се идентификувани регулаторни DNA секвенци (гибберелин респонсивни елементи) кои се одговорни за врзување на транскрипцискиот фактор. На таков начин, врзувањето на Myb за гибберелин респонсивните елементи овозможува прекумерна експресија на генот за α -амилаза и зголемена синтеза на ензимот во клетките од алеуронскиот слој на семето (Сл. 4.13).



Слика 4.13 Механизам на активирање на α -амилаза под дејство на гибберелини. Гибберелините (GA) се врзуваат за рецептор на плазмалемата од клетките на алеуронскиот слој (A). Сигналот од рецепторот за GA овозможува продукција на Myb транскрипциски фактор (B). Протеинот Myb се врзува за промоторот на генот за α -амилаза и се активира неговата транскрипција (C). Ензимот α -амилаза се синтетизира и секретира во ендоспермот кој е богат со скроб (D).

4.8 Влијание на гибберелини кај растителни *in vitro* култури

Мал број гибберелини се комерцијално достапни за култивирање на растителни ткива и најчесто се користи GA_3 или мешавина од GA_4 и GA_7 . Културите на растителни ткива можат ефикасно да растат без присуство на гибберелини, меѓутоа присуството на GA_3 во голем број случаи претставува есенцијална компонента за култивирање на клетките. Често пати, егзогената апликација на GA_3 во хранливиот медиум индуцира ефекти кои се слични со ауксините. Високите концентрации на GA_3 ($1-8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) во комбинација со ауксини или ниска концентрација на цитокинини можат да го стимулираат растот на недиференцирани калусни клетки и клеточните суспензии.

Литературните податоци покажуваат дека GA_3 влијае врз процесите на формирање на адвентивни изданоци, ризогенеза, ембриогенеза и микропропагација на растенијата.

4.8.1 Формирање на адвентивни изданоци

Гибберелинската киселина (GA_3) покажува инхибиторен ефект врз формирањето на адвентивни изданоци од култури на калуси од тутун. Исто така, GA_3 спречува регенерација на изданоци од лисни дискови кај *Begonia* или од аксиларни пупки кај

шеќерна репка. Сепак, GA₃ ја инхибира иницијацијата на меристемоиди, а го стимулира развитокот на изданоци откако ќе се формираат меристемоидите.

4.8.2 Ризогенеза

Гиберелините го инхибираат формирањето на корени, а локалната апликација на висока концентрација на GA₃ (1-10 mg·L⁻¹) на базалниот дел од стеблото на изданоците спречува развиток на корени. Сепак, постојат податоци за стимулативен ефект на GA₃ врз развиток на корени од лисни дискови на домати, поради тоа што гиберелините предизвикуваат зголемена продукција на ауксини во листовите. Ефектот на GA₃ врз ризогенезата на изданоци зависи од концентрацијата на ауксини во хранливиот медиум. Така на пр., GA₃ стимулира директно формирање на корени од лисни сегменти на *Digitalis* во присуство на ниска содржина на IAA, додека пак, присуството на висока концентрација на IAA има инхибиторен ефект врз формирањето на корени.

4.8.3 Ембриогенеза и развиток на ембриони

Во најголем број случаи, GA₃ има инхибиторен ефект врз формирањето на соматски ембриони. Во тој контекст, додавањето на инхибитори на биосинтезата на гиберелини го зголемува бројот на соматски ембриони од калуси на *Citrus*. Исто така, GA₃ има антагонистички ефект врз ABA при стимулирање на ембриогенезата. Истражувањата покажуваат дека содржината на поларни гиберелини (GA₃) е висока кај недиференцирани клетки и неембриогени клетки од морков. При иницијација на развитокот на соматските ембриони кај овие клетки настанува рапидно намалување на содржината на поларни гиберелини.

4.8.4 Микропагација на растенија

Познато е дека гиберелините го спречуваат формирањето на организирани меристеми на коренот и изданокот, а можат да го стимулираат натамошниот раст и развиток на претходно формираните органи.

Мултипликација на изданоци. Апликацијата на GA₃ во комбинација со BA ја стимулира мултипликацијата кај некои растенија (*Morus cathayana* и *Ocimum basilicum*).

Елонгација на изданоци. Често пати, GA₃ се додава во хранливиот медиум за време на фазата на мултипликација или елонгација на изданоци пред да се изврши нивно вкоренување за да се добијат регенерирани изданоци.

Интегритет на апикален меристем. Примената на цитокинини за мултипликација на изданоците често пати може да предизвика развиток на повеќе од еден апикален меристем кај изданоците. Апликацијата на GA₃ во хранливиот медиум може да го зачува интегритетот на апикалните пупки кај изданоци од јагода и да го спречи формирањето на абнормални изданоци со повеќе апикални меристеми.

Фаза на адаптација. Регенерираните растенија од некои дрвенести растенија можат да станат дормантни по трансплантацијата во почва и да се спречи нивниот натамошен развиток. Овие недостатоци можат да се надминат преку експонирање на вкоренетите изданоци на ниска температура или преку третман со GA₃.

5. АБСЦИСИНСКА КИСЕЛИНА

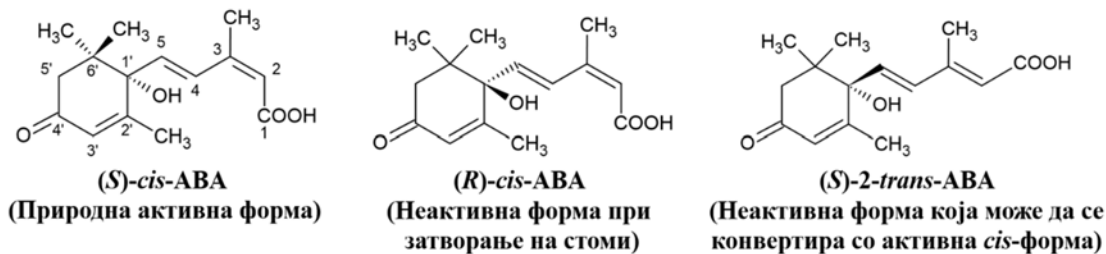
Растенијата имаат способност да синтетизираат соединенија кои претставуваат инхибитори на растот и развитокот. **Абсцисинската киселина (АВА)** претставува негативен регулатор на растот кој има значајна улога во адаптацијата на растенијата во услови на стрес. Исто така, АВА учествува во одржување на водениот баланс, инхибиција на ртење на ембрионот во семето и дормантноста на пупките.

5.1 Откривање на абсцисинска киселина

Првите истражувања за идентификацијата на АВА покажале дека дормантноста на семињата и пупките се предизвикани од некои инхибиторни соединенија, а подоцна биле направени обиди за нивна екстракција од различни растителни ткива. Со помош на хроматографски техники биле изолирани овие соединенија и покажале инхибиторен ефект врз елонгацијата на колеоптили од овес. Овие соединенија биле именувани како „ **β -инхибиторен комплекс**“. Високата содржина на β -инхибиторниот комплекс била во корелација со дорманцијата на пупки кај бреза. Од овој комплекс било идентификувано соединение означено како **абсцисин II**, бидејќи стимулира абсцисија на плодови од памук, а друго соединение изолирано од бреза кое го инхибира растот и индуцира дорманција на пупките било именувано како **дормин**. Подоцна било утврдено дека дорминот поседува иста структура како абсцисин II и станува збор за исто инхибиторно соединение кое било означено како **абсцисинска киселина (АВА)**.

5.2 Структура на абсцисинска киселина

Инхибиторот АВА се синтетизира кај сите васкуларни растенија и кај некои родови на фунги како секундарен метаболит. Кај вишите растенија, АВА е присутна во сите растителни ткива од кореновата капа до апикалната пупка и се синтетизира во сите клетки кои содржат хлоропласти и амилопласти. Фитохормонот АВА претставува сесквитерпен со 15 C-атоми кој се карактеризира со циклохексански прстен со кето и хидроксилна група и страничен синцир со терминална карбоксилна група. Ориентацијата на карбоксилната група на позиција C₂ ги одредува *cis*- и *trans*-изомерите на АВА (Сл. 5.1). Природната форма на АВА е присутна како *cis*-изомер и најчесто терминот АВА се однесува на оваа изомерна форма. Исто така, АВА поседува асиметричен јаглероден атом на позиција C_{1'} од циклохексанскиот прстен, при што се формираат S или (+) и R или (-) енантиомери. S-енантиомерот претставува природна активна форма на АВА која овозможува брзи физиолошки одговори, како што е затворање на стомите. Кај долготрајните физиолошки одговори учествуваат двата типа на енантиомери (Сл. 5.1). За разлика од *cis*- и *trans*-изомерите, S и R енантиомерите на АВА подлежат на интерконверзија во растителните ткива.



Слика 5.1 Хемиска структура на S- и R-енантиомерите на абсцисинска киселина (АВА).

Во спротивност со прифатениот термин за абсцисинска киселина, АВА не индуцира абсцисија на листовите и плодовите. Акумулацијата на АВА за време на развитокот на семето овозможува зреење на семето, толерантност кон десикација (сушење) и супресија на вивипаријата. Продукцијата на АВА во апикалната пупка го забавува растот и овозможува развиток на покровни листови за да се заштитат пупките од ниските температури. Исто така, АВА ја инхибира клеточната делба во васкуларниот камбиум и учествува во аклиматизација на растенијата кон ниските температури преку супресија на примарниот и секундарниот раст на стеблото. Фитохормонот АВА се sintetизира во зелените плодови при почетокот на зимата или во зрелите семиња каде што учествува во нивната дорманција. Исто така, АВА се sintetизира во услови на стрес од надворешната средина, како што се висока температура, воден и осмотски стрес.

5.3 Биотестови за докажување на дејството на абсцисинска киселина

Постојат голем број биотестови кои се користат за детекција на присуството на АВА во растителните ткива. Овие тестови опфаќаат неколку експериментални методи:

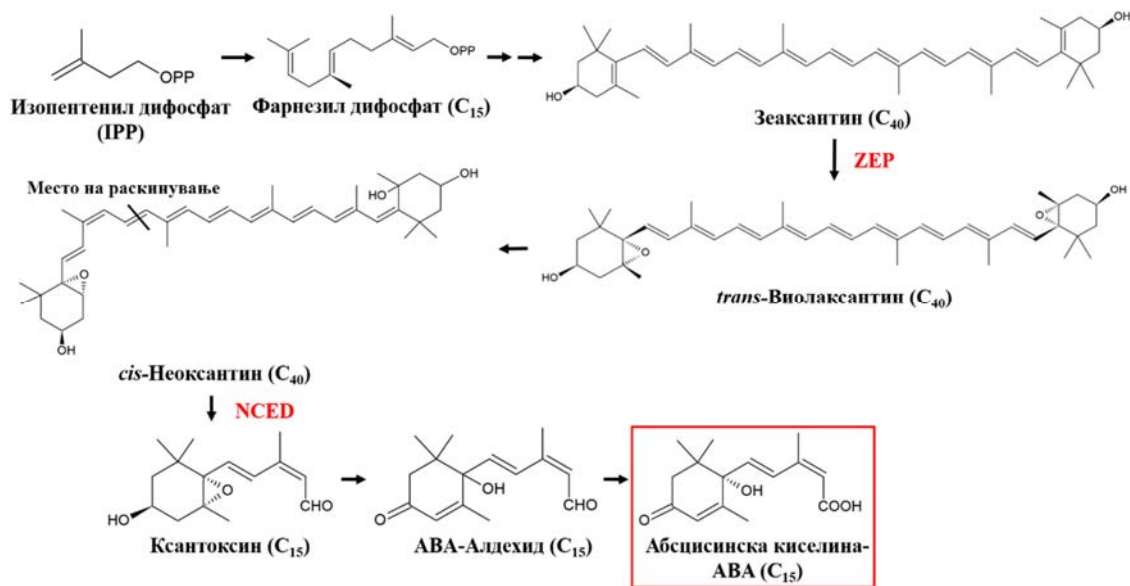
- стимулација на затворање на стомите,
- инхибиција на ртење на изолирани ембриони од јачмен,
- забрзана абсцисија на котиледони кај изртени семиња од памук,
- инхибиција на IAA-индуциран раст на колеоптили од овес (*Avena*),
- инхибиција на GA₃-индуцирана активност на α -амилаза во алеуронскиот слој кај семиња од јачмен.

5.4 Биосинтеза, катаболизам и хомеостаза на абсцисинска киселина

Физиолошките одговори на растенијата кон дејството на АВА зависат од нејзината концентрација во ткивата и сензитивноста на ткивата кон фитохормонот. Биосинтезата на АВА се одвива во хлоропластите или амилопластите преку каротеноидите (Сл. 5.2).

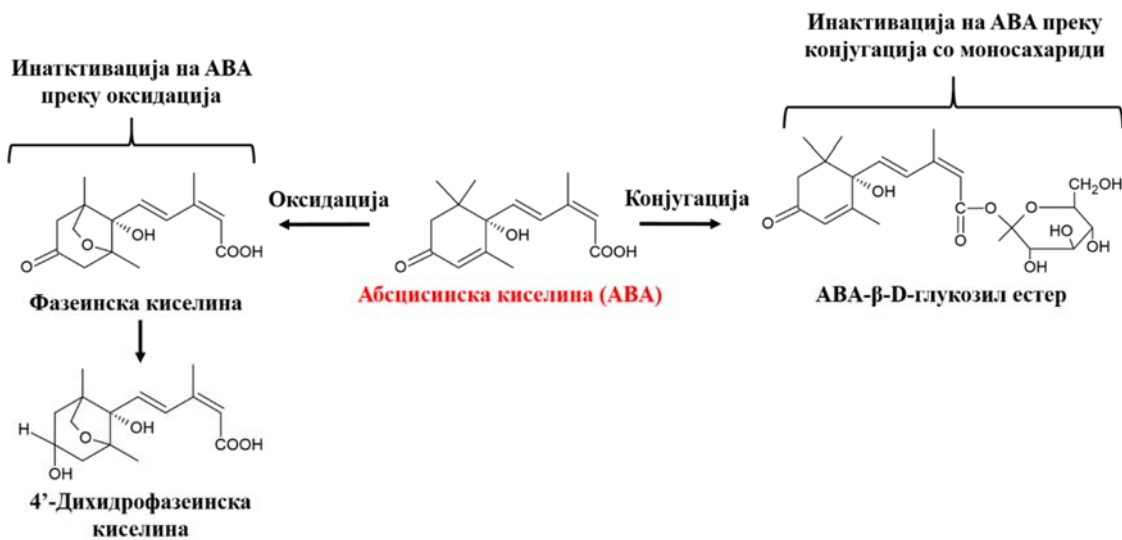
Биосинтетскиот пат на АВА започнува од **изопентенил дифосфат (IPP)** како основна изопренска единица која води кон синтеза на ксантофилот **виолаксатин** со 40 C-атоми. Реакцијата на формирање на виолаксатин е катализирана под дејство на ензимот зеаксантин епоксидаза (ZEP). Виолаксантинон се конвертира во C₄₀ соединение **cis-неоксантин**, кој потоа се разградува под дејство на ензимот диоксигеназа (NCED) до **ксантоксин** со 15 C-атоми. Ксантоксинот е природен инхибитор на растот со слично дејство како и АВА. Синтезата на ензимот диоксигеназа се индуцира под дејство на воден стрес и претставува клучен регулаторен чекор во биосинтезата на АВА. Во последните чекори, ксантоксинот се конвертира во **АВА** преку оксидативни реакции кои опфаќаат добивање на интермедиерни соединенија од **АВА-алдехид** и **ксантоксинска киселина** во цитоплазмата (Сл. 5.2).

Катаболизмот на АВА опфаќа реакции на оксидација и конјугација (Сл. 5.3). Оксидацијата на слободната форма на АВА овозможува добивање на интермедиерен производ кој спонтано циклизира и се конвертира до **фазеинска киселина (РА)** и **дихидрофазеинска киселина (DPA)**. Всушност, оксидацијата е доминантен механизам за катаболизам на АВА. Фазеинската киселина се карактеризира со значајно редуцирана биолошка активност во споредба со АВА. Сепак, РА може да индуцира затворање на стомите кај некои растителни видови и функционира како и АВА во инхибиција на GA₃-индуцираната продукција на α -амилаза во алеуронскиот слој од јачмен. Овие податоци покажуваат дека РА има способност да се врзува за рецепторите на АВА во растителните клетки. Од друга страна пак, DPA не покажува биолошка активност како АВА.



Слика 5.2 Биосинтеза на абсцисинска киселина. ZEP: зеаксантин епоксидаза, NCED: *cis*-епоксикаротеноид диоксигеназа.

Хомеостазата на АВА се одржува преку гликозилација на АВА, која опфаќа ковалентна конјугација на слободната форма на АВА со молекул на моносахарид (Сл. 5.3). Реакциите на конјугација ја неутрализираат активноста на АВА како фитохормон, а воедно ја променуваат нејзината поларност и клеточната дистрибуција. Во тој контекст, слободната форма на АВА е локализирана во цитоплазмата, додека пак, гликозилираните деривати се акумулираат во вакуолата и служат како резервна форма. Важно е да се напомене дека ензимите естерази во растителните клетки можат да ја ослободат АВА од конјугираните деривати во слободна форма.



Слика 5.3 Реакции на конјугација и оксидација на абсцисинска киселина.

Концентрацијата на АВА во растителните ткива зависи од процесите на биосинтеза, деградација, акумулација во одредени компартмани, конјугација и транспорт. Така на пр., при воден стрес на растенијата настанува зголемување на цитоплазматската концентрација на АВА како резултат на интензивните процеси на биосинтеза во листовите, редистрибуцијата во мезофилните клетки, импортоот од корените во листовите и рецикулацијата од другите листови. При наводнување на растенијата настанува намалување на содржината на АВА поради намалување на интензитетот на биосинтеза, како и стимулирање на процесите на деградација и експорт од листовите.

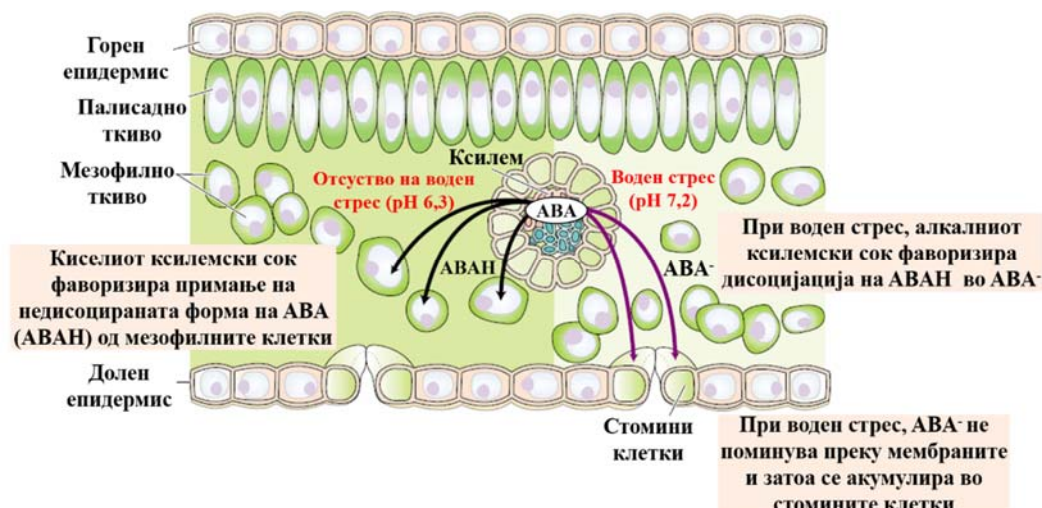
Бисинтезата и концентрацијата на АВА може значајно да варира во специфични ткива за време на развитокот на растенијата или како резултат на промените на условите во надворешната средина. Така на пр., кај семиња во стадиум на развиток, содржината на АВА може да се зголеми за 100 пати за време од неколку дена, а потоа нејзината концентрација рапидно се намалува за време на процесот на зреење на семето. Во услови на воден стрес, концентрацијата на АВА во листовите се зголемува до 50 пати за време од 4-8 часа, а со наводнувањето на растенијата настанува нормализирање на нејзината концентрација.

