

УДК 581.183:631.811.3

## УСТОЙЧИВОСТЬ ЦИРКАДНОГО РИТМА ДВИЖЕНИЯ ЛИСТЬЕВ ФАСОЛИ ПРИ ИСКЛЮЧЕНИИ КАЛИЯ ИЗ ПИТАТЕЛЬНОГО РАСТВОРА

КРАСТИНА Е. Е., ЛОСЕВА А. С.

(Лаборатория искусственного климата)

Движение листьев растений сопровождается перераспределением ионов К между дорзальной и вентральной сторонами листовой подушечки. Это было установлено у *Albizzia julibrissin* [8, 11], *Samanea saman* [9, 10] и *Phaseolus* [5], причем не только при разных световых воздействиях, но и в константных условиях, когда движение листьев имеет циркадный (околосуточный) ритм, контролируемый биологическими часами. В последнем случае ритмические потоки К в клетках листовой подушечки свидетельствуют о наличии циркадных колебаний в проницаемости клеточных мембран.

В циркадном ритме движения листьев фасоли обнаружен сдвиг фаз при кратковременном (4—5 ч) воздействии на растения высокими концентрациями К или раствором валиномицина, который образует комплекс с ионами К и увеличивает их транспорт через мембраны; направление и величина сдвига фаз зависят от того, в какую фазу ритма подвергаются растения указанным воздействиям [3, 4]. Сходные данные получены в опытах с другим объектом и другим ритмом. У одноклеточной водоросли *Chlorella polyedra* под влиянием валиномицина изменяется внутриклеточная концентрация К и сдвигаются фазы в циркадном ритме биолюминесценции. Но повышение в среде концентрации К не влияет ни на внутриклеточную концентрацию К, ни на положение фаз в ритме биолюминесценции этой водоросли. Отмечено также, что в дневную фазу ритма концентрация К в клетке водоросли выше, чем в ночную фазу ритма [12].

Некоторые исследователи выдвигают предположение, что роль К в циркадной ритмичности весьма значительна и связана с его влиянием на проницаемость мембран [7, 12]. Более того, транспорт ионов К через мембраны включается как один из элементов в гипотетическую мембранную модель биологических часов [6]. Однако мы считаем, что вопрос о роли К в циркадной ритмичности еще далек от своего решения и нуждается в дальнейшей экспериментальной разработке.

В наших предыдущих опытах определялось влияние острого дефицита N, P и Mg (в отдельности) на циркадный ритм движения листьев фасоли [1]. При суточном свето-темновом цикле (СТ-цикле) этот ритм был устойчив у всех опытных растений, но при непрерывном освещении и постоянной температуре (когда ритмы контролируются только биологическими часами) ритм отсутствовал у дефицитных по P растений, быстро затухал у дефицитных по N и был устойчивым при дефиците Mg. У дефицитных по P растений в условиях непрерывного освещения циркадный ритм движения листьев восстанавливался через несколько часов после внесения P в среду, причем положение фаз в восстановленном ритме не отличалось от контроля независимо от того, в какое время суток растения получали P. Следовательно, при остром

дефиците Р продолжаются колебания биологических часов, но, видимо, нарушается связь между последними и процессом движения листьев. Это является дополнительным аргументом в пользу представлений о том, что специфическая информационная РНК осуществляет связь между локализованными в ядре биологическими часами и имеющими циркадный ритм физиологическими и биохимическими процессами [2].

Если ионы К контролируют проницаемость мембран клеточного ядра, то острый дефицит К в растениях может оказать влияние на указанную выше связь и устойчивость циркадных ритмов в константных условиях освещения и температуры. Этот вопрос мы исследовали в опытах, результаты которых рассматриваются в данной статье.

### Методика работы

Опыты проводили с фасолью сорта Латвия 800 в изолированной от естественного света теплице с кондиционируемым воздухом. Температура последнего постоянно поддерживалась на уровне 20°. Источниками освещения были люминесцентные лампы ЛДЦ-30, смонтированные в горизонтальной установке (13 ламп на 0,9 м<sup>2</sup>). Освещенность растений составляла 9—10 тыс. лк, продолжительность ежесуточного освещения 12 или 16 ч. За 2 сут до определения движения листьев часть растений переводили на непрерывное освещение.