5.5 Транслокација на абсцисинска киселина

Абсцисинската киселина се транспортира преку ксилемот и флоемот, а доминантно е застапена во флоемскиот сок. Синтетизираните молекули на АВА во листовите можат да се транспортираат акропетално кон врвот на стеблото или базипетално кон корените. Деструкцијата на флоемскиот спроводен систем во стеблото ја оневозможува акумулацијата на АВА во корените, при што се потврдува дека АВА се транспортира преку флоемскиот систем.

Во услови на воден стрес се индуцира биосинтеза на АВА во корените, која потоа преку ксилемските спроводни садови се транспортира до надземните органи и листовите на растението. Се претпоставува дека АВА од корените се транспортира во конјугирана форма, а во листовите се одвиваат реакции на хидролиза и се ослободува слободната форма на АВА. Важно е да се напомене дека АВА која потекнува од корените се транспортира до надземните органи на растението пред да настане намалување на водениот потенцијал во почвата кој може значајно да го промени водениот статус во листовите. Според тоа, АВА претставува важен сигнален молекул во корените кој овозможува редуцирање на интензитетот на транспирација преку затворање на стомите во листовите.

За време на раниот стадиум од водениот стрес настанува алкализација на ксилемскиот сок (рН вредноста се зголемува од рН 6,3 до рН 7,2). Дистрибуцијата на АВА помеѓу компартманите на растителните клетки се одвива според т.н. **концепт на „анјонска замка“**. Дисоцираната анјонска форма на АВА (ABA^-) како слаба киселина се акумулира во алкалните компартмани и може да се редистрибуира според рН градиентот преку мембраната. Во отсуство на воден стрес, концентрацијата на АВА во недисоцирана форма (ABAH) во апопластот се одржува на ниско ниво со помош на специфични котранспортери за инфлукс. Во услови на воден стрес настанува алкализација на апопластот и се фаворизира дисоцијација на АВА која не може да помине преку мембраната. На таков начин се намалува навлегувањето на АВА во мезофилните клетки, а се стимулира нејзиното навлегување во стомините клетки преку транспирациската сила (Сл. 5.4). Затоа, зголемувањето на рН вредноста на ксилемскиот сок функционира како сигнал за корените за затворање на стомините клетки преку дејството на АВА.



Слика 5.4 Редистрибуцијата на АВА во листовите настанува како резултат на алкализацијата на ксилемскиот сок за време на воден стрес.

5.6 Физиолошко дејство на абсцисинска киселина

Абсцисинската киселина има примарна регулаторна улога во иницијацијата и одржувањето на dormancy на семето и пупките, како и при одговорите на растенијата во услови на стрес (воден стрес). Исто така, АВА влијае врз голем број процеси на развојот на растенијата како антагонист на дејството на ауксините, цитокинините, гиберелините и етиленот.

5.6.1 Одбранбена улога на абсцисинска киселина при стрес фактори

Абсцисинската киселина претставува есенцијален медијатор во индукција на одбранбени одговори на растенијата кон неповолните фактори од надворешната средина. Така на пр., содржината на АВА се зголемува за време на аклимација на растенијата при ниски температури. Исто така, овој одбранбен одговор при ниските температури зависи од сортите на растенијата. Така на пр., сорта од пченица која е резистентна на замрзнување има повисока содржина на АВА во споредба со нерезистентни сорти. Интрацелуларната содржина на АВА може да се зголеми и при висок салинитет во почвата или при инфекција со тутунов мозаичен вирус. Според тоа, продукцијата на АВА е во позитивна корелација со степенот на резистентност на растенијата кон одреден стрес фактор. Егзогената апликација на АВА може да го зголеми адаптивниот одговор на растенијата кон различни стрес фактори (Табела 5.1).

Табела 5.1 Протеини кои се индуцираат под дејство на АВА во услови на стрес.

Растителен вид	Протеини	Тип на стрес
Ориз	RAB 16A, 16B	Салинитет и десикација
Пченица	EM, RAB 15	Суша
Јачмен	Дехидрини B8, B9, B17, B18	Десикација
Тутун	Осмотин	Салинитет
Домат	TAS 14	Салинитет и суша
Компир	Pt II	Повреда

5.6.2 Развитие на семе

Развитокот на семето кај цветните растенија се одвива во три фази: рана, средна и доцна фаза на ембриогенеза. За време на раната фаза од ембриогенезата настанува интензивирање на клеточните делби на зиготот, диференцијација на ткивата и пролиферација на ендоспермот. Во втората фаза се намалуваат клеточните делби и започнува акумулација на резервните материи во семето. За време на доцната ембриогенеза, ембрионот станува резистентен на десикација и семињата се сушат преку губење на вода до 90%. Како резултат на дехидратацијата настанува прекинување на метаболичките процеси и семињата навлегуваат во состојба на неактивност или мирување. За разлика од дормантните семиња, семињата во мирување можат да почнат да ртат при нивна рехидратација.

Развитокот на семето зависи од координираното дејство на неколку фитохормони:

- содржината на **IAA** и **цитокинини** се зголемува за време на раната фаза од ембриогенезата кога се одвиваат интензивни клеточни делби. Исто така, IAA има важна улога во воспоставувањето на поларноста кај младите ембриони.
- **гиберелинската киселина** учествува во растот на ембрионот и ендоспермот преку формирање на резервоар за фотосинтетските асимилати.
- содржината на **ABA** започнува да се зголемува кога ќе се намали содржината на сите останати хормони. Содржината на ABA е многу ниска во раната фаза од ембриогенезата, достигнува максимална вредност во текот на средната фаза од ембриогенезата, а потоа постепено се намалува како што семето достигнува стадиум на зрелост. Според тоа, постои широк пик на акумулација на ABA кој кореспондира со транзицијата од средна кон доцна фаза од ембриогенезата.

5.6.3 Толерантност кон десикација (сушење или дехидратација)

Познато е дека ABA индуцира толерантност кон десикација кај семињата. Десикацијата може да ги оштети мембраните и другите клеточни компартмани. За време на преминот од средна кон доцна фаза од развитокот на семето, содржината на ABA се зголемува и се активираат бројни метаболички процеси кои учествуваат во стекнување на толерантност кон десикација. Еден од овие процеси е синтеза на **специфични протеини кои се поврзани со ембриогенезата (late embryogenesis abundant-LEA)**. Овие хидрофилни и термостабилни протеини имаат заштитна улога при десикација на семето, бидејќи имаат способност да формираат водородни врски со сахарозата која се акумулира за време на матурација (зреење) на семето. Оваа интеракција ја модифицира сахарозата во високо вискозна течност со бавен степен на дифузија, при што се ограничува нејзиното учество во хемиските реакции и на таков начин се стекнува резистентност кон десикација на семето. Исто така, ABA влијае врз акумулацијата и составот на резервните протеини во семето. Во тој контекст, ABA-дефициентните мутанти имат редуцирана способност за акумулација на резервни протеини. Важно е да се напомене дека ABA ги одржува ембрионите во дормантна состојба додека не се оптимизираат надворешните услови за раст. Според тоа, дорманцијата на семето е важен фактор во адаптацијата на растенијата кон неповолните надворешни фактори.

5.6.3 Дорманција на семе

За време на матурација на семето, ембрионот преминува во состојба на мирување како резултат на процесот на десикација. Ртењето на семето може да се дефинира како

продолжување на растот на ембрионот на зрелото семе, кое зависи од условите во надворешната средина, како што се достапноста на вода и кислород, соодветна температура и отсуство на инхибиторни соединенија.

Во голем број случаи, вијабилните семиња не започнуваат да ртат, дури и ако се задоволени сите надворешни услови за оптимален раст. Овој феномен се означува како **дорманција на семе**. Дорманцијата на семето претставува привремено одложување на процесот на ртење, при што се овозможува дополнително време за расејување на семето на големи просторни растојанија. Исто така, дорманцијата на семето го обезбедува преживувањето на изртените растенија поради тоа што се спречува предвременото ртење во неповолни надворешни услови.

Постојат два типа на дорманција на семе:

- **дорманција зависна од семеновата обвивка,**
- **дорманција на ембрионот.**

Кај првиот тип, дорманцијата на семето зависи од семеновата обвивка и другите заштитни ткива (ендосперм, перикарп). Ембрионот кај овие семиња може да рти само доколку се отстрани или оштети семеновата обвивка или околните ткива со цел да се обезбеди присуство на вода и кислород. Дорманцијата на семето зависна од семеновата обвивка се базира на следните механизми:

1. спречување на примање на вода,
2. механичко ограничување на пенетрација на ембрионалниот корен (радикула) од семето поради ригдноста на семеновата обвивка,
3. ниската пермеабилност на семеновата обвивка за кислород, при што се инхибира ртењето на семето поради ограничената достапност на гасот до ембрионот,
4. ретенција или задржување на инхибиторите на растот кои не се ослободуваат од семето поради семеновата обвивка,
5. зголемена продукција на инхибитори на растот (АВА) од страна на семеновата обвивка или перикарпот кои го спречуваат ртењето на семето.

Дорманцијата на ембрионот или ендегената дорманција не зависи од присуството на семеновата обвивка или другите околни ткива во семето. Кај овој тип на дорманција, котиледоните имаат инхибиторен ефект врз ртењето на ембрионот. Кај некои растенија (лешник, јасен, праска), дорманцијата на ембрионот може да се елиминира со отстранување на котиледоните од семето. Дорманцијата на ембрионот се базира на присуството на инхибитори (АВА) или отсуството на стимулатори на растот (GA₃). Губењето на дормантноста на ембрионот најчесто се поврзува со значајно намалување на односот АВА/GA₃.

Различни надворешни фактори влијаат врз ослободување на семето од дорманција на ембрионот:

1. **Зреење.** Голем број семиња ја губат дормантноста кога содржината на вода се редуцира до одредено ниво преку сушење.
2. **Ладење.** Голем број семиња ја губат дормантноста и започнуваат да ртат кога се експонираат одреден период на ниска температура (0-10°C) и се имбибираат.
3. **Светлина.** Некои семиња ја губат дормантноста при кратко експонирање на светлина (зелена салата), неколкукратен третман со светлина (*Kalanchoe*) или при специфичен фотопериод од кратки или долги денови.

Мутанти од *Arabidopsis (aba)* кои се дефициентни во однос на содржината на АВА се користат за потврдување на улогата на овој инхибитор во дорманција на семето. Всушност, *aba* мутантите не покажуваат дормантност при матурација на семето, дури и при егзогена апликација на АВА. Важно е да се напомене дека севкупниот ефект на АВА врз дорманција на семето зависи и од присуството на други фитохормони. Така на пр.,

зголемувањето на содржината на АВА во семињата кореспондира со намалувањето на концентрацијата на IAA и GA₃. Испитувањето на ефектот на АВА/GA₃ односот кај семиња од *Arabidopsis* покажало дека семињата немаат способност за ртење без егзогена апликација на GA₃. Според тоа, балансот во концентрацијата на фитохормоните има клучно значење во регулација на развитокот на семето и ембрионите.

5.6.4 Инхибиција на предвременно ртење и вивипарија

Изолацијата на незрели ембриони од семињата и нивно инокулирање на хранлив медиум предизвикува предвременно ртење, бидејќи ембрионите не поминуваат преку природната фаза на дорманција. Од друга страна пак, егзогената апликација на АВА во хранливиот медиум го спречува предвременото ртење на ембрионот. Овие податоци покажуваат дека ендегената содржина на АВА се зголемува при преминот од средна кондоцна фаза од ембриогенезата и дека АВА е природен ограничувачки фактор кој ги одржува ембрионите во ембриогена состојба. Улогата на АВА во спречување на предвременото ртење на ембрионот е потврдена и кај АВА-дефициентните мутанти од пченка кои ртат директно на кочанот. Овој процес е познат како **вивипарија** (Сл. 5.5). Вивипаријата кај овие мутанти може да се спречи преку егзогена апликација на АВА.



Слика 5.5 Предвременно ртење (вивипарија) кај АВА-дефициентен мутант од пченка.

5.6.5 Дорманција на пупки

Дорманцијата е значајна адаптивна особина кај дрвенестите растенија во студени климатски услови. Всушност, дрвенестите видови кои се експонирани на многу ниски температури во текот на зимата ги заштитуваат меристемските ткива со помош на заштитните листови на пупките и привремено стопирање на растот на пупките. Овој одговор на растенијата кон ниските температури зависи од сензорен механизам кој ги детектира промените во надворешната средина како сензорни сигнали, како и контролен систем кој врши трандукција на овие сигнали и индуцира специфични процеси кои водат кон дорманција на пупките.

Абсцисинската киселина ја индуцира дорманцијата бидејќи се акумулира во дормантните пупки, а концентрацијата на овој фитохормон се намалува откако ткивото ќе се експонира на ниски температури. Подоцнежните студии покажуваат дека содржината на АВА не секогаш е во корелација со степенот на дорманција на пупките. Овие неконзистентни податоци покажуваат дека дорманцијата и растот на пупките се регулираат преку воспоставувањето на рамнотежа помеѓу инхибиторите на растот (АВА) и стимулаторите на растот (цитокинини и гиберелини).

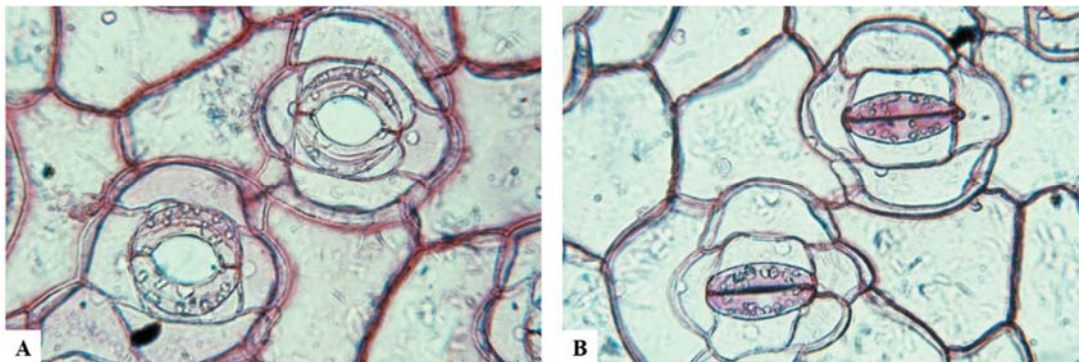
5.6.6 Антагонистичко дејство на АВА врз гиберелини

Абсцисинската киселина се спротивставува на дејството на гиберелините, како што е индукцијата на хидролази и α -амилази кај семињата во фаза на ртење. Всушност, АВА ја инхибира синтезата на хидролитички ензими кои имаат есенцијално значење за хидролиза на резервните соединенија во семињата. Исто така, АВА ја инхибира транскрипцијата на mRNA од α -амилаза преку два механизми:

- специфичен протеин кој претставува активатор на АВА-индуцираната генска експресија и делува како транскрипциски репресор на некои гени кои се регулираат од страна на гиберелините,
- АВА ја репресира GA-индуцираната експресија на GA-M γ B како транскрипциски фактор кој ја индуцира експресијата на α -амилаза.

5.6.7 Затворање на стоми при воден стрес

Акумулацијата на АВА во листовите на растенија при воден стрес има значајна улога во намалување на загубите на вода преку транспирација. При воден дефицит, АВА-дефициентните мутанти овенуваат поради тоа што немаат способност за затворање на стомите. Од друга страна пак, апликацијата на АВА кај овие мутанти предизвикува затворање на стомите и зголемување на тургоровиот притисок. Исто така, АВА ја зголемува пермеабилноста на хлоропластните мембрани во мезофилните клетки на листовите, при што се овозможува дифундирање на АВА во цитоплазмата и натамошен транспорт преку плазмодезмите до стомините клетки. Откако ќе се водениот потенцијал на стомите, тогаш се прекинува навлегувањето на АВА во овие клетки. Познато е дека АВА предизвикува затворање на стомите преку инхибирање на АТР-зависните протонски пумпи и јонските канали во стомините клетки (Сл. 5.6).



Слика 5.6 Затворање на стоми под дејство на абсцисинска киселина (АВА). Отварање на стоми кај листови од *Commelina communis* кои се инкубирани во пуферен раствор и воздух без присуство на CO₂ (A). Затворање на стоми кои се инкубирани во исти услови со додавање на 10 μ M АВА (B).

5.6.8 Стимулирање на раст на корени и инхибиција на изданоци при воден стрес

Абсцисинската киселина покажува различни ефекти врз растот на корените и изданоците и овие ефекти значајно зависат од водениот статус на растението. Во услови на воден стрес кога е зголемена содржината на АВА во листовите настанува стимулирање на растот на коренот преку супресија во продукцијата на етилен, а воедно

се инхибира растот на изданоците. Ова зголемување на односот корен/изданок при низок воден потенцијал, како и ефектот на АВА врз затворање на стомите има големо значење кај растенијата во справувањето со водениот стрес.

5.6.9 Стимулирање на сенесценција на листови независно од дејството на етилен

Абсцисинската киселина оригинално била изолирана како фитохормон кој предизвикува абсцисија на растителните органи. Подоцнежните истражувања покажале дека АВА стимулира абсцисија на органи само кај неколку растителни видови, а примарна улога во абсцисија на листовите и плодовите има етиленот. Важно е да се напомене дека АВА учествува во сенесценција (стареење) на листовите и преку овој ефект ја зголемува продукцијата на етилен и индиректно ја стимулира абсцисијата.

Сенесценцијата на листовите се одвива побрзо во услови на темно, отколку при светлина и листовите пожолтуваат како резултат на деградацијата на хлорофилот. Исто така, АВА ја стимулира активноста на различни хидролази кои индуцираат разградување на протеините и нуклеинските киселини за време на сенесценција на листовите.

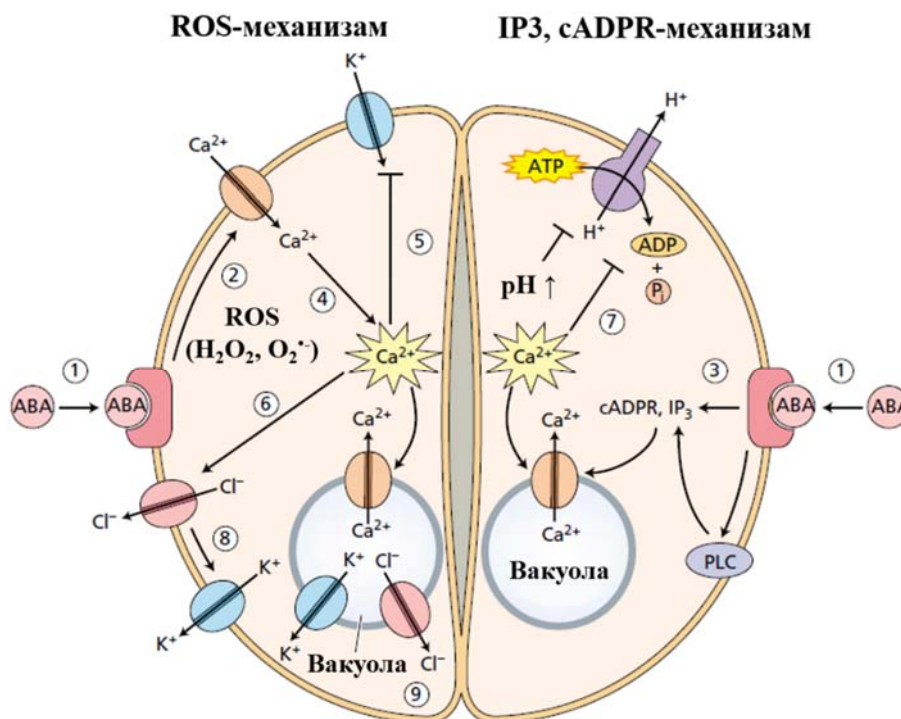
5.7 Механизам на дејство на абсцисинска киселина врз затворање на стомите

Абсцисинската киселина индуцира краткорочни физиолошки ефекти (затворање на стоми) и долгорочни ефекти врз развитокот (матурација на семе) со цел да се овозможи заштита на растенијата од воден стрес. Брзите физиолошки одговори опфаќаат промени во флуksот на јони преку мембраните и регулација на гени. Долгорочните одговори вклучуваат големи промени во генската експресија.

Рецепторот за АВА е протеин кој е локализиран на надворешната страна на клеточната мембрана. Затворањето на стомите се одвива преку намалување на тургоровиот притисок на стомините клетки преку ефлукс на K^+ јони. Екстрацелуларната апликација на АВА покажува инхибиторен ефект врз отворањето на стомите при рН 6. При оваа рН вредност настанува протонирање на АВА и нејзино примање од страна на стомините клетки. Првите промени кои настануваат при експозиција на стомините клетки кон АВА опфаќаат мембранска деполаризација како резултат на инфлуксот на H^+ и зголемување на цитоплазматската концентрација на Ca^{2+} . Притоа, АВА стимулира инфлукс на Ca^{2+} преку калциумовите канали на клеточната мембрана и ослободување на Ca^{2+} од внатрешните компартмани (вакуоли). Ослободувањето на калциум може да се индуцира и од секундарните гласници (Сл. 5.7), како инозитол 1,4,5-трифосфат (IP3), циклична ADP-рибоза (сADPR) или реактивните кислородни форми (ROS), како што се водород пероксид (H_2O_2) и супероксидниот анјон ($O_2^{\bullet-}$). Исто така, АВА предизвикува алкализација на цитоплазмата од рН 7,6 до 7,9. Оваа состојба на алкализација ги активира излезните K^+ канали на клеточната мембрана преку зголемување на бројот на активни јонски канали.

Брзата и привремена деполаризација на мембраната под дејство на АВА не е доволна за отворање на излезните K^+ канали. Отворањето на K^+ канали зависи од долготрајна мембранска деполаризација. Со цел да се постигне оваа состојба, АВА ги активира бавните јонски канали кои водат кон долготрајна мембранска деполаризација. Всушност, долготрајната деполаризација се индуцира преку АВА-индуцирана деполаризација на клеточната мембрана и зголемување на цитоплазматската концентрација на калциум. Овие два фактора се неопходни за отворање на бавните (S-тип) калциумови канали на клеточната мембрана. Пролонгираното отворање на овие бавни анјонски канали овозможува излегување на големи количества на хлоридни и

малатни јони надвор од клетката во насока на нивниот електрохемиски градиент. Ефлуксот на овие негативно наелектризирани јони ја деполаризираат мембраната и индуцираат отворање на излезни K^+ канали (Сл. 5.7).



Слика 5.7 Механизам на дејство на абсцисинска киселина (ABA) врз затворање на стомини клетки. R: рецептор, ROS: реактивни кислородни форми, cADPR: циклична ADP-рибоза, PLC: фосфолипаза C.

1. ABA се врзува за рецепторите. 2. Интеракцијата ABA-рецептор индуцира формирање на реактивни кислородни форми кои ги активираат Ca^{2+} -каналите на плазмалемата. 3. ABA ја зголемува содржината на циклична ADP-рибоза и IP_3 , кои активираат дополнителни Ca^{2+} -каналите на тонопластот. 4. Инфлуксот на Ca^{2+} предизвикува осцилации во интрацелуларната концентрација и натамошно ослободување на калциум од вакуолите. 5. Зголемувањето на интрацелуларната концентрација на Ca^{2+} ги блокира влезните K^+ -каналите. 6. Зголемувањето на интрацелуларната концентрација на Ca^{2+} ги стимулира излезните Cl^- -каналите на плазмалемата и предизвикува мембранска деполаризација. 7. Протонската пумпа на плазмалемата се инхибира преку ABA-индуцираното зголемување на цитоплазматската содржина на Ca^{2+} и зголемување на интрацелуларната pH вредност, кои дополнително ја деполаризираат мембраната. 8. Мембранската деполаризација ги активира излезните K^+ -каналите. 9. Катјоните (K^+) и анјоните (Cl^-) се ослободуваат од вакуолите во цитоплазмата, а потоа излегуваат преку клеточната мембрана.

Покрај индуцираното затворање на стомите, ABA спречува отворање на стомите под дејство на светлината. Притоа, ABA делува преку инхибирање на влезните K^+ канали кои се отвораат кога мембраната е хиперполаризирана од страна на протонските пумпи. Инхибицијата на влезните K^+ канали се одвива преку ABA-индуцирано зголемување на

цитоплазматската концентрација на калциум. Според тоа, калциумот и рН вредноста влијаат врз јонските канали на клеточната мембрана на два начина:

1. калциумот и рН средината спречуваат отворање на стомите преку инхибиција на влезните K^+ канали и мембранските протонски пумпи,
2. калциумот и рН средината стимулираат затворање на стомите преку активирање на излезните анјонски канали, што води кон активирање на излезните K^+ канали.

Сите овие податоци покажуваат дека АВА стимулира два типа на одговори кај растенијата: брзи одговори како затворање на стомите и долгорочни одговори како дорманција на семе и одбранбените реакции кон абиотички стрес фактори. Се претпоставува дека постојат различни рецептори за АВА кои влијаат врз овие одговори.

5.8 Влијание на абсцисинска киселина врз растителни *in vitro* култури

За научно-истражувачки цели и комерцијална пропација на растенијата во *in vitro* услови се користи синтетска форма на абсцисинска киселина која претставува мешавина од еднакви количества на S и R енантиомери на АВА. Кај култури на растителни клетки и ткива, АВА може да има стимулативен ефект врз растот на растителните експлантати, морфогенезата и соматската ембриогенеза.

5.8.1 Раст на калусни култури

Ефектите на АВА врз растот на калусните култури зависи од нејзината концентрација во хранливиот медиум. Ниските концентрации на АВА го стимулираат растот на калусните култури од домати и моркови, а високите концентрации на АВА ($> 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) имаат инхибиторен ефект врз растот на калусни клетки од *Ipomoea*. Инхибиторното дејство на АВА врз растот на калусите најверојатно се должи на примената на нефизиолошки концентрации на овој фитохормон.

5.8.2 Формирање на адвентивни изданоци и корени

Влијанието на АВА врз морфогенетските одговори на растенијата зависат од ендегената содржина на АВА во растителните ткива. Така на пр., сезонската варијација на листовите од *Begonia* за формирање на изданоци е во корелација со ендегената содржина на АВА во листовите. Исто така, ендегената содржина на АВА кореспондира со стадиумот на матурација на ткивата. Така на пр., апликацијата на АВА во хранливиот медиум стимулира формирање на цветни пупки кај култивирани експлантати во вегетативен стадиум на развој. Примената на ниска концентрација на АВА ($< 0,2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) има стимулативен ефект врз морфогенезата на корени и изданоци од изолирани експлантати, а високите концентрации на АВА ја инхибираат морфогенезата.

5.8.3 Ембриогенеза

Абсцисинската киселина има есенцијално значење за раст на соматските ембриони. Присуството на АВА во хранливиот медиум овозможува раст на соматски ембриони кои имаат сличен развој и структура како и зиготските ембриони. Манипулацијата на ендегената или егзогената содржина на АВА може да ја зголеми фреквенцијата на добивање на зрели ембриони. Така на пр., егзогената апликација на АВА спречува формирање на абнормални ембриони кај култури на клеточни суспензии (фузионирани ембриони, формирање на зрели листови наместо ембриони). Исто така, третманот со

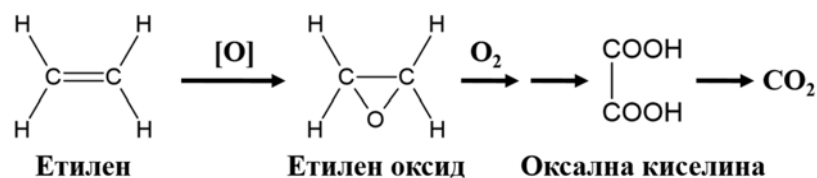
ABA спречува формирање на секундарни соматски ембриони кои се развиваат на веќе формираните ембриони.

Сепак, присуството на ABA може да го стопира натамошниот развиток на формираните соматски ембриони и затоа е неопходно нивно субкултивирање на медиум без ABA. Инхибицијата на формирање на соматски ембриони под дејство на ABA се должи на примената на нефизиолошка концентрација на овој фитохормон или промените во концентрациите на ABA за време на ембриогенезата. Така на пр., ниската ендогена концентрација на ABA кај калусни култури од винова лоза е во корелација со предвременото ртење на соматските ембриони. Инхибиторниот ефект на ABA врз развитокот на соматските ембриони е сличен со инхибираниот раст на зиготските ембриони во природни услови преку кој се спречува предвремено ртење на ембрионите.

6. ЕТИЛЕН

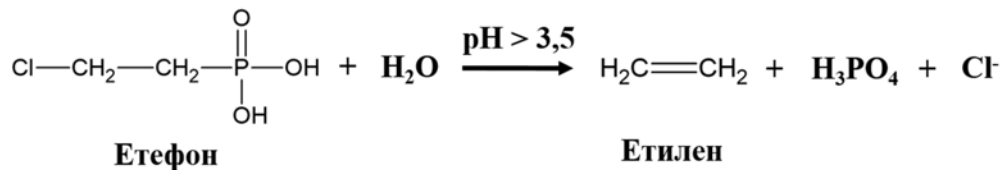
Етиленот (C_2H_4) е првиот откриен гасовит фитохормон и сигнален молекул кој се синтезира кај растенија. Со оглед на тоа што етиленот може да дифундира и да влијае врз околните растенија, овој гас има карактеристики на феромон. Етиленот може да има штетно или корисно дејство кај растенијата во зависност од неговата концентрација, стадиумот на развојот на ткивата и растителниот вид. Исто така, етиленот учествува во адаптивните одговори на растенијата кон различни стрес фактори, како салинитет, напад од патогени, поплавување и суша. Поради значајната акумулација на етиленот кај растенијата при различни абиотички и биотички стрес фактори, овој фитохормон уште се нарекува и стрес хормон. Етиленот има есенцијална улога во зреење на климактеричните плодови кои продолжуваат да зреат после нивно отстранување од растението (домат, јаболко, круша и банана).

Етиленот е безбоен гас кој е полесен од воздухот и подлежи на оксидација до етилен оксид. Во растителните ткива, етиленот може целосно да се оксидира до CO_2 (Сл. 6.1).



Слика 6.1 Оксидација на етилен кај растенијата.

Комерцијален извор на етилен е **етефон** или **етрел** (2-хлороетилфосфонска киселина), кој се користи за прскање на растенијата за да се индуцира цветање, како и да се спречи полегнување на житните растенија бидејќи ја инхибира елонгацијата на стеблото. Откако ќе се апсорбира од страна на растенијата, етрелот се разградува во кисела средина до етилен, фосфорна киселина и хлороводородна киселина (Сл. 6.2). Исто така, етиленот е спореден производ од нецелосното согорување на органските горива и во атмосферата е присутен како резултат на шумски пожари, издувните гасови на возилата и вулканските ерупции. Најголем ризик од работа со чист етилен е неговата експлозивност и запаливата природа.



Слика 6.2 Реакција на формирање на етилен од етефон.

6.1 Откривање на етилен

Откривањето на етиленот започнува од средината на XIX-тиот век при истекување на гас кој се користел за осветлување на домови и улици, при што било забележано дека гасот предизвикува оштетувања кај растенијата. Подоцна бил идентификуван етиленот како активна компонента од гасот за осветлување кој влијае врз растот на растенијата. На почетокот на XX-тиот век било потврдено дека етиолирани растенија од грашок реагираат на дејството на етиленот преку формирање на кратки и дебели хипокотили со

диагеотропизам (раст на растителни органи нормално на гравитацијата). Ова е првиот откриен ефект на етиленот врз растенијата кој е познат како **трикратен одговор**. Натамошните истражувања покажале дека етиленот е фитохормон кој се синтетизира од растителните организми и има значајно влијание врз растот и развитокот на растенијата.

6.2 Споредба на етилен и негасовити фитохормони

Етиленот покажува биолошка активност во многу ниска концентрација (0,1-1 ppm). Сепак, некои растителни видови покажуваат повисока или пониска сензитивност кон дејството на етиленот. Некои климактерични плодови (јаболко и домати) можат да продуцираат етилен во концентрација до 10 ppm. Постојат голем број карактеристики според кои етиленот се разликува од останатите негасовити фитохормони:

1. Етиленот е порастворлив во липидниот двослој на мембраните во споредба со водената средина. Овој гас може слободно да дифундира преку клеточната мембрана. Прекурсорот на етиленот 1-аминоциклопропан-1-карбоксилна киселина (АСС) има хидрофилни својства и се транспортира во растенијата преку ксилемот.
2. Транспортот на етиленот до целните клетки во растителните организми не зависи од присуството на транспортни протеини.
3. Етиленот не конјугира со други соединенија за да функционира како интрацелуларна резерва и не се деградира со цел да настане негова деактивација. Кога присуството на етилен не е потребно за растенијата, овој гас слободно дифундира преку интерцелуларните простори во надворешната средина.

6.3 Биотестови за докажување на дејство на етилен и анализа на мутанти

Третманот на етиолирани изртени семиња од дикотиледони растенија со етилен индуцира уникатни морфолошки промени кои се означуваат како трикратен одговор. Трикратниот одговор кај растенијата е високо специфичен и сензитивен тест за детекција на етиленот (Сл. 6.3). Овој одговор се карактеризира со инхибиција на елонгацијата на хипокотилот и коренот, радијално задебелување на хипокотилот и свиткување на врвниот дел на стеблото во форма на кука.

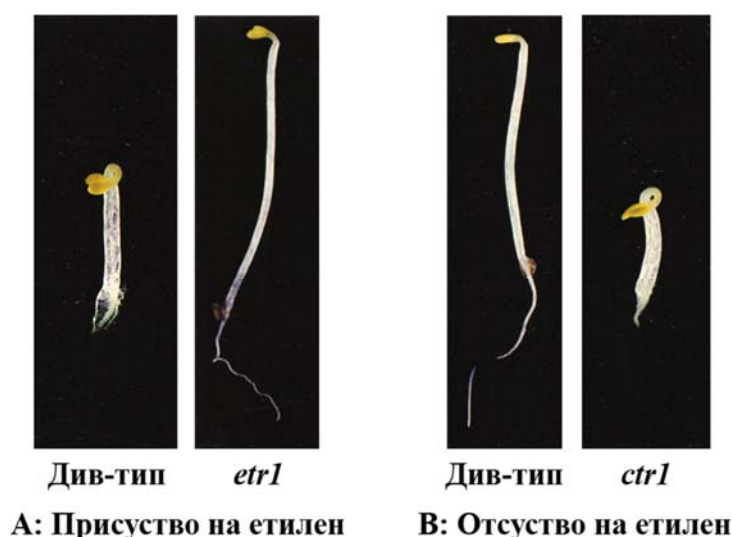


Слика 6.3 Трикратен одговор кај етиолирани изртени растенија од леблебија и грашок под дејство на етилен како извор на етилен.

Отсуството на овој трикратен одговор при егзогена апликација на етилен се користи за идентификација на етилен-резистентни мутанти кои се групираат во 3 категории:

1. мутанти со конститутивен трикратен одговор (*ctr1*) кои реагираат во отсуство на етилен,
2. мутанти со етилен-несензитивен трикратен одговор (*etr1*),
3. мутанти кај кои несензитивноста на етилен е ограничена во специфични ткива, како врвниот дел на стеблото или коренот.

Експериментите врз овие мутанти се појдовна точка за идентификација на неколку рецептори за етиленот и медијаторите во сигналните каскадни реакции на етиленот. Мутантите *ctr1* покажуваат трикратен одговор во отсуство на етилен и се карактеризираат со конститутивно активиран сигнален пат за етилен поради прекумерната продукција на етилен во споредба со дивот-тип или активирањето на сигналниот пат во отсуство на етилен. Мутантите *etr1* имаат долг хипокотил и се дефициентни во перцепцијата или трансдукцијата на сигналот од етилен (Сл. 6.4).



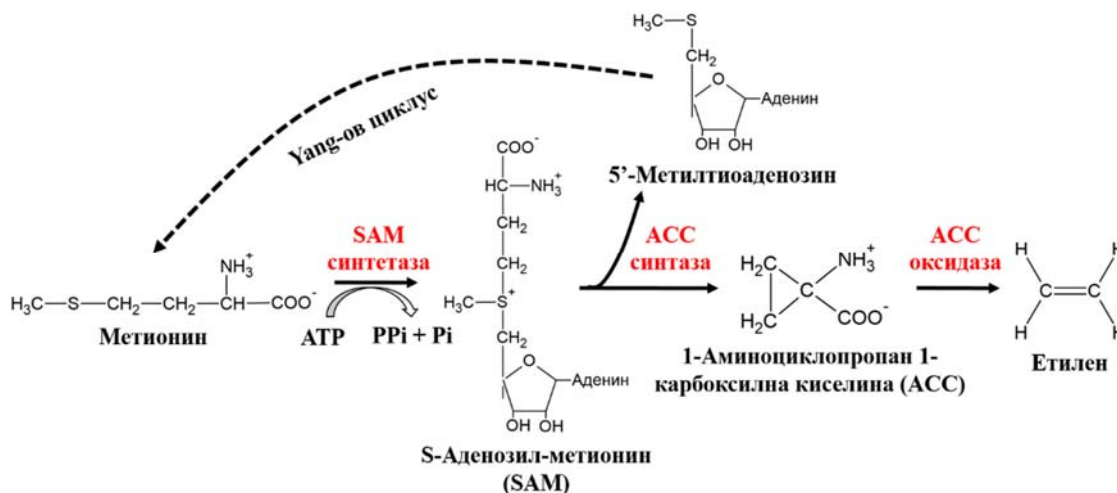
Слика 6.4 Споредба на трикратен одговор под дејство на етилен кај див-тип и мутанти од *Arabidopsis*. Во присуство на етилен, див-тип растенијата покажуваат трикратен одговор (краток корен и хипокотил и свиткано стебло), а *etr1* мутантите растат како див-тип растенијата (А). Во отсуство на етилен, *ctr1* мутантите покажуваат конститутивен трикратен одговор (В).

6.4 Биосинтеза на етилен

Сите растителни органи имаат способност за продукција на етилен, меѓутоа сенесцентните листови и зрелите плодови се карактеризираат со највисока содржина на етилен. Етиленот покажува биолошка активност при многу ниска концентрација ($< 1 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$). Сепак, концентрацијата на етилен кај зрели јаболка може да достигне до $2500 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$. Исто така, младите листови во развојот продуцираат до 10 пати повисока содржина на етилен во споредба со целосно развиените листови. Со неколку исклучоци, несенесцентните листови кои се механички повредени можат привремено да ја зголемат продукцијата на етилен, а подоцна настанува нормализирање на концентрацијата. Покрај скриеносемените растенија, етиленот се синтетизира и кај голосемени растенија, папрати, мовови, лишави и некои цијанобактерии.

Биосинтезата на етилен се одвива во 3 реакции кои започнуваат од аминокиселината метионин (Сл. 6.5).

1. Метионинот се конвертира во **S-аденозил-L-метионин (SAM)** под дејство на ензимот SAM синтетаза.
2. SAM се конвертира во **1-аминоциклопропан-1-карбоксилна киселина (ACC)** под дејство на ензимот ACC синтаза (ACS).
3. ACC се оксидира во **етилен** под дејство на ензимот ACC оксидаза (ACO).



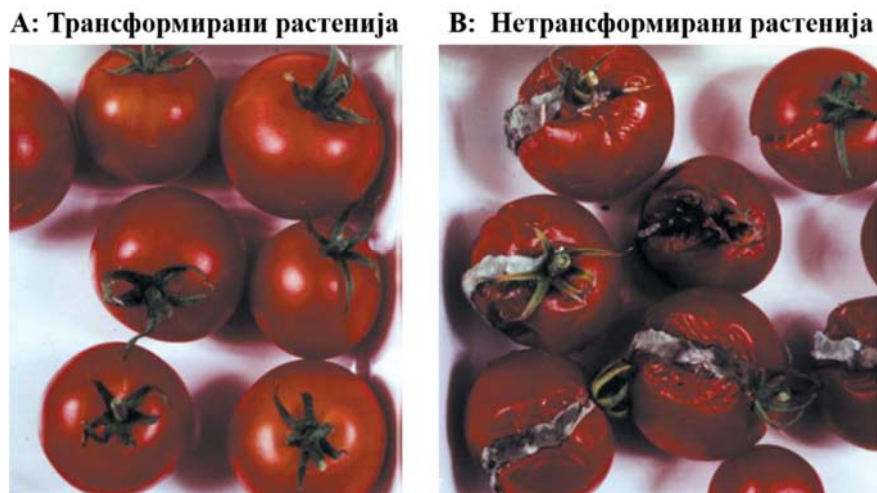
Слика 6.5 Биосинтеза на етилен.

Биосинтезата на етилен се контролира преку активноста на ензимот ACC синтаза кој се индуцира под дејство на различни стрес фактори (повреда, суша, поплавување), како и при зреење на плодовите. Ензимот ACC е нестабилен цитоплазматски ензим и се кодира од бројни гени кои диференцијално се регулираат под дејство на различни фактори кои индуцираат биосинтеза на етилен. Кај растенијата, метионинот е присутен во ограничено количество и се регенерира преку т.н. Yang-ов циклус. Ако не се изврши рециклирање на метионинот преку овој циклус, содржината на редуцираниот сулфур може да ја ограничи достапноста на метионин за биосинтеза на етилен. При биосинтезата на етиленот се врши рециклирање на метионинот при што се спречува неговото трошење. Ензимот ACC синтаза е регулаторна точка во биосинтезата на етилен и содржината на овој ензим се контролира преку негова транскрипција и стабилизирање на протеинот. Зголемената продукција на етилен при ртење на семе, зреење на плодови, како и други стрес состојби се поврзува со зголемена продукција на ACC поради активирање на ензимот ACC синтаза.

Ензимот ACC оксидаза го катализира последниот чекор од биосинтезата на етилен. Активноста на ACC оксидаза може да биде регулаторна точка во биосинтезата на етилен кај некои растителни ткива кои се карактеризираат со низок степен на продукција на етилен. Активноста на овој ензим зависи од присуството на Fe^{2+} и аскорбат како кофактори. При ензимската реакција катализирана од ACC оксидаза се формира цијаномравска киселина која спонтано се деградира до цијанид кај растенијата. Сепак, растенијата поседуваат уникатен биохемиски механизам за детоксификација на цијанидот.

Голем број плодови имаат способност за продукција на етилен, кој учествува во нивното зреење. Техниките за клонирање на гените за ензимите ACC синтаза и ACC оксидаза овозможиле продукција на трансгени растенија со модифициран интензитет за

биосинтеза на етилен. На таков начин се добиени трансгени домати со ниска содржина на етилен кои можат да созреваат, меѓутоа не зреат и имаат продолжен рок на траење за 6 месеци. Интродукцијата на cDNA за ензимите ACC синтаза или ACC оксидаза во *antisense* ориентација предизвикува стивнување на експресијата на соодветните гени и на таков начин се добиваат растенија кои продуцираат ниска концентрација на етилен (Сл. 6.6). Содржината на етилен кај растенијата може да се редуцира и преку хидролиза на SAM под дејство на ензимот SAM хидролаза.



Слика 6.6 Ефект на стивнување на генот за ензимот ACC оксидаза врз зреење и расипување на плодови од домати (*Solanum lycopersicum*). Плодовите од трансформирани растенија целосно созреваат, меѓутоа не презреваат и не се расипуваат долг временски период бидејќи продуцираат околу 5% од нормалната содржина на етилен (А). Нетрансформирани плодови кои се одржувани во исти услови како и трансформирани плодови продуцираат нормална содржина на етилен и покажуваат знаци на презревање и расипување (В).

6.5 Инхибитори на биосинтезата и дејството на етилен

Биосинтезата на етиленот може да се инхибира под дејство на различни хемиски соединенија:

- **аминоетоксивинилглицин (AVG)** е силен инхибитор на биосинтезата на етилен кај растенијата преку инхибирање на ензимот ACC синтаза. Овој инхибитор може да се користи во ниска концентрација ($1-50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) без да предизвика токсичност кај растителните ткива.
- **јони на кобалт** спречуваат конверзија на ACC во етилен. Третманот на растенијата со Co^{2+} ($50-500 \mu\text{M}$) индуцира зголемување на содржината на ACC.
- **аноксија и оксидациски инхибитори (антиоксиданти)**. Аноксигената ја инхибира продукцијата на етилен бидејќи кислородот е неопходен за конверзија на ACC во етилен. Продукцијата на етилен може да се намали и под дејство на различни оксидациски инхибитори (салицилна киселина, ацетил салицилна киселина и пропил галат).
- **хелатирачки агенси** како EDTA ја намалуваат синтезата на етилен преку хелатирање на Fe^{2+} јоните кои се кофактори на ензимот ACC оксидаза.

Некои соединенија и физички фактори од надворешната средина имаат способност да го намалат дејството на етиленот. Овие инхибитори стапуваат во конкуренција со рецепторите за етилен или дејствуваат преку непознати механизми. Во оваа група на инхибитори се вбројуваат: сребрени јони, CO₂, некои хемиски соединенија и цитокинините.

Сребрени јони (Ag⁺). Сребро тиосулфат (Ag₂S₂O₃) и сребро нитрат (AgNO₃) се специфични инхибитори на дејството на етиленот.

Јаглерод диоксид. Високите концентрации на CO₂ (5-10%) имаат антагонистички ефект врз дејството на етиленот (пр. инхибирана елонгација на епикотил или хипокотил или зреење на плодови). Од друга страна пак, атмосферската концентрација на CO₂ е неопходна за некои одговори на рас*тенијата при дејството на етиленот.

Хемиски инхибитори. Постојат различни волатилни (испарливи) јаглеводороди (2-бутен, циклооктен, метилциклопропен) кои го инхибираат дејството на етиленот преку конкуренција со етиленот за врзувачките места на неговите рецептори.

Цитокинини. Цитокинините имаат антагонистички ефекти врз дејството на етиленот, како што е сенесценција на листови.

6.6 Физиолошко дејство на етилен

6.6.1 Зреење на плодови

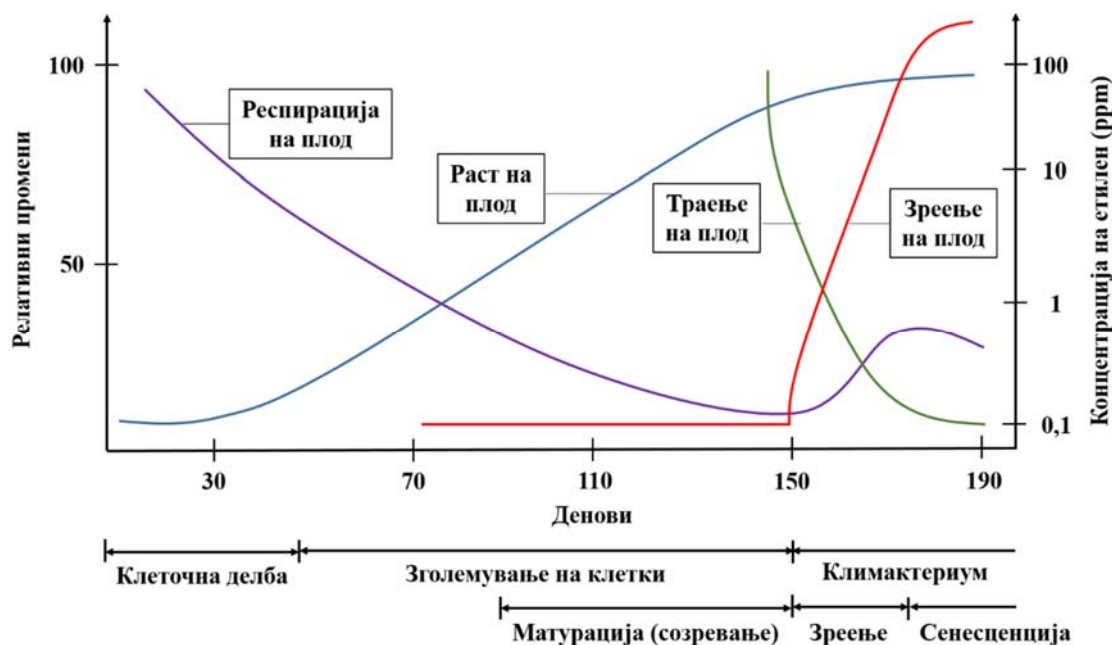
Во секојдневната употреба, терминот **зреење на плодови** се однесува на промените кои настануваат во плодовите, при што тие можат да се консумираат во исхраната. Од ботанички аспект, зреењето на плодовите означува дека семињата се доволно развиени за да можат да се расејуваат во средината. Етиленот претставува значаен фитохормон кој го забрзува процесот на зреење кај плодовите. Климактеричните плодови (**Табела 6.1**) при развитокот бавно зреат, а во крајниот стадиум се одвиваат брзи промени во развитокот.

Табела 6.1 Климактерични и неклимактерични плодови.

Климактерични плодови	Неклимактерични плодови
Јаболко	Лимон
Авокадо	Портокал
Банана	Грозје
Диња	Ананас
Смоква	Јагода
Манго	Лубеница
Праска	Пиперка
Круша	Цреша
Слива	
Маслинка	
Домат	

Овие промени кои се предизвикани од етиленот опфаќаат разградување на клеточните сидови, конверзија на скробот во растворливи шеќери, намалување на содржината на органски киселини и фенолни соединенија (танини), деградација на хлорофилот, како и промена на боја и појава на арома. Карактеристичен ефект на етиленот кај климактеричните плодови е зголемување на неговата продукција преку позитивна повратна врска. Вуспност, високата акумулација на етилен преку

автокаталитички процес предизвикува дополнителна продукција на етилен. При крајните фази од созревањето на климактеричните плодови настанува брзо и експоненцијално зголемување на содржината на етилен. Ова зголемување на концентрацијата на етилен и брзото завршување на развитокот на плодовите е познато како **климактериум** (Сл. 6.7).



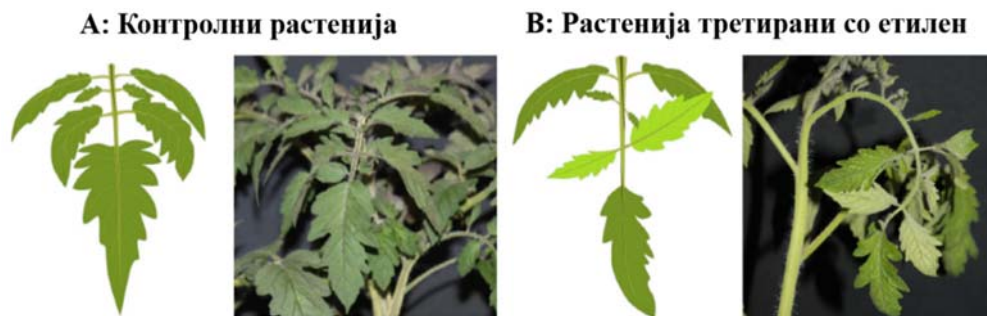
Слика 6.7 Промени во развитокот на климактерични плодови.

Кај неклимактеричните плодови (портокал, лимон, грозје, лубеница), етиленот не ја стимулира сопствената продукција. Кај овие плодови, содржината на етилен останува стабилна и не настануваат брзи промени пред да заврши нивниот развиток. Сепак, зреењето кај неклимактеричните плодови може да се забрза ако се постават заедно со зрели климактерични плодови. Егзогената апликација на етилен стимулира дополнителна продукција на етилен кај климактеричните плодови, што е проследено со значајно зголемување на степенот на респирација (Сл. 6.7). Од друга страна пак, апликацијата на етилен кај неклимактеричните плодови предизвикува мало зголемување на ендегената продукција на етилен без да настане интензивирање на респирацијата.

6.6.2 Епинастија на листови

Надолното свиткување на листовите кое се јавува како резултат на побрзиот раст на горниот дел на лиската од долниот дел се нарекува **епинастија**. Овој феномен на епинастија се индуцира под дејство на етиленот и високата концентрација на ауксини, бидејќи ауксините индиректно делуваат врз индуцирање на биосинтезата на етилен. Исто така, некои стрес фактори (салинитет, инфекција со патогени) можат да ја стимулираат продукцијата на етилен и да индуцираат епинастија на листовите. Кај растенијата од домот, поплавувањето и анаеробните услови околу корените ја зголемуваат акумулацијата на етилен во изданоците, при што се индуцира епинастичен одговор (Сл. 6.8). Овие стрес фактори се перцепираат од корените, а одговорот на стрес состојбата се рефлектира на изданоците и листовите. Овие податоци покажуваат дека перцепираните сигнали од корените стимулираат синтеза на АСС како непосреден

прекурсор во биосинтезата на етилен кој се акумулира во корените. Формираниот АСС во корените се транспортира преку ксилемскиот спроводен систем и транспирациската сила до изданоците, каде што се конвертира во етилен и се индуцира епинастичен одговор кај листовите.



Слика 6.8 Појава на епинастија кај листови од домати третирани со етилен.

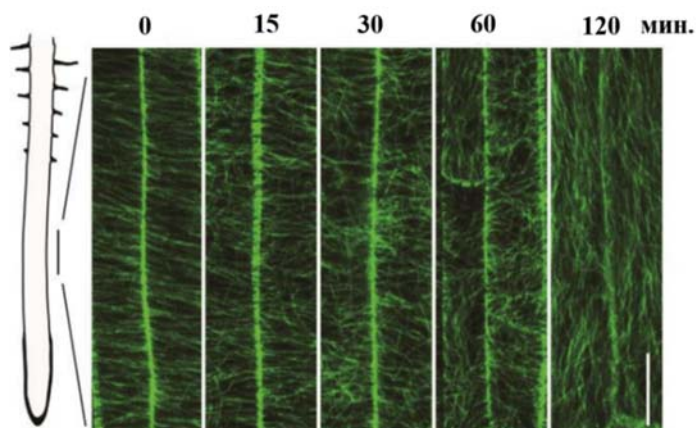
При поплавувањето, водата ги исполнува воздушните простори во почвата и се оневозможува дифузија на кислородот до корените. Зголемената продукција на етилен во листовите се должи на акумулацијата на АСС во корените во анаеробни услови и транспорт на ова соединение во изданоците каде што постојат аеробни услови, бидејќи конверзијата на АСС во етилен се одвива исклучиво во присуство на кислород. Оваа епинастична стратегија има големо значење за растенијата, бидејќи надолу свитканите листови делуваат како „едра“ на ветер. Оваа адаптација помага во брзо испумпување на водата од почвените простори околу корените преку процесот на транспирација.

6.6.3 Индуција на латерална експанзија на клетки

Правецот на експанзија на растителните клетки зависи од ориентацијата на целулозните микрофибрили во клеточниот сид. Трансверзалните микрофибрили го зајакнуваат клеточниот сид во латерален правец и затоа тургоровиот притисок се насочува кон елонгација на клетките. Ориентацијата на микрофибрилите во клеточниот сид зависи од ориентацијата на микротубулите во кортикалната (периферна) цитоплазма која се наоѓа веднаш под клеточната мембрана. Кај издолжените растителни клетки, кортикалните микротубули се распоредени трансверзално, што овозможува трансверзална ориентација на целулозните микрофибрили.

Под дејство на етиленот се нарушува трансверзалниот распоред на микротубулите и нивната ориентација преминува во лонгитудинален правец (Сл. 6.9). Реориентацијата на микротубулите од трансверзален кон лонгитудинален правец не се одвива преку целосна деполимеризација на трансверзалните микротубули и нивна реполимеризација во нови лонгитудинални снопи на микротубули. Се претпоставува дека настанува зголемување на бројот на новоформирани микротубули кои немаат трансверзална ориентација. Соседните микротубули ја прифаќаат новата ориентација и во одредена фаза од растот се забележува различен распоред на микротубулите во клетката, пред да настане униформна ориентација на сите микротубули во лонгитудинален правец.

Оваа промена во ориентацијата на микротубулите за 90° под дејство на етиленот предизвикува промена и во акумулацијата на целулозните микрофибрили. На таков начин, клеточниот сид од трансверзален правец се зајакнува во лонгитудинален правец и наместо појава на клеточна елонгација се стимулира латерална експанзија на клетките.



Слика 6.9 Третманот со етилен предизвикува реориентација на микротубулите од трансверзален во лонгитудинален правец кај епидермални клетки на корен од *Arabidopsis*.

6.6.4 Прекинување на дорманција на пупки и семиња

Етиленот има способност да ја прекине дорманцијата на семето и да го стимулира ртењето кај житните растенија. Кај некои растителни видови, етиленот го зголемува степенот на ртење и постои позитивна корелација помеѓу продукцијата на етилен и ртењето на семето. Исто така, етиленот може да ја прекине дорманцијата на пупките и затоа се користи за стимулирање на развојот на изданоци кај компир и други растенија кои се размножуваат со кртоли. Така на пр., третманот со етилен кај дормантни резници од перуника, нарцис, лале и гладиола има стимулативен ефект врз растот на изданокот и коренот и го скратува времето на цветање. Ефектот на етилен врз развојот на изданоци од кртолите на компир се должи на зголемениот степен на респирација и мобилизација на акумулираните јаглехидрати.

6.6.5 Формирање на адвентивни корени и коренови влакненца

Етиленот индуцира формирање на адвентивни корени од листови, стебла и цветни дршки на растенијата. Кај *Arabidopsis*, кореновите влакненца најчесто се локализирани на епидермалните клетки на коренот кои се наоѓаат над кортикалните клетки. Корените третирани со етилен формираат дополнителни коренови влакненца на невообичаени локации на коренот кои не потекнуваат од епидермалните клетки. Третманот со инхибитори на етиленот, како и етилен-несензитивни мутанти покажуваат редуцирано формирање на коренови влакненца во присуство на етиленот. Според тоа, етиленот претставува позитивен регулатор на диференцијацијата и развојот на коренови влакненца кај растенијата.

6.6.6 Сенесценција на листови

Сенесценцијата претставува генетски програмиран процес на развојот кој влијае врз сите растителни ткива. Етиленот и цитокинините имаат значајна улога во контрола на сенесценцијата на листовите:

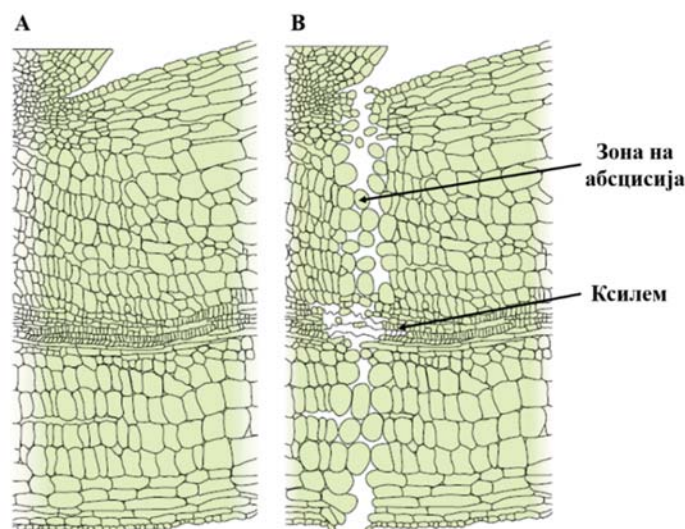
- Егзогената апликација на етилен или АСС како прекурсор на етилен ја забрзува сенесценцијата на листовите, додека пак, третманот со цитокинини ја одложува сенесценцијата на листовите.

- Зголемената продукција на етилен се поврзува со губење на хлорофилот и пожолтување на листовите, како главни карактеристики на сенесценцијата на листовите. Од друга страна пак, содржината на цитокинини е во негативна корелација со сенесценцијата на листовите.
- Примената на инхибиторите на биосинтезата на етилен (AVG или Co^{2+}) ја инхибираат сенесценцијата на листовите.

Според тоа, сенесценцијата се регулира преку одржување на рамнотежата во ендегената содржина на етиленот и цитокинините.

6.6.7 Абсцисија на листови

Отпаѓањето на листовите, цветовите, плодовите и другите растителни органи се нарекува **абсцисија**. Абсцисијата се одвива во специфични слоеви на клетки кои се означуваат како **слоеви на абсцисија (зона на абсцисија)**, кои подлежат на морфолошка и биохемиска диференцијација при развитокот на органите. Ослабувањето на клеточните сидови во слоевите на абсцисија зависи од активноста на ензимите кои ги разградуваат клеточните сидови, како целулаза и полигалактуроназа (Сл. 6.10).

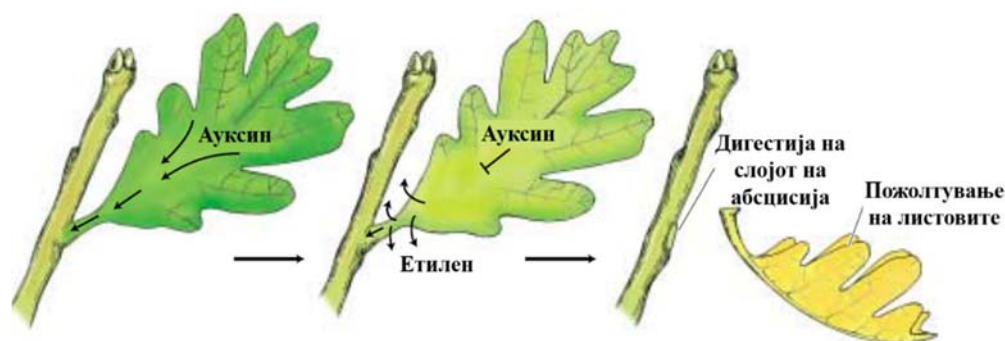


Слика 6.10 За време на формирањето на слојот на абсцисија, неколку клеточни слоја од зоната на абсцисија подлежат на разградување на клеточните сидови под дејство на ензимите целулази (А). Формираните протопласти го зголемуваат својот волумен и добиваат кружна форма, при што настанува раздвојување на ксилемските клетки и одвојување на листот од стеблото (В).

Етиленот е примарен регулатор на процесот на абсцисија на листовите, додека пак, ауксините претставуваат супресори на неговото дејство. Хормоналната контрола на абсцисијата на листовите може да се прикаже во 3 различни фази (Сл. 6.11):

1. **Фаза на одржување на листот.** Пред да се перцепира внатрешен или надворешен сигнал за абсцисија, листовите остануваат во добра здравствена и функционална состојба. Градиентот во содржината на ауксини од лиската до стеблото ја одржува зоната на абсцисија во резистентна состојба кон дејството на етиленот.
2. **Фаза на индукција на абсцисија.** Сенесценцијата го намалува градиентот на ауксините од листот и овозможува преминување на зоната на абсцисија во сензитивна состојба кон етиленот.

3. **Фаза на абсцисија.** Сензитивните клетки од зоната на абсцисија реагираат на ниските концентрации на етилен преку синтеза на целулаза и други ензими за разградување на клеточниот сид, што резултира со абсцисија на листовите.



Слика 6.11 Улога на ауксините и етиленот врз абсцисија на листовите. Во фазата на индукција на абсцисија, содржината на ауксините се намалува, а продукцијата на етиленот се зголемува. Овие промени во фитохормоните ја зголемуваат сензитивноста на целните клетки кон дејството на етиленот.

За време на раната фаза од развитокот на листовите, присуството на ауксини од листовите ја спречува нивната абсцисија преку одржување на клетките во етилен-резистентна состојба. Отстранувањето на лиската како место на биосинтеза на ауксини стимулира отпаѓање на лисната дршка, а егзогената апликација на ауксини на лисната дршка ја одложува абсцисијата. Сепак, апликацијата на ауксини на проксималната страна од зоната на абсцисија (поблиската страна до стеблото) го забрзува процесот на абсцисија. Овие податоци покажуваат дека градиентот во концентрацијата на ауксини има поголемо значење во контрола на сензитивноста на клетките кон дејството на етилен во споредба со апсолутната содржина на ауксини во зоната на абсцисија.

За време на фазата на индукција на абсцисија, содржината на ауксини во листовите се намалува, а се зголемува продукцијата на етилен. Високата концентрација на етилен ја намалува активноста на ауксините преку редукција на нивната биосинтеза и транспорт, како и стимулирање на реакциите на деградација на ауксините. Намалувањето на концентрацијата на слободни ауксини во листовите ја зголемува сензитивноста на специфични целни клетки кон етиленот.

Фазата на индукција се карактеризира со индукција на гени кои кодираат специфични хидролитички ензими за деградација на полисахаридите и протеините од клеточниот сид. Целните клетки кои се локализирани во зоната на абсцисија синтетизираат целулаза и други ензими кои учествуваат во деградацијата на полисахаридите, а потоа ги секретираат во клеточните сидови преку секреторни везикули кои потекнуваат од Golgi-евиот апарат. Дејството на овие ензими предизвикува олабавување на клеточните сидови, клеточно раздвојување и абсцисија.

6.7 Влијание на етилен кај растителни *in vitro* култури

6.7.1 Продукција на етилен во *in vitro* услови

Етиленот се продуцира за време на култивирањето на сите растителни клетки, ткива или органи во *in vitro* услови. Продукцијата на етилен кај растителните *in vitro* култури може да зависи од: растителниот вид, староста на растителниот материјал, стрес

состојби, како и од присуството на фитохормони и други соединенија во хранливиот медиум. Така на пр., монокотиледоните растенијат имаат понизок капацитет за продукција на етилен во *in vitro* услови, во споредба со дикотиледоните растенија. Продукцијата на етилен може да се зголеми и за време на сенесценција на култивираниот растителен материјал. Во тој контекст, максимална концентрација на етилен се акумулира кај клеточни суспензии во стационарната фаза од растот кога настанува ограничување на хранливите компоненти од медиумот и повеќето клетки се наоѓаат во фаза на сенесценција. Степенот на биосинтеза на етилен може да се зголеми кај растителните ткива кои се експонирани на некои стрес фактори, како висока концентрација на NaCl или токсични концентрации на амониумови јони. Егзогената апликација на манитол и полиетилен гликол во хранливиот медиум може да ја стимулира продукцијата на етилен кај растителните *in vitro* култури. Исто така, суплементацијата на хранливиот медиум со АСС или метионин како биосинтетски прекурсори ја стимулира продукцијата на етилен кај растителните култури.

Познато е дека ендегените ауксини кај култури на калуси и клеточни суспензии ја зголемуваат продукцијата на етилен, бидејќи ауксините можат да ја стимулираат транскрипцијата на специфични гени на ензимот АСС синтаза. Важно е да се напомене дека продукцијата на етилен кај културите зависи од ендегената содржина на слободни ауксини во растителните ткива. Конјугираните форми на ауксините немаат ефект врз продукцијата на етилен кај растителните *in vitro* култури. Исто така, егзогената апликација на ауксини (2,4-D, IAA, NAA и IBA) во хранливиот медиум може да ја стимулира продукцијата на етилен кај култури на клеточни суспензии. Присуството на цитокинини во хранливиот медиум нема значаен ефект врз продукцијата на етилен кај растителните *in vitro* култури, освен ако овие фитохормони не се додаваат во комбинација со ауксините. Исто така, хабиитуираните растителни култури (раст на медиум без присуство на фитохормони) се карактеризираат со пониска продукција на етилен во споредба со културите кои зависат од егзогената апликација на фитохормони.

6.7.2 Акумулација на етилен во садови за култивирање

Етиленот се продуцира кај сите типови на растителни култури и се акумулира во гасовитата фаза во затворените садови за култивирање. Концентрацијата на етилен во слободниот воздушен простор може да варира во зависност од типот на растително ткиво, масата на ткивото, волуменот на садот за култивирање, начинот на затворање на садот и условите на култивирање.

Физиолошките ефекти на етиленот во садовите за култивирање зависат од концентрацијата на гасот во воздушниот простор. Според досегашните литературни податоци, концентрацијата на етилен во садовите за култивирање на растителни клетки и ткива може да изнесува од 0,3 до 10 ppm. Задржувањето на етилен во садовите за култивирање зависи од типот на капачиња (затвораачи) кои се користат за затворање на садовите, како и од начинот на затворање на садовите. Така на пр., слабо затворените садови со алуминиумска фолија губат околу 50% од етиленот за 2 часа, а потоа настанува констатино губење на гасот. Етиленот може значајно да се акумулира во садовите за култивирање при фламбурање на грлото на садовите со пламен од шпиртна ламба.

6.7.3 Ефект на етилен кај растителни *in vitro* култури

Изолација на експлантати. Продукцијата на етилен може да се зголеми при повреда на растителните ткива, односно при изолација на експлантатите. Продукцијата

на етилен може да се намали со претходно култивирање на растителниот материјал на медиум во присуство на сребро тиосулфат ($\text{Ag}_2\text{S}_2\text{O}_3$).

Стимулирање или инхибирање на раст. Акумулацијата на етилен во садовите за култивирање може да им стимулативен ефект врз формирањето на калусно ткиво. Голем број литературни податоци потврдуваат дека продукцијата на етилен во садовите за култивирање е во корелација со растот на калусни култури од тутун и домат.

Од друга страна пак, постојат податоци за инхибиторен ефект на етиленот врз формирањето на калусно ткиво и делбата на недиференцирани клетки. Исто така, концентрацијата на етилен повисока од 0,1 ppm го инхибира формирањето на калус кај *Lactuca* поради тоа што гасот спречува детерминација и диференцијација на клетките. Откако клетките ќе се програмираат за делба и раст во недиференцирана состојба, етиленот нема натамошен ефект врз овие клетки.

Морфогенеза. Ефектот на етиленот врз морфогенеза на растенијата се должи на неговото дејство врз инхибицијата на поларниот транспорт на ауксините. Постои критична концентрација на етилен при која се стимулира развитокот на адвентивни изданоци и корени, а над оваа гранична концентрација етиленот покажува инхибиторен ефект. Така на пр., етиленот кој се акумулира во садот за култивирање стимулира формирање на изданоци кај *Pinus radiata*, а прекумерната акумулација на етилен предизвикува дедиференцијација на изданоците. Исто така, етиленот може да има стимулативен или инхибиторен ефект врз вкоренувањето на изданоците во *in vitro* услови. Така на пр., егзогената апликација на ауксини во хранливиот медиум ја стимулира ендегената продукција на етилен, кој може да има инхибиторен ефект врз формирањето на адвентивни корени кај лисни дискови од домат. Од друга страна пак, етиленот ја стимулира иницијацијата на корени од хипокотили кај *Helianthus*.

Ембриогенеза. Големината на садовите за култивирање има големо значење за оптимална ембриогенеза од култури на антери кај тутунот, што покажува дека испарливите соединенија при критична концентрација имаат стимулативен ефект. Така на пр., ниската концентрација на етилен кај ембриогените култури од портокал имаат стимулативен ефект врз формирањето на ембриони, а прекумерната акумулација на етилен во садовите за култивирање го спречува процесот на ембриогенеза. Некои истражувања покажуваат дека етиленот кој нормално се продуцира од растителните ткива во раните стадиуми од иницијацијата на ембрионите има инхибиторен ефект врз ембриогенезата. Овие истражувања биле потврдени со примена на инхибитори на биосинтезата на етилен (AVG и салицилна киселина) кои ја спречуваат ембриогенезата кај луцерка (*Medicago sativa*) преку блокирање на биосинтетските патишта на етиленот.

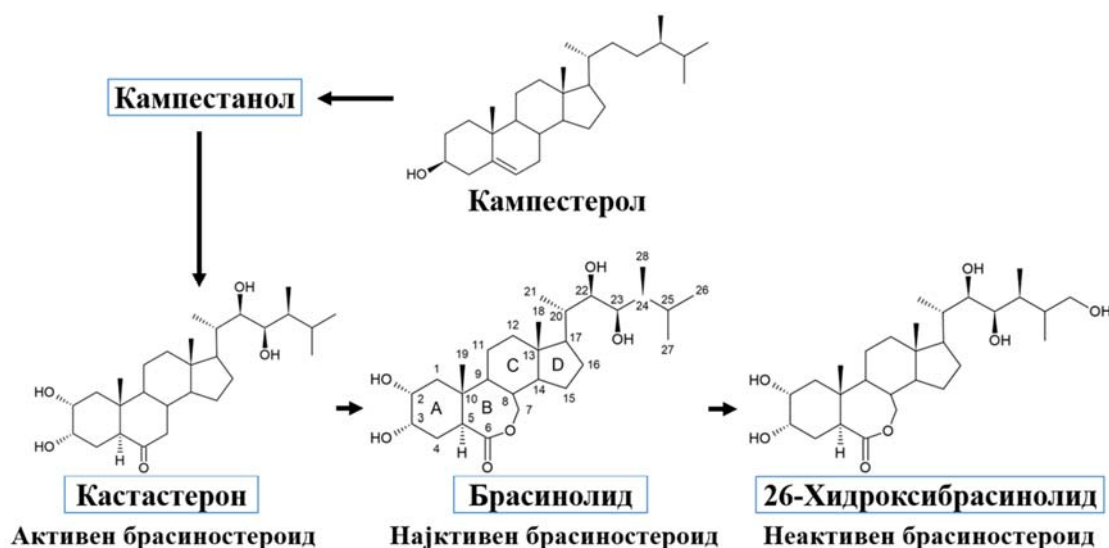
Акумулација на секундарни метаболити. Етиленот може да влијае врз акумулацијата на секундарни метаболити кај растителните *in vitro* култури. Така на пр., присуството на етилен во култури на клеточни суспензии од *Taxus cuspidata* ја стимулира продукцијата на таксол. На сличен начин, примената на етрел и други инхибитори на биосинтезата на етилен ја намалува продукцијата на паклитаксел кај клеточни суспензии од *Taxus chinensis*. Исто така, етиленот ја стимулира продукцијата на индолни алкалоиди кај култури на клеточни суспензии од *Catharanthus roseus*. Важно е да се напомене дека ефектот на етилен врз продукцијата на секундарни метаболити кај растителните *in vitro* култури може дополнително да се интензивира во присуство на цитокинините.

7. БРАСИНОСТЕРОИДИ

Откривањето на брасиностероидите започнува во средината на минатиот век со истражувањата кои потврдиле дека екстрактите од полен имаат способност да го стимулираат растот кај други растителни ткива. Истражувањата покажале дека екстрактите од полен на маслодајна репа (*Brassica napus*) содржат „брасини“ кои стимулираат брза елонгација на интернодиите кај растенијата од грав (*Phaseolus vulgaris*). Овој процес на елонгација бил независен од дејството на гибберелините врз елонгација на стеблото. Натамошните истражувања овозможиле изолација и идентификација на **брасинолид** како прв стероиден фитохормон или регулатор на растот кај растенијата. Подоцна, од растителни ткива на костен (*Castanea* sp.) бил изолиран уште еден стероиден фитохормон кој бил именуван како кастастерон. Сите стероидни фитохормони кои биле изолирани од растенија биле наречени **брасиностероиди (BR)**. Според хемиската структура, брасиностероидите претставуваат C-27, C-28 или C-29 стероидни соединенија со различни функционални групи на прстените A и B, како и на страничниот синџир. Брасиностероидите се присутни кај алгите, папратите, голесемените и скриеносемените растенија. Брасинолидот е C-28 стероид кој покажува највисока биолошка активност од сите брасиностероиди (Сл. 7.1).

7.1 Биосинтеза и транспорт на брасиностероиди

Брасиностероидите се синтетизираат од фитостеролот **кампестерол** преку формирање на голем број интермедиерни соединенија. **Кастастеронот** е непосреден прекурсор во биосинтезата на **брасинолидот** како најактивен брасиностероид (Сл. 7.1). Хомеостазата во содржината на биоактивни брасиностероиди се регулира преку реакции на катаболизам (хидроксилација, оксидација, епимеризација) и конјугација со липиди или глукоза. Содржината на биоактивни брасиностероиди во растителните ткива се регулира преку негативна повратна врска. Според овој механизам, прекумерната концентрација на брасиностероидите индуцира намалување на нивната биосинтеза преку намалена експресија на гените кои се вклучени во нивна биосинтеза или зголемена експресија на гените кои учествуваат во катаболизам на овие стероидни фитохормони.



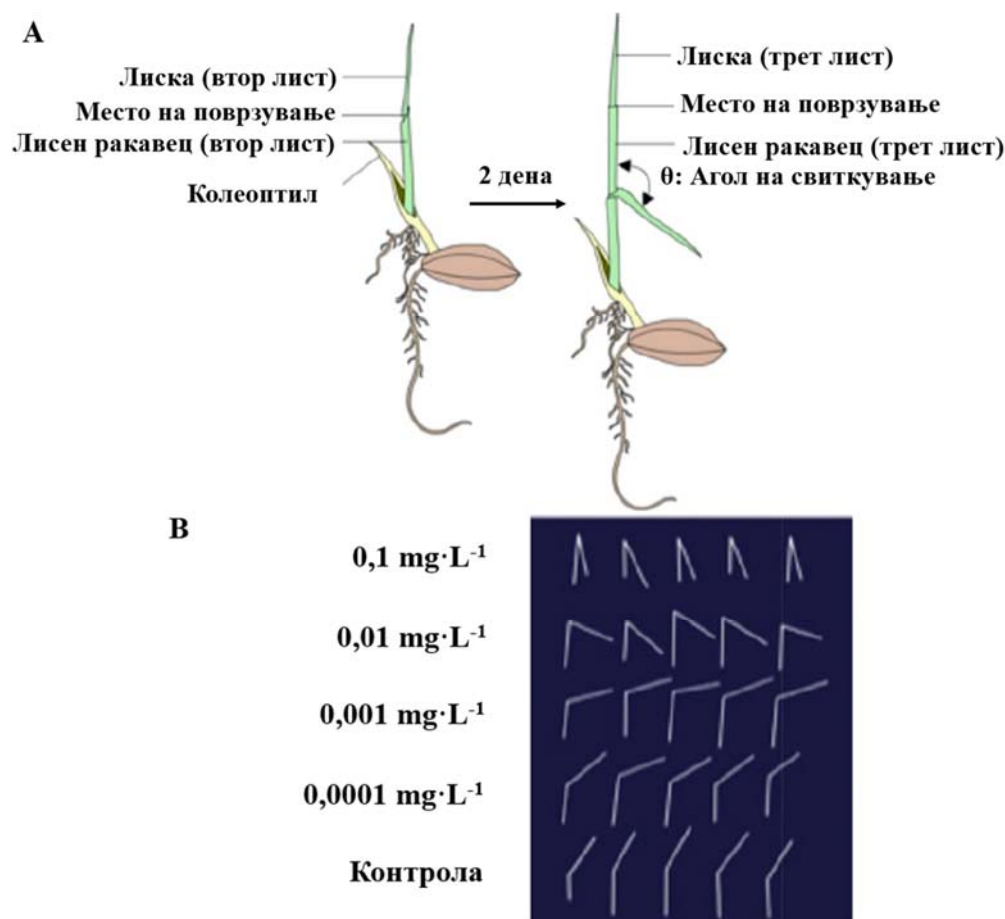
Слика 7.1 Биосинтеза на брасиностероиди.

За разлика од останатите фитохормони, брасиностероидите не се транспортираат на долги растојанија и затоа дејствуваат на местото на нивната биосинтеза. На клеточно ниво, брасиностероидите подлежат на интраклеточен транспорт од местото на нивната биосинтеза во ендоплазматскиот ретикулум до клеточната мембрана, каде што се врши нивна перцепција. Транспортот на брасиностероидите се одвива преку формирање на конјугати со други соединенија или врзување со транспортни протеини.

7.2 Физиолошко дејство на брасиностероиди

7.2.1 Свиткување на листови кај треви

Брасинолидот и другите брасиностероиди индуцираат зголемување на горните (адаксијални) клетки на местото на поврзување меѓу лисниот ракавец и лисната плоча (лиска) кај изртени растенија од ориз. Ова дејство на брасиностероидите предизвикува свиткување на листот кај растенијата зависно од нивната концентрација (Сл. 7.2).



Слика 7.2 Биотест за докажување на дејството на брасиностероидите. Изртено растение од ориз на кое се прикажани лиска и придружен лист. Брасиностероидите кои се испитуваат се аплицираат на поврзувањето на придружниот лист со ламината и аголот на свиткување на ламината се мери по 2 дена од растот (A). Ефект на концентрацијата на брасиностероиди врз аголот на свиткување на ламината (B).

Овој биотест се карактеризира со висока сензитивност за докажување на дејството на брасиностероидите преку мерење на аголот на свиткување на лиската под дејство на одредена концентрација на брасиностероид и за единица време (Сл. 7.2).

7.2.2 Регулација на фотоморфогенеза

Фотоморфогенезата е процес на развојот на растенијата под дејство на светлината. Морфогенетските процеси кои се индуцираат под дејство на светлината опфаќаат развојот на кратки интернодии, широко развиени котиледони, како и диференцијација на пропластидите во хлоропласти. Брасиностероидите ја спречуваат фотоморфогенезата кај етиолирани изртени семиња, при што се добиваат растенија со издолжен хипокотил и неразвиени котиледони, како и инхибиран развојот на хлоропласти. Дејството на брасиностероидите врз супресија на фотоморфогенезата се базира на интерференција во сигналните патишта кои овозможуваат експресија на гените одговорни за индукција на морфогенетските процеси преку фоторецепторите.

7.2.3 Други физиолошки ефекти

Егозгената апликација на брасиностероиди кај растенијата индуцира различни физиолошки ефекти и промени во развојот, како елонгација на стебло, раст на поленова цевка, активирање на протонски пумпи, реориентација на целулозни микрофибрили во клеточниот сид, диференцијација на ксилемски елементи (ксилогенеза), како и зголемена биосинтеза на етилен. Исто така, брасиностероидите се неопходни за стимулирање на клеточната елонгација која е посредувана од страна на гиберелините.

7.3 Мутанти за брасиностероиди

7.3.1 Брасинолид-сензитивни мутанти со нарушена биосинтеза на брасиностероиди

Де-етиолација е биохемиско-физиолошки процес кој опфаќа диференцијација на пропластидите во хлоропласти како резултат на експонирање на растенијата во услови на светлина. Всушност, етиолираните растенија кои претходно биле експонирани во услови на темно преку процесот на де-етиолација во услови на светлина добиваат зелена боја. Генетската анализа на де-етиолирани растенија кои растеле во услови на темно овозможиле идентификација на *DE-ETIOLATED2 (DET2)* ген кој кодира ензим за биосинтеза на брасиностероиди. Мутантите со нарушена функција на *det2* се карактеризираат со ниска содржина на брасиностероиди која може да биде пониска од 10% од содржината кај див-тип растенијата од *Arabidopsis*. Мутантите *det2* во услови на светлина се карактеризираат со дварфизам (џуцест раст), кратки интернодии, темно зелени листови, како и редуцирана апикална доминација и фертилност (Сл. 7.3). Од друга страна пак, овие мутанти во услови на темно не покажуваат знаци на етиолирање и имаат некои заеднички карактеристики со растенијата кои растат во присуство на светлина. Сепак, фенотипот на *det2* мутантите може да се нормализира преку егозгена апликација на брасинолид. Денес се идентификувани и други џуцести мутанти слични на *det2* кај *Arabidopsis*, домат (*S. lycopersicum*), грашок (*P. sativum*) и ориз (*O. sativa*) кои поседуваат мутации во гените за биосинтеза на брасиностероиди и имаат нарушена биосинтеза на брасинолиди. Овие податоци покажуваат дека брасиностероидите ја инхибираат фотоморфогенезата на темно и развојот на растенијата во услови на светлина.



Слика 7.3 Компарација на див-тип и брасинолид-дефициентни мутанти кај изртени растенија од *Arabidopsis*

7.3.2 Брасиностероид-несензитивни мутанти (*bri*)

Кај *Arabidopsis* се идентификувани и други типови на мутанти кои се карактеризираат со несензитивност кон егзогената апликација на брасинолид. Овие мутанти означени како *bri* поседуваат сличен фенотип како и *det2* мутантите, меѓутоа нивниот развој не може да се нормализира преку егзогена апликација на брасинолид. Мутантите *bri* се карактеризираат со значајно зголемена акумулацијата на брасинолид во споредба со див-тип растенијата поради прекумерната експресија на ензимот CPD кој е вклучен во биосинтеза на брасинолид. Според тоа, брасинолидот ја инхибира сопствената биосинтеза преку повратен механизам и на таков начин се регулира хомеостазата на брасинолид во растителните клетки. Кај *Arabidopsis* се идентификувани и други брасиностероид-несензитивни мутанти, како *bin2* (*brassinosteroid insensitive 2*) кои имаат нарушена експресија на протеинот серин-треонин киназа кој претставува негативен регулатор на сигналните патишта на брасинолидот.

7.4 Влијание на брасиностероиди кај растителни *in vitro* култури

Ефектите на брасиностероидите врз развојот на растителните *in vitro* култури биле предмет на неколку истражувања. Според досегашните научни сознанија, брасинолидот покажува стимулативен ефект врз клеточните делби и регенерацијата на протопласти од мезофилни клетки кај *Arabidopsis*. Исто така, егзогената апликација на брасинолид во хранливиот медиум го зголемува растот кај култури на калуси и клеточни култури од зелена салата (*Lactuca sativa*). Присуството на брасинолид во хранливиот медиум ја стимулира соматската ембриогенеза кај ориз и некои четинари. Важно е да се напомене дека брасинолидот може да се користи како елицитор за стимулирање на биосинтезата на секундарни метаболити кај растителните *in vitro* култури. Така на пр., брасинолидот ја стимулира продукција на паклитаксел кај култури на клеточни суспензии од тиса (*Taxus chinensis*).

8. ПОЛИАМИНИ

Полиамините се органски азотни соединенија кои се присутни кај сите живи организми (прокариоти и еукариоти). Полиамините во физиолошка pH средина поседуваат позитивен полнеж и покажуваат висок афинитет за врзување и стабилизирање на анјонски биолошки молекули, како што се нуклеинските киселини, фосфолипидите во мембранските системи, кисели протеини и фенолни киселини. Поради тоа, полиамините стимулираат голем број реакции кои се вклучени во биосинтеза на DNA, RNA и имаат есенцијална улога во различни процеси на растот и развитокот на клетките.

Откривањето на полиамините датира при крајот од XVII-тиот век со изолација на кристално соединение од човечка сперма од страна на Anton van Leeuwenhoek кое било именувано како „**спермин**“. Истражувањата за структурна карактеризација покажале дека сперминот претставува амин, а подоцна биле изолирани и други полиамини, како **спермидин** и **путресцин**. Кај растенијата, полиамините се вклучени во различни фундаментални клеточни процеси, како делба и елонгација на клетките, организација на хроматинот, репликација и транскрипција на DNA, синтеза на протеини, сигнални патишта и регулација на јонски канали. Исто така, полиамините учествуваат во регулација на голем број процеси на раст и развиток на растенијата, како органогенеза, ембриогенеза, развиток на цветови, зреење на плодови, сенесценција и толерантност кон абиотички и биотички стрес фактори.

8.1 Дистрибуција на полиамини кај растенијата

Полиамините кај растенијата се класифицираат како алифатични и ароматични полиамини врз база на нивната основна хемиска структура. Сепак, кај растенијата најчесто се застапени алифатичниот диамин **путресцин**, триаминот **спермидин** и тетраминот **спермин**. Иако диаминот **кадаверин** е присутен во ниска концентрација кај растенијата, овој полиамин е карактеристичен претставник кај легуминозните растенија. Кај растенијата се идентификувани голем број полиамини кои имаат ограничена дистрибуција кај растенијата (Табела 8.1).

Табела 8.1 Структура на некои доминантни и ретки полиамини кај растенијата.

Типови на полиамини	Структура
Доминантни полиамини	
Путресцин	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Кадаверин	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$
Спермидин	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Спермин	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
Ретки полиамини	
Хомоспермидин	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Норспермидин	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
Хомоспермин	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Норспермин	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
Термоспермин	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Калдопелтамин	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
Калдохексамин	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$

Диамините путресцин и кадаверин имаат слична хемиска структура која се состои од примарна amino група на двата краја од молекулот и краток јаглеродороден синџир. Разликата во нивната структура се должи на различните прекурсори. Во тој контекст, путресцинот се синтетизира од аминокиселината аргинин преку отстранување на карбоксилната кисела група, а кадаверинот се добива од аминокиселината лизин. Спермидинот и сперминот претставуваат виши амини кои се синтетизираат од путресцинот преку адиција на дополнителни синџири од 3 јаглеродни атоми со дополнителни amino групи.

Полиамините се локализирани во речиси сите клеточни компартмани, каде што ја извршуваат својата регулаторна улога во различни физиолошки процеси. Концентрацијата на полиамините во растителните ткива варира од μM до mM концентрации во зависност од растителниот вид и стадиумот на развојот на растенијата. Сепак, биолошките ефекти на полиамините во растителните клетки најчесто се изразуваат во mM концентрации.

Во растителните клетки, полиамините можат да бидат присутни во слободна растворлива форма во цитоплазмата и конјугирана форма како амиди со хидроксициметни киселини (кумарна, ферулна и кафена киселина). Исто така, полиамините се застапени во нерастворлива форма, односно тие се поврзани за фосфолипидите од клеточната мембрана, полисахаридите од клеточниот сид, како и со нуклеинските киселини и протеините. Конјугираните форми на полиамините опфаќаат значаен дел од вкупната содржина на полиамини во растителните клетки. Овие конјугирани форми на полиамините учествуваат во различни клеточни процеси кај растенијата, како што се цветање, развојот на плодови и семе и хиперсензитивни одговори кон вирусни и фунгални инфекции.

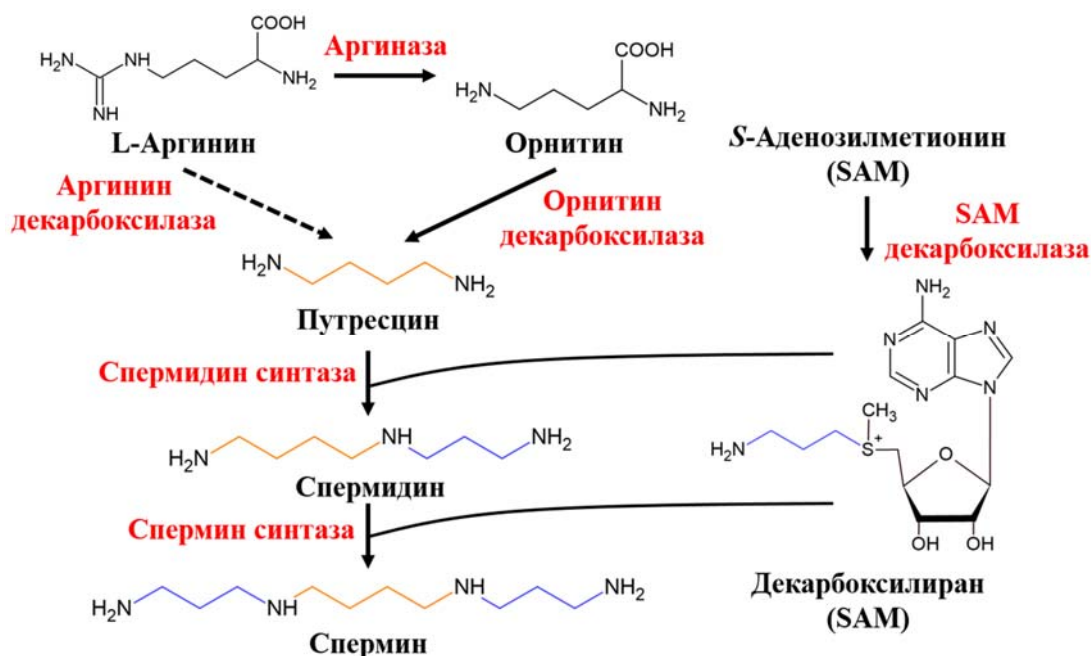
8.2 Хомеостаза на полиамини

Ендогената содржина на полиамини подлежи на строга регулација со цел да се одржи хомеостаза во клетките за време на различни стадиуми од развојот на растенијата. Одржувањето на хомеостазата на полиамините има есенцијално значење бидејќи недостатокот или вишокот на полиамини може да има штетни ефекти кај растителните клетки. Хомеостазата на полиамините во растителните клетки може да се одржува преку процесите на синтеза, деградација, акумулација, конјугација и транспорт.

8.3 Биосинтеза на полиамини

Путресцинот се синтетизира од аминокиселината аргинин преку 2 различни биосинтетски патишта (Сл. 7.4). Првиот метаболички пат опфаќа конверзија на аргининот преку неколку интермедиерни соединенија во путресцин под дејство на ензимот аргинин декарбоксилаза. При алтернативниот биосинтетски пат, аргининот со посредство на ензимот аргиназа се конвертира во орнитин, кој потоа се конвертира до путресцин под дејство на ензимот орнитин декарбоксилаза. Синтезата на спермидин и спермин се одвива од путресцинот и декарбоксилиран *S*-аденозилметионин како прекурсорни молекули. Всушност, декарбоксилираниот молекул на *S*-аденозилметионин се синтетизира од *S*-аденозилметионин под дејство на *S*-аденозилметионин декарбоксилаза и служи како донор на аминокпропил група за синтеза на виши полиамини. Спермидинот и сперминот се синтетизираат од путресцин под дејство на ензимите аминокпропилтрансферази кои се означени како спермидин синтаза и спермин синтаза, соодветно. Ензимот спермидин синтаза го користи путресцинот како основна структура на која се додава аминокпропил група од декарбоксилиран *S*-

аденозилметионин за да се добие спермидин. Формираниот спермидин се конвертира во спермин под дејство на спермин синтаза со користење на друг декарбоксилиран молекул на *S*-аденозилметионин.



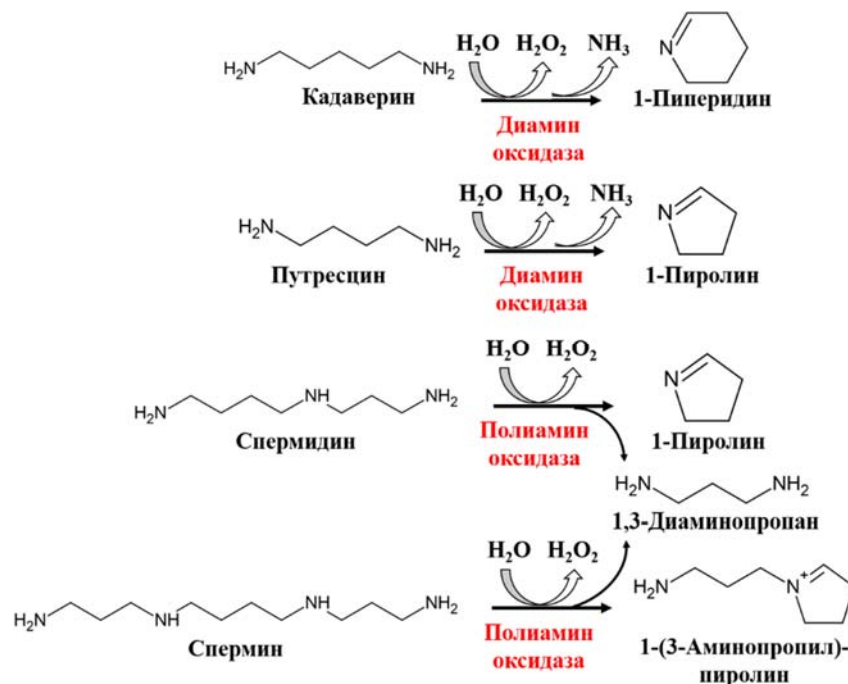
Слика 7.4 Биосинтеза на полиамини.

8.4 Катаболизам на полиамини

Полиамините се катаболизираат преку реакциите на оксидативна деаминација под дејство на ензимите диамин оксидази и полиамин оксидази (Сл. 7.5). Примарни супстрати за активноста на диамин оксидазите се диамините путресцин и кадаверин. Исто така, диамин оксидазите вршат оксидација на спермидин и спермин, меѓутоа поседуваат низок афинитет кон овие полиамини. Под дејство на диамин оксидазите, путресцинот се оксидира до пиролин, а кадаверинот до 1-пиперидин, при што се ослободуваат споредни производи како H_2O_2 и амонијак. Според тоа, полиамините претставуваат прекурсори во биосинтезата на различни алкалоиди кои поседуваат хетероцикличен прстен.

Полиамин оксидазите катализираат оксидација на вишите амини, како што се спермидин и спермин. Овие ензимски реакции овозможуваат формирање на пиролин од спермидин и 1-(3-аминопропил)-пиролин од спермин, при што се ослободува 1,3-диаминопропан и H_2O_2 како споредни производи. Полиамин оксидазите можат да катализираат и реверзибилни реакции, односно конверзија на спермин во спермидин и спермидин во путресцин, при што се ослободува пиролин и H_2O_2 .

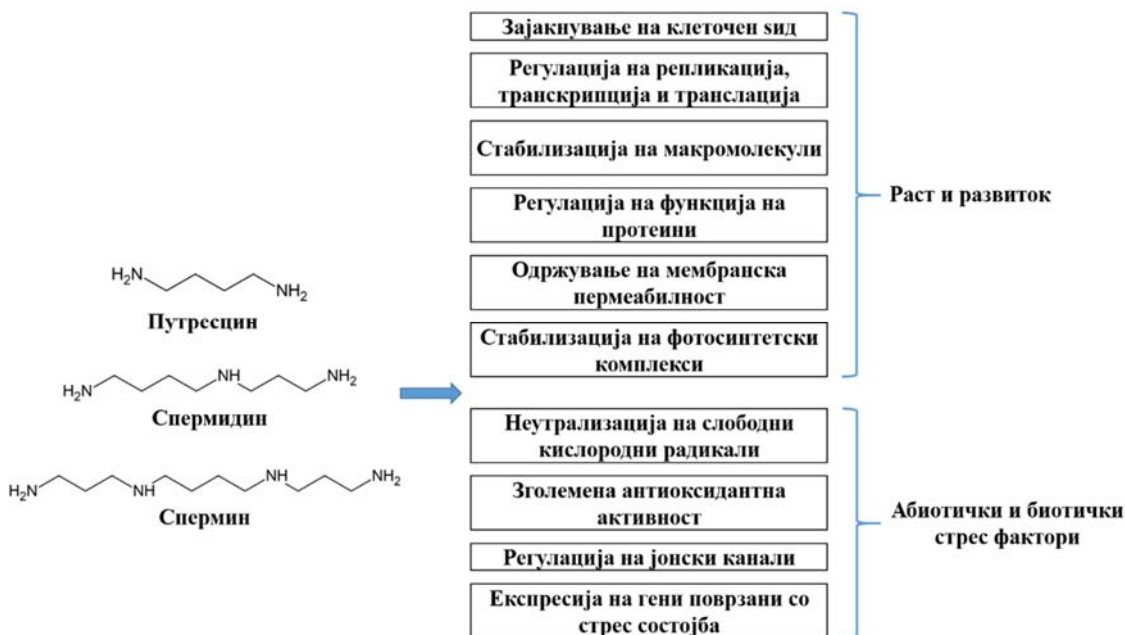
Деградацијата на полиамините може да се одвива во аполастот и пероксизомите на растителните клетки, бидејќи полиамин оксидазите се детектирани во фракција од клеточните сидови и пероксизомите. Ослободените молекули на H_2O_2 во апопластот на растителните клетки можат да учествуваат во лигнификација на клеточните сидови, а формираните H_2O_2 во пероксизомите не се смета како сигнален молекул бидејќи ефикасно се неутрализира под дејство на ензимот каталаза.



Слика 7.5 Катаболзиам на полиамини.

8.5 Физиолошко дејство на полиамини

За време на развитокот на растенијата, полиамините имаат значајна улога во регулација на голем број процеси на развиток, како органогенеза, ембриогенеза, иницијација на цветови, развиток и зреење на плодови и сенесценција (Сл. 7.6).



Слика 7.6 Регулаторна улога на полиамините во растот и развитокот на растенијата и при абиотички и биотички стрес фактори.

Исто така, полиамините учествуваат во аклимација на растенијата кон абиотички и биотички стрес фактори (Сл. 7.6). Акумулацијата на полиамини за време на различни стрес фактори претставува важна адаптивна стратегија за зголемување на резистентноста на растенијата.

8.5.1 Јонски интеракции

Улогата на полиамините во растот на растенијата се базира на нивната способност за регулација на основните клеточни процеси, како што се синтеза на нуклеински киселини и протеини. Полиамините се врзуваат за нуклеинските киселини и ја модулираат конформацијата на DNA и RNA, при што се олеснуваат процесите на репликација, транскрипција и обработка на RNA. Всушност, полиамините го стабилизираат негативниот полнеж на фосфатните групи кај нуклеинските киселини и овозможуваат кондензација на хроматинот. Исто така, полиамините стапуваат во интеракција со протеините преку јонски интеракции или преку ковалентна конјугација на специфични глутамилски остатоци под дејство на ензимот трансглутаминаза. Врзувањето на полиамините ја регулира тродимензионалната конформација на протеините и нивната функција. Полиамините стапуваат во интеракција и со мембранските липиди со негативен полнеж, при што се зајакнува нивното врзување со други мембрански липиди и на таков начин се зголемува стабилноста на мембраните.

Во клеточниот сид, полиамините се врзуваат за полисахаридите, пектинот и фенолните киселини од лигнинот со цел да се зајакне примарниот клеточен сид и да се интензивира лигнификацијата на секундарниот клеточен сид. Сите овие функции на полиамините во клеточната делба, екстензијата на клеточниот сид и развитокот на спроводниот систем имаат значајна улога во целокупниот раст на растенијата. Важно е да се напомене дека полиамините учествуваат во иницијацијата и растот на корените, развиток на поленот и стимулирање на цветањето и развитокот на плодовите.

8.5.2 Интеракција на полиамини со други фитохормони

Полиамините можат да се класифицираат како фитохормони поради нивната улога во процесите на раст и развиток на растенијата. Контрадикторен аргумент на ова тврдење е хипотезата дека полиамините дејствуваат во mM концентрации, додека пак, останатите фитохормони се активни при многу пониски концентрации.

Познато е дека полиамините стапуваат во синергистички или антагонистички интеракции со различни фитохормони во регулацијата на голем број процеси, особено во услови на стрес. Во тој контекст, егзогената апликација на полиамините има слични ефекти врз растителните клетки како и ауксините, односно стимулираат клеточна делба и елонгација. Исто така, полиамините имаат синергистичко дејство со абсцисинската киселина во намалување на оштетувањата на растенијата кои се предизвикани од различни стрес фактори. Всушност, интеракцијата на полиамините со абсцисинската киселина го олеснува затворањето на стомите кај растенијата во услови на воден дефицит. Полиамините можат да стапат во интеракција со сигналните молекули јасмонска киселина и салицилна киселина кои учествуваат во одбранбените одговори на растенијата во услови на биотички стрес фактори. Јасмонската и салицилната киселина ја индуцираат биосинтезата и акумулацијата на конјугирани полиамини во услови на напад од патогени организми, при што се зголемува толерантноста на растенијата кон инфекција. Исто така, јасмонатите ја индуцираат оксидацијата на полиамините, која има големо значење за време на напад од патогени микроорганизми. Притоа, ослободувањето на H_2O_2 при оксидација на полиамините индуцира хиперсензитивен

одговор и клеточна смрт на растителните клетки со цел да се зголеми толерантноста кон патогените организми. Од друга страна пак, полиамините ја инхибираат биосинтезата на етилен преку намалување на активноста на ензимот АСС оксидаза. Полиамините дејствуваат антагонистички на етиленот во контролата на сенесценцијата на листовите и зреењето на плодовите. Затоа, полиамините се сметаат како антисенсцентни соединенија кои ја спречуваат деградацијата на хлорофилот и зреењето на плодовите. Гиберелинската киселина ја зголемува ендегената содржина на полиамини преку индуцирана активност на ензимите аргинин декарбоксилаза и орнитин декарбоксилаза. Притоа, содржината на полиамини кај растенијата е во корелација со ендегената концентрација на гиберелини и елонгација на интерноидите.

8.5.3 Улога на полиамини во интеракции на растенијата со микроорганизми

Метаболизмот на полиамините влијае врз воспоставувањето на мутуалистички интеракции помеѓу растенијата и микроорганизмите, како што се азотофиксирачките бактерии, микоризните фунги и некои бактерии кои го стимулираат растот. Така на пр., акумулацијата на полиамини кај растенијата се поврзува со колонизација на растителните корени со азотофиксирачки бактерии, како и развојот на азотофиксирачки нодули. Исто така, полиамините ја стимулираат колонизацијата на корените со микоризните фунги и на таков начин се овозможува зголемена апсорпција на минерални материи од страна на растителниот организам.

8.5.4 Полиамини како сигнални молекули во одбранбени одговори на растенијата

Полиамините претставуваат сигнални молекули во голем број клеточни процеси поради тоа што стапуваат во интеракција со други сигнални молекули, како азот оксид (NO), Ca^{2+} и H_2O_2 . Исто така, полиамините индуцираат биосинтеза на NO, кој претставува медијатор во одбранбените одговори на растенијата кон различни стрес фактори. Карактеристичен пример за интеракција на овие сигнални молекули може да се забележи во услови на висок салинитет или суша, каде што полиамините ја регулираат цитоплазматската содржина на Ca^{2+} и NO кои комбинирани дејствуваат во затворањето на стомите под дејство на ABA. Исто така, H_2O_2 како спореден производ на оксидацијата на полиамини има значајна улога во затворање на стомите во услови на стрес. Во услови на стрес, полиамините дополнително учествуваат во модификација на клеточниот сид, како и одржување на редокс и јонската хомеостаза во растителните клетки.

Главните функции на полиамините за време на стрес состојбата кај растенијата може да се сумира на следниот начин:

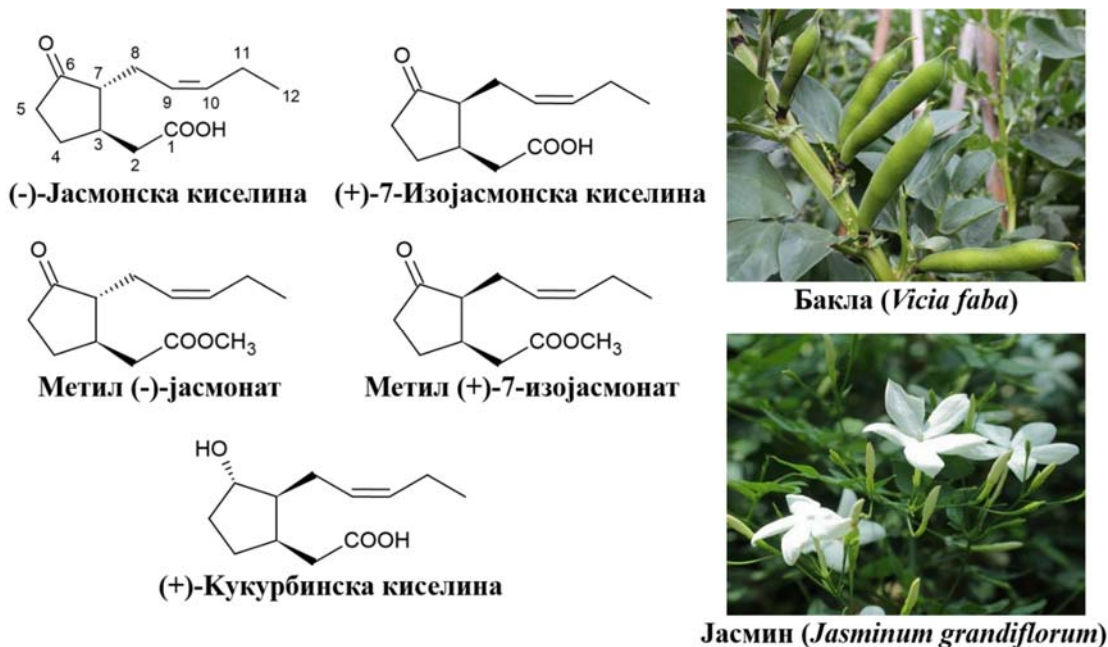
1. Заштита на интегритетот на клеточната мембрана преку стабилизирање на липидите и редуцирање на липидната пероксидација.
2. Зајакнување на клеточните сидови и обновување на механичките повреди за време на напад од патогени организми.
3. Зголемување на фотосинтетската активност преку заштита на тилакоидната мембрана, стабилизирање на фотосистемите и зголемена акумулација на фотопротективни соединенија (зеаксантин и каротеноиди).
4. Регулирање на активноста на јонските канали и одржување на јонска хомеостаза.
5. Одржување на редокс хомеостаза преку неутрализација на реактивни кислородни форми (ROS) и зголемување на антиоксидантната активност
6. Регулација на одбранбените одговори преку индукција на хиперсензитивен одговор и експресија на одбранбени протеини.

8.6 Влијание на полиамини кај растителни *in vitro* култури

Според досегашните научни истражувања, егзогената апликација на полиамини во хранливиот медиум ги стимулира процесите на клеточна делба, формирање на адвентивни изданоци и корени, развиток на цветови и соматска ембриогенеза.

9. ЈАСМОНСКА КИСЕЛИНА

Јасмонската киселина (ЈА) и нејзините деривати познати како **јасмонати** претставуваат сигнални молекули со потекло од липидите кои учествуваат во регулација на растот и репродуктивен развој, фотосинтеза и одбранбените одговори на растенијата кон абиотички и биотички стрес фактори. Јасмонската киселина за прв пат била изолирана од фитопатогената фунга *Lasiodiplodia theobromae* како инхибитор на растот кај растенијата. Кај растенијата, слободната форма на ЈА била за прв пат била детектирана и идентификувана од перикарп на плодови кај бакла (*Vicia faba*). Незрелите плодови од *V. faba* содржи мешавина од (-) **ЈА** и нејзиниот стереоизомер **(+)-7-изо-јасмонска киселина (+7-изо-ЈА)** во однос 65:35% (Сл. 9.1). Исто така, од незрели семиња на тиква (*Cucurbita* sp.) бил изолиран уште еден инхибитор на растот од групата на јасмонати кој бил означен како **кукурбинска киселина** (Сл. 9.1). Метил естрите на ЈА се активни јасмонати кои за прв пат биле детектирани како одоранти од цветовите на јасмин (*Jasminum grandiflorum*). Метил јасмонатот (MeJA) се користи во парфимериската индустрија како ароматично соединение од етеричното масло на јасмин. Истражувањата кај голем број растенија покажале дека (-)-ЈА и метил (-)-јасмонат се доминантни јасмонати во растителните ткива. Сепак, нивните природни стереоизомери **(+)-7-изо-јасмонска киселина** и метил **(+)-7-изојасмонат** покажуваат повисока биолошка активност (Сл. 9.1).

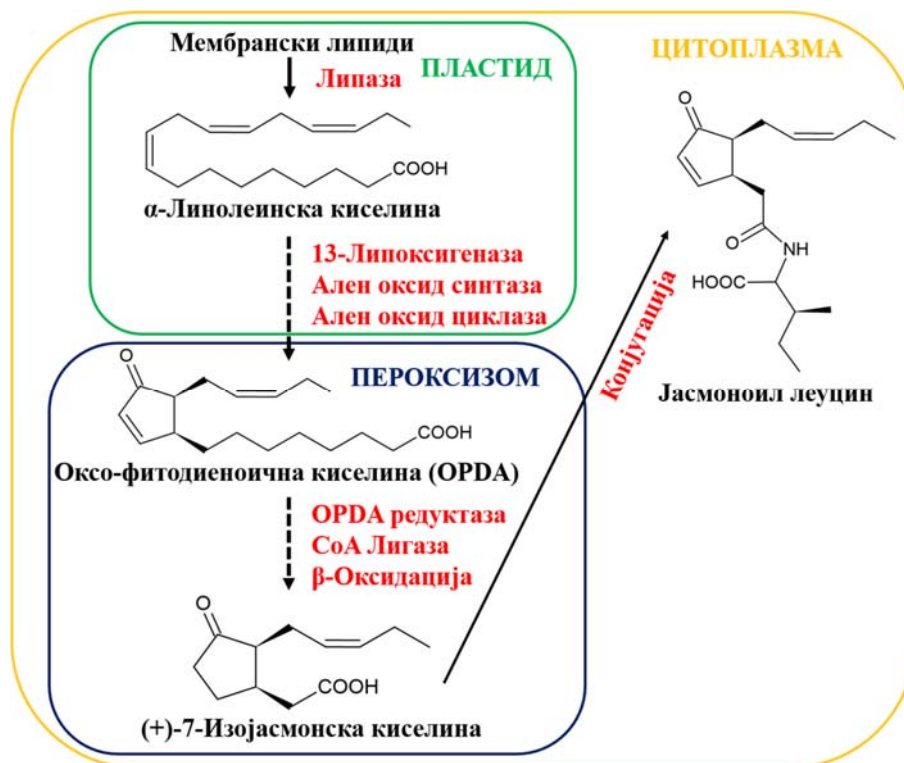


Слика 9.1 Структури на јасмонска киселина и јасмонати.

9.1 Биосинтеза на јасмонска киселина

Биосинтезата на ЈА се одвива во пластидите и пероксизомите на растителните клетки (Сл. 9.2). Почетен супстрат во биосинтезата на ЈА е **α -линолеинска киселина** (C_{18} полинезаситена масна киселина) која се ослободува од пластидијалните мембрански липиди под дејство на ензимот липаза. Во натамошниот биосинтетски пат во пластидите, α -линолеинската киселина се конвертира до **оксо-фитодиеноична**

киселина (OPDA) под дејство на 3 ензими (1,3-липоксигеназа, алел оксид синтаза и алел оксид циклаза). Формираните молекули на OPDA се транспортираат од пластидите во пероксизомите со посредство на ABC транспортери за натамошни метаболички конверзии. Во пероксизомите, OPDA се конвертира до (+)-7-изо-јасмонска киселина преку реакции на редукција и β -оксидација. Во цитоплазмата, (+)-7-изо-ЈА се конјугира со аминокиселината изолеуцин и формира јасмоноил изолеуцин, кој се смета како физиолошки активна форма на ЈА (Сл. 9.2).

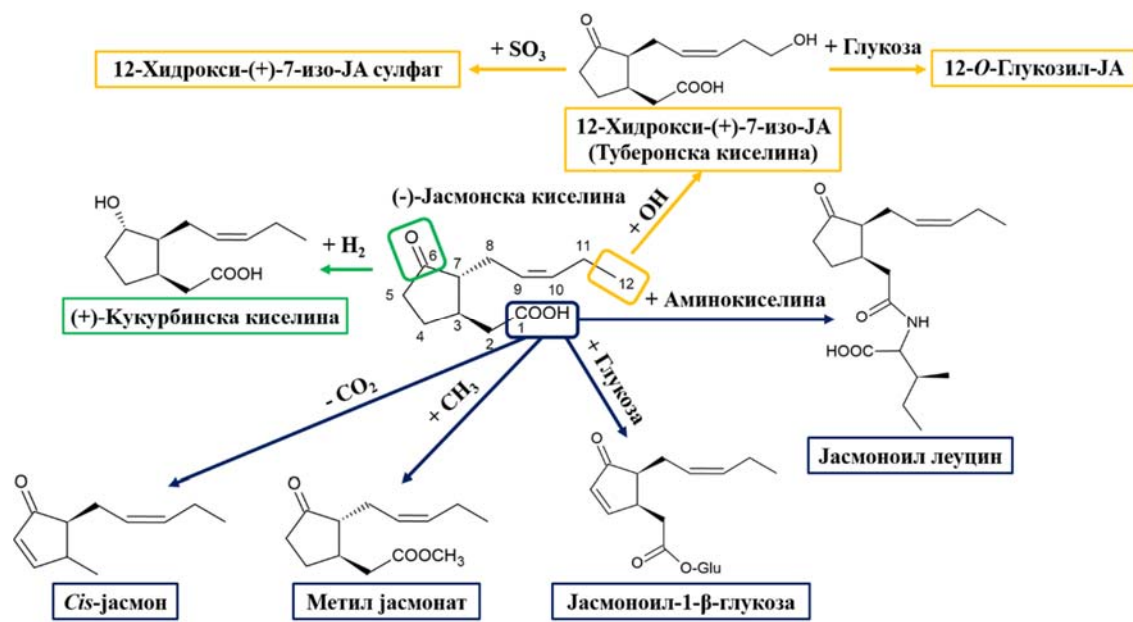


Слика 9.2 Биосинтеза на јасмонска киселина.

9.2 Метаболизам и хомеостаза на јасмонска киселина

Јасмонската киселина подлежи на различни реакции на модификација. Бројните ефекти на ЈА врз развитокот на растенијата се должи на хетерогеноста на нејзините конјугирани форми, како што се јасмоноил леуцин, *cis*-јасмон, метил јасмонат, јасмоноил-1- β -глукоза, туберонска киселина, кукурбинска киселина и други (Сл. 9.3).

Конјугацијата на ЈА со изолеуцин и некои други аминокиселини се одвива под дејство на ензим кој се кодира од страна на *JAR1* (*JASMONATE RESISTANT 1*) генски локус кај *Arabidopsis*. Исто така, ЈА се конвертира до испарлив метил јасмонат под дејство на *S*-аденозилметионин (SAM)-зависна карбоксил метилтрансфераза. Метил јасмонатот се ослободува при повреда на растенијата или други абиотички стрес фактори и претставува сигнал кој служи за комуникација помеѓу растенијата бидејќи се пренесува преку воздухот. *Cis*-јасмонот е друго волатилно соединение кое се синтетизира преку декарбоксилација на ЈА и учествува во одбранбените одговори на растенијата. Карбоксилната група на ЈА може да се модифицира преку конјугација со глукоза, при што се добива јасмоноил-1- β -глукоза.



Слика 9.3 Метаболизам на јасмонска киселина кај растенијата. Јасмонската киселина се метаболизира преку модификација на карбоксилната група (сина боја), оксидација на позиција С-12 (портокалова боја) или редукција на позиција С-6 (зелена боја). 12-Хидрокси-(+)-7-изојасмонската киселина понатаму се метаболизира преку реакции на сулфонација или гликозилација.

12-Хидрокси-(+)-7-изојасмонска киселина е позната како **туберонска киселина** бидејќи индуцира формирање на тубери кај компирот. Ензимите сулфотрансферази катализираат сулфонација на 12-хидрокси-(+)-7-изојасмонска киселина. Сулфонираните и гликозилираните форми на 12-хидрокси-(+)-7-изојасмонска киселина се присутни во различни органи кај растенијата. Според тоа, хидроксилацијата на позиција С-12 и натамошните процеси на сулфонација и гликозилација се доминантни метаболички патишта кои се одвиваат кај растенијата. Редукцијата на С-6 кето групата на циклопентанонскиот прстен на ЈА овозможува формирање на кукурбинска киселина.

Содржината на ЈА во растителните ткива зависи од неколку процеси:

1. достапноста на супстратот,
2. повратната врска која влијае врз експресијата на гени за биосинтеза на ЈА,
3. дистрибуцијата на ензими од биосинтезата на ЈА во специфични клетки и ткива,
4. пост-транслациска регулација на ЈА.

Овие сознанија се потврдени преку следните податоци:

1. Трансгените растенија со прекумерна експресија на гени за биосинтеза ЈА имаат ниска содржина на ЈА, а механичките повреди ја стимулираат активноста на ензимите од бисинтетскиот пат. Овие податоци покажуваат дека е неопходно ослободување на α -линолеинска киселина како супстрат за ЈА.
2. Индуцијата на гените за биосинтеза на ЈА при егзогена апликација на ЈА укажуваат на постоење на позитивна повратна врска.
3. Експериментално е потврдена диференцијална дистрибуција на ензимите од биосинтезата на ЈА во различни растителни ткива.
4. Брзата акумулација на ЈА за време од неколку секунди по механички повреди е потврда за пост-транслациска регулација на биосинтезата на ЈА.

9.3 Физиолошко дејство на јасмонати

9.3.1 Инхибирање на раст

Инхибицијата на растот е првиот физиолошки одговор кој е забележан кај изртени растенија од ориз и пченица третирани со ЈА. Подоцна било откриено дека ЈА го инхибира ртењето на семето и растот на коренот кај растенијата. Инхибицијата на растот на коренот под дејство на ЈА било потврдено преку фенотипот на мутантите кои се карактеризираат со краток корен и зголемена содржина на ЈА. Растот на коренот зависи од интеграцијата на голем број процеси, како клеточна делба, мембрански транспорт, промени во клеточниот сид и тургорот на клетките. Регулацијата на овие процеси може да се одвива преку директен ефект на ЈА или индиректен ефект на ЈА преку ауксините. Инхибиторниот ефект на ЈА врз растот на корените се должи на редистрибуција на ауксините во клетките и PIN2 протеините во клеточните мембрани, како и супресирана експресија на гените кои се одговорни за активноста на меристемските клетки во коренот. Според тоа, инхибицијата на растот на коренот е резултат на интерференцијата на ЈА во ефектите на ауксини во растот и развитокот на корените.

9.3.2 Формирање на трихоми

Гландуларните трихоми се мултицелуларни структури кои најчесто се одговорни за резистентноста на растенијата кон хербиворните инсекти поради способноста за акумулација на алкалоиди, флавоноиди, терпеноиди и одбранбени протеини. Истражувањата покажале дека ЈА учествува во формирањето на трихоми, како и синтезата на монотерпени во овие структури. Исто така, ЈА го стимулира формирањето на трихоми кои се изградени од целулозни влакна на површината на семето од памук.

9.3.3 Развитие на цветови

Мутантите од *Arabidopsis* со зголемена биосинтеза на ЈА (*cev1*) или перцепција на ЈА (*coil*) се карактеризираат со машка стерилност и појава на фенотип кој опфаќа недоволна елонгација на филаментите на прашниците, невијабилаен полен, како и неотворање на антерите и расејување на поленот. Според тоа, ЈА има клучна улога во координацијата на времето на раст и развитокот на цветните органи. Сепак, фертилноста кај овие мутанти може да се поврати преку екзогена апликација на ЈА за време на развитокот на цветовите. Исто така, ЈА учествува во развитокот на цветови и детерминација на полот кај монокотиледоните растенија (пченка) преку индуцирање на промени во активноста на ензимот 13-липоксигеназа.

9.3.4 Стимулирање на продукција на секундарни метаболити

Третманот на култури на растителни клетки со фунгални елицитори ја зголемува содржина на ЈА, која индуцира продукција на алкалоиди кај некои растителни видови. Исто така, ЈА индуцира брза индукција на транскрипциски фактори кои се одговорни за експресија на гени за продукција на секундарни метаболити, како никотин и морфин.

9.3.5 Сенесценција на листови

Сенесценцијата на листовите е комплексен процес во развитокот на растенијата кој зависи од присуството на светлина и хранливи материи, абиотички и биотички стрес

фактори, како и некои фитохормони како што е ЈА. Јасмонатите претставуваат сигнални молекули кои индуцираат сенесценција на листовите кај растенијата. Сенесцентни листови од јачмен третирани со ЈА покажале акумулација ЈА-специфични протеини означени како ЈП (JA-inducible proteins). Акумулацијата на овие протеини била поврзана со зголемена деградација на неколку конститутивни протеини, како што е ензимот Rubisco. Првиот идентификуван ЈП кај сенесцентни лисни сегменти од јачмен третирани со ЈА е означен како **тионин**. Иако функцијата на ЈП во растителните клетки сè уште не е позната, нивната прекумерна експресија индуцира деградација на протеините во листовите. Во групата на ЈП кои индуцираат сенесценција на листовите се вбројува и ензимот **хлорофилаза** кој катализира деградација на хлорофилот. Стимулативниот ефект на ЈА врз сенесценцијата на листовите се базира на намалена експресија на генот за кодирање на протеинот Rubisco-активаза кој учествува во активирање на ензимот Rubisco.

9.3.6 Одбранбен одговор кон хербивори

Јасмонската киселина стимулира биосинтеза на одбранбени протеини кај растенијата кои дејствуваат во дигестивниот систем на инсектите. Во тој контекст, ЈА индуцира синтеза на **инхибитори на α -амилаза** кај легуминозните растенија и **лектини** (протеини кои врзуваат јаглехидрати) кои се врзуваат за епителните клетки во дигестивниот систем на хербиворите и на таков начин интерферираат во апсорпцијата на хранливите материи. Некои растителни видови продуцираат **цистеински протеази** кои ги оштетуваат мембранските системи во епителниот слој на цревата од инсектите. Исто така, легуминозните растенија синтетизираат **инхибитори на протеинази** кои ја блокираат активноста на протеолитичките ензими кај инсектите, како што се трипсин и химотрипсин. Така на пр., акумулацијата на ЈА во растенијата е проследена со биосинтеза на пептидот системин со 18 аминокиселини, кој има способност да индуцира синтеза на протеиназни инхибитори.

9.3.7 Одбранбен одговор кон патогени организми

Јасмонската киселина има значајна улога во резистентноста на растенијата кон патогените организми. Растенијата имаат способност да акумулираат јасмонати во услови на повреда или при третман со елицитори со потекло од патогени организми (олигосахариди). Егзогената апликација на ЈА стимулира експресија на голем број гени кои се поврзани со одбранбените процеси кај растенијата. Овие промени во генската експресија овозможуваат синтеза на одбранбени протеини и секундарни метаболити (антимикробни и антифунгални соединенија, антиоксиданти, фитоалексини и волатилни соединенија). Важно е да се напомене дека третманот на растенијата со ЈА ја намалува експресијата на гените кои се одговорни за раст и примарниот метаболизам (фотосинтеза) и на таков начин сите енергетски ресурси се користат за одбранбени цели.

10. САЛИЦИЛНА КИСЕЛИНА

Салицилната киселина (SA) претставува фенолно соединение кое учествува во регулација на различни процеси од растот и развитокот на растенијата, како и во одбранбените одговори кон абиотички и биотички стрес фактори. Растенијата од врба (*Salix* sp.) и топола (*Populus* sp.) биле користени пред илјадници години како природни средства за намалување на болките кај човекот. Во XIX-тиот век, салицилната киселина и дериватите познати како **салицилати** (метил салицилат, салигинин и салицин) биле изолирани од кора на врба како ефикасни аналгетски соединенија. Во средината на XIX-тиот век била извршена првата хемиска синтеза на SA во Германија. Сепак, комерцијалната примена на SA како аналгетик била ограничена поради остриот горчлив вкус и иритација на желудникот при орална употреба. Подоцна, компанијата Bayer за прв пат го произвела ацетилниот дериват на SA (**ацетил салицилна киселина**) како трговска марка Аспирин и од тогаш станува најпопуларен аналгетски лек ширум светот (Сл. 10.1). Во последните децении се потврдени ефектите на SA врз растот и развитокот на растенијата, како и стекнување на резистентност кон биотички стрес фактори.



Врба (*Salix* sp.)



Топола (*Populus* sp.)

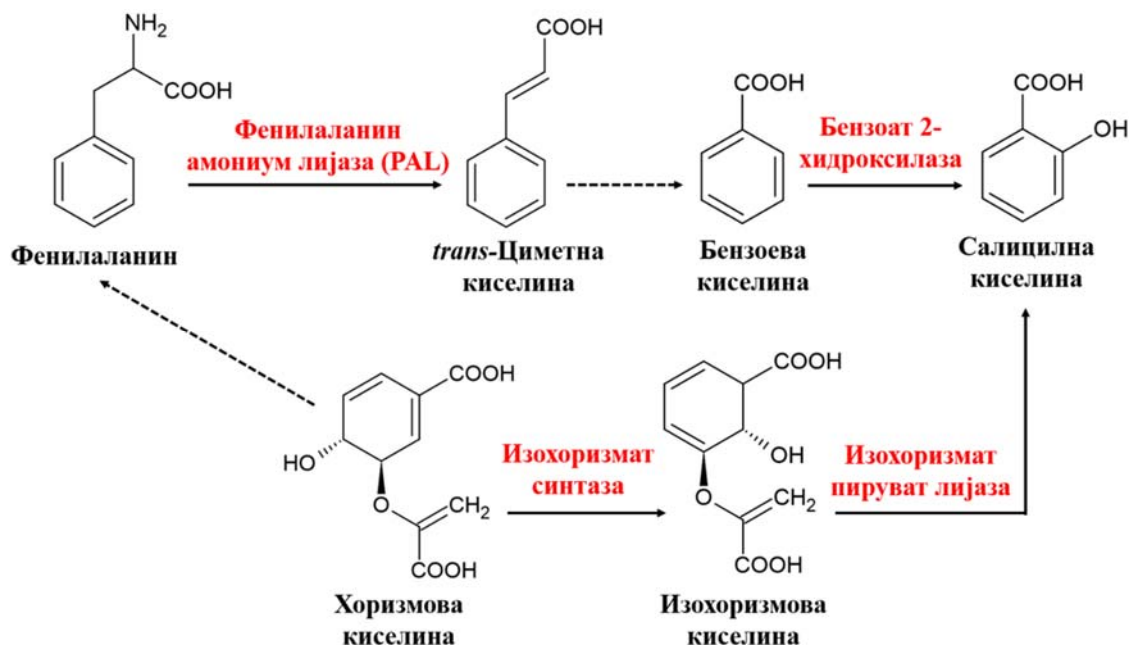
Слика 10.1 Структура на салицилати изолирани од кора на врба и топола.

10.1 Биосинтеза на салицилна киселина

Биосинтезата на салицилна киселина кај растенијата се одвива преку два метаболички патишта:

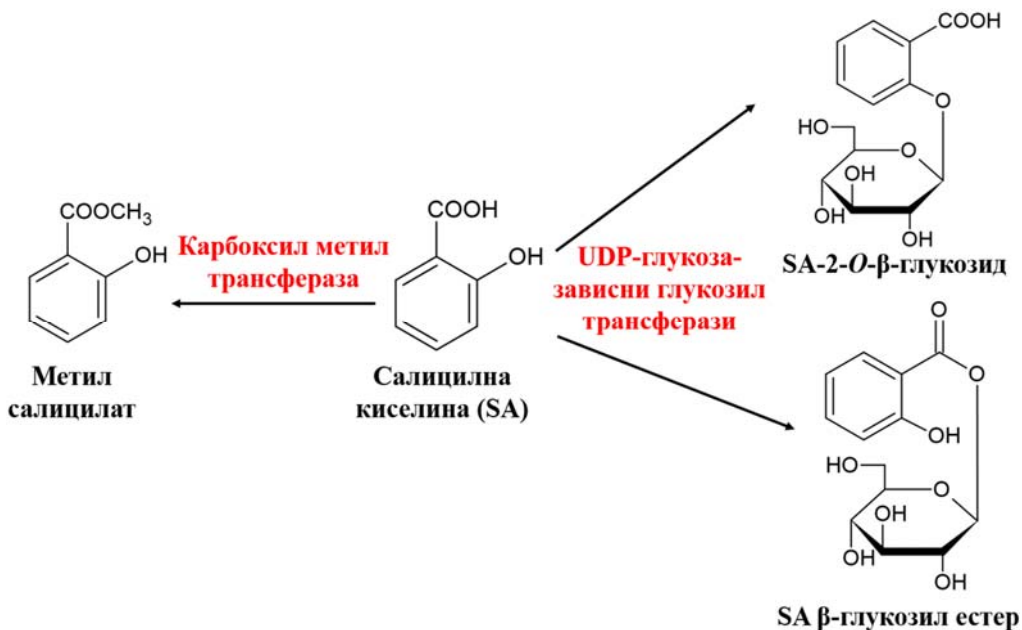
1. **Пат на *trans*-циметна киселина.** Ензимот фенилаланин амониум лијаза (PAL) катализира деаминација на аминокиселината фенилаланин во *trans*-циметна киселина. Потоа, *trans*-циметна киселина се конвертира во бензоева киселина, која подлежи на хидроксилација под дејство на ензимот бензоат 2-хидроксилаза до салицилна киселина (Сл. 10.2).

2. **Пат на хоризмова киселина.** Овој биосинтетски процес се одвива во две реакции. Првата реакција конверзија на хоризмова киселина во изхоризмова киселина под дејство на ензимот изохоризмат синтаза. Во втората реакција, изохоризмова киселина се конвертира во салицилна киселина под дејство на ензимот изохоризмат пируват лијаза (Сл. 10.2).



Слика 10.2 Биосинтеза на салицилна киселина преку *trans*-циметна киселина и хоризмат.

Салицилната киселина може да се конвертира во метил салицилат под дејство на ензимот карбоксил метил трансфераза (Сл. 10.3). Исто така, SA може да се конвертира во глюкозиден дериват означен како SA-2-*O*- β -глюкозид или естер (SA β -глюкозил естер) под дејство на специфични ензими означени како UDP-глюкоза-зависни глюкозил трансферази (Сл. 10.3)



Слика 10.3 Реакции на метилација и глюкозилација на салицилна киселина.

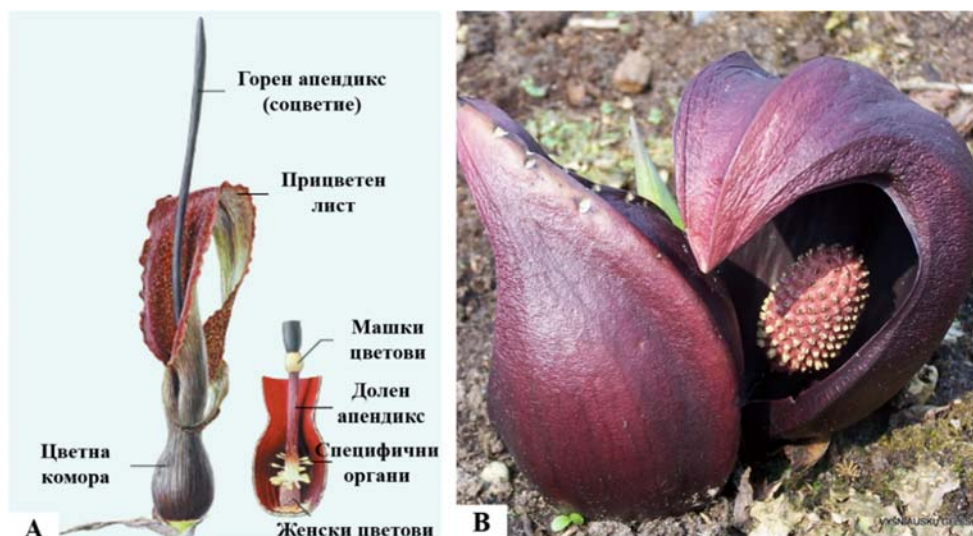
10.2 Физиолошко дејство на салицилна киселина

10.2.1 Инхибиција на сенесценција

Егзогената апликација на аспирин (ацетил салицилна киселина) ја одложува сенесценцијата на венечните ливчиња и спречува абсцисија на цветовите. Овој ефект се должи на конверзијата на ацетил салицилната киселина во SA во присуство на водена средина и на таков начин се намалува биосинтезата на етилен кај цветовите. Од друга страна пак, SA претставува позитивен регулатор на сенесценцијата на листовите. Кај листови од *Arabidopsis*, содржината на SA започнува да се зголемува откако ќе започне намалување на концентрацијата на хлорофил и сенесценцијата на листовите. Исто така, сенесцентните листови се карактеризираат со зголемена експресија на бројни гени кои се вклучени во биосинтезата на SA. Според тоа, SA има значајна улога во започнување на сенесценцијата и натамошната прогресија на овој процес.

10.2.2 Регулација на термогенеза

За време на термогенезата кај растенијата, електрон транспортниот синџир во митохондриите се пренасочува од цитохром-респираторниот пат кон цијанид-резистентен нефосфорилирачки респираторен пат кој е уникатен процес за растителните митохондрии. Енергијата која се ослободува од овој алтернативен респираторен пат не се конзервира како хемиска енергија, туку се ослободува како топлина. Познато е дека некои растителни видови имаат способност да произведуваат големо количество на топлина како резултат на одвивањето на овој алтернативен респираторен пат. Карактеристичен пример за термогенеза кај цветовите е растителниот вид *Sauromatum guttatum*. Всушност, соцветијата кај ова растение се развиваат од главичести луковици и можат да достигнат висина од 80 cm. Во почетокот од развитокот на цветовите настанува отворање на големиот прицветен лист (брактеа) кој го опкружува централниот дел на соцветието означен како спадикс. На таков начин се експонира горниот дел на соцветието кое се нарекува апендикс. Потоа, дел од соцветието започнува да произведува топлина, при што настанува ослободување (волатилизација) на амини и други индолни соединенија кои служат како хемиски атрактанти за опрашување. Во текот на попладневните часови, температурата на горниот апендикс може да се зголеми за 14°C над амбиенталната температура, а во текот на ноќта се намалува и изнесува како и амбиенталната температура. Второто термогено зголемување на температурата се одвива во долниот апендикс во текот на ноќта и трае до следното утро, каде што максималната температура се зголемува за повеќе од 10°C над амбиенталната температура. Истражувањата покажале дека SA делува како сигнал за иницијација на термогениот процес кај *Sauromatum*. Ова термоиндуцирачко соединение иницијално било именувано како калориген, а подоцна било идентификувано како салицилна киселина. Егзогената апликација на SA на спадиксот од растението може да индуцира термогенеза, што е проследено со зголемување на ендогената содржина на SA. Преку овој механизам, соцветието на растението може мимикрира мирис на труло месо и се користи за привлекување на инсектите за положување на нивните јајца (Сл. 10.4). На сличен начин, растителниот вид *Symplocarpus foetidus* го започнува развитокот на цветот додека сè уште е покриено со снег. Сепак, производството на големо количество на енергија предизвикува топење на снежната покривка и се овозможува експонирање на цветовите. Во овој случај, термогената респирација претставува метаболички процес кој овозможува преживување на растенијата во услови на стрес.



Слика 10.4 Соцветие од А: *Sauromatum guttatum* и В: *Symplocarpus foetidus*.

10.2.3 Системска стекната резистентност

Продукција на SA кај растенијата се поврзува со појава на хиперсензитивен одговор. Всушност, хиперсензитивниот одговор претставува механизам на резистентност кон заболувања со цел да се спречи ширењето на бактериски, фунгални или вирусни патогени преку формирање на некротични лезии околу иницијалното место на пенетрација на патогенот (Сл. 10.5).



Слика 10.5 Формирање на некротични лезии на листови од тутун како резултат на инфекција со тутунов мозаичен вирус.

Оваа локализирана клеточна смрт се поврзува со промени во здравите делови на растението, при што се зголемува резистентноста кон секундарна инфекција со различни патогени организми. Резистентноста кон патогени организми која се развива во период од неколку дена до една недела по иницијална инвазија од страна на некој патоген се означува како **системска стекната резистентност** (Systemic Acquired Resistance-SAR). Системска стекнатата резистентност кај растенијата се поврзува со синтеза на најмалку 5 фамилии на одбранбени PR протеини или протеини поврзани со патогенезата. Две од овие фамилии на протеини претставуваат хидролитички β -1,3-глюканази и хитинази, а останатите PR протеини се одговорни за развојот на резистентност кон бројни бактериски, фунгални и вирусни патогени.

Експериментите при третман со SA кај листови од тутун (*N. tabacum* cv. Xanthi n) кои се подложни на инфекција со тутунов мозаичен вирус (TMV) покажале индуцирана синтеза на PR протеини, како и резистентност на инфекција со TMV. Кај TMV-резистентните сорти на тутун (*N. tabacum* cv. Xanthi nc) било констатирано зголемување на ендегената содржина на SA за 40 пати кај инокулираните листови со TMV, а 10 пати кај неинфицираните листови од растението. Ова зголемување на ендегената содржина на SA се одвива паралелно со зголемената експресија на гени за PR протеини кај инокулираните и неинокулираните листови со TMV кај резистентните растенија. Според тоа, ендегената концентрација на SA има клучна улога во процесите на сигнална трансдукција кои индуцираат развиток на хиперсензитивен одговор и SAR.

Според иницијалните истражувања, SA делува како сигнал кој се транспортира од местото на инвазија на патогенот преку фломот до оддалечени неинфицирани листови на растението, каде што индуцира развиток на SAR (Сл. 10.6).



Слика 10.6 При системска стекната резистентност (SAR), инвазијата со патогени индуцира хиперсензитивен одговор и формирање на сигнален молекул. Овој неидентификуван сигнален молекул се транслоцира од инфицираниот лист преку фломот до останатите неинфицирани листови и индуцира експресија на гени кои се одговорни за резистентност на оддалечените растителни делови. Развотоот на SAR зависи од продукцијата на сигналниот молекул SA, кој не претставува мобилен сигнал кој се транслоцира преку фломот.

Подоцнежните истражувањата кај генетски трансформирани растенија со *Ps. putida nahG* ген од *Pseudomonas putida* кој кодира производ за конверзија на SA во катехол покажале дека овие трансгени растенија немаат способност за акумулација на SA. Овие истражувања покажуваат дека локалната инфекција со патогени индуцира продукција на неидентификуван мобилен сигнал кој се транспортира до дисталните растителни органи, каде што се стимулира акумулација на SA која е неопходна за индуцирање на SAR.

Познато е дека SA под дејство на ензимот карбоксил метилтрансфераза се конвертира во метил салицилат, а преку реверзибилна реакција, метил салицилатот се

конвертира во SA со помош на ензимот метил салицилат естераза. При инфекција на листови од трансген тутун со стивнат ген за карбоксил метилтрансфераза настанува блокирање на SAR, а третманот со метил салицилат во долните (базални) листови индуцира SAR кај горните (апикални) неинфицирани листови. Овие податоци покажуваат дека метил салицилатот претставува есенцијален мобилен сигнал за индукција на SAR кај растенијата.