До разворачивания супротивных листьев проростки фасоли выдерживали на водопроводной воде в течение 6—7 сут после прорастания семян. Затем отобранные одинаковые растения высаживали по одному в литровые сосуды с питательными растворами разного состава. Контролем была питательная смесь Кюпа, разбавляемая в 1-ю неделю в 5 раз, а в следующие 1—2 недели — в 2 раза. Состав опытных питательных растворов приводится ниже при рассмотрении результатов опытов. Растворы сменяли 1 раз в неделю, а их рН доводили до исходной величины (5,4) ежедневно.

В опыте 1 все растения были интактными; в опытах 2 и 3 половину их декапитировали над супротивными листьями за 2 сут до начала определения движения листьев. В опытах 1 и 2 определение начинали через 18 сут, а в опыте 3 — через 12 сут после высаживания растений на питательные растворы. Показания (угол между черешком и главной жилкой листа) снимали у обоих супротивных листьев каждого растения через интервалы в 1 ч; продолжительность определения движения листьев составляла 36—37 ч. Во время определения часть растений держали на непрерывном освещении, а остальные — на том же СТ-цикле, при котором их выращивали до определения движения листьев. Биологическая повторяемость составляла 10—14 листьев при непрерывном освещении и 6—10 листьев при СТ-цикле. Параметры ритма движения высчитывали для каждого листа, а затем усредняли по вариантам. Кроме того, на каждый астрономический час высчитывали средние величины угла между черешком и главной жилкой листа в пределах варианта; эти данные использовали для построения графиков (рис. 1—3).

После окончания определений движения листьев растения убирали, расчленили по органам и высушивали до воздушно-сухого состояния, затем взвешивали. В опыте 1 в органах контрольных и опытных растений определяли содержание калия на пламенном фотометре, кальция и магния — объемным трилометрическим методом.

### Результаты

В опыте 1 сравнивали ритм движения листьев у растений, выращенных на полной по составу питательной смеси и без К. При исключении К из питательного раствора заменяли все соли калия солями натрия (нитрат, фосфат и хлорид). Следовательно, контрольный и

Накопление воздушно-сухой массы в органах фасоли и содержание катионов при замене в питательной смеси калия натрием

	Контроль				Без К			
	масса, г на 1 рас- тение	К	Ca	Mg	масса, г на 1 растение	К	Ca	Mg
		мэкв на 100 г				мэкв на 100 г		
Листья:								
супротивные	0,40	56	120	41	0,25	2	200	76
тройчатые	0,79	59	66	37	0,53	20	110	54
Стебель	0,45	59	34	24	0,35	10	43	39
орни	0,45	150	44	59	0,36	35	45	209

опытные растения имели одинаковые концентрации всех остальных элементов минерального питания и одинаковое соотношение одно- и двухвалентных катионов. Естественно, у опытных растений во всех органах концентрация К была очень низкой, так как они располагали только запасами К в семенах и возможными примесями этого элемента в солях, используемых для приготовления питательного раствора. К концу опыта содержание К в их супротивных листьях (движение которых мы определяли) было в 28 раз ниже, чем в контроле. Одновременно отмечено значительное повышение содержания Са и Mg во всех надземных органах опытных растений и содержания Mg — в их корнях (табл. 1).

Несмотря на явные признаки дефицита К, опытные растения имели такой же циркадный ритм движения супротивных листьев, как и контрольные, причем не только при суточном СТ-цикле, но и при непрерывном освещении (рис. 1). Более того, растения контрольного и опытного вариантов (табл. 2) по всем параметрам ритма существенно не различались.

Следовательно, острый дефицит К в растениях не влиял ни на само движение листьев, ни на его циркадный ритм, ни на связь последнего с биологическими часами. Но полученные результаты можно рассматривать и как косвенное доказательство сходства функций К и Na в изучаемых явлениях. Чтобы исключить это предположение, нужно было определить, возможно ли сохранение циркадного ритма движения листьев фасоли при отсутствии в среде не только К, но и Na.

В опыте 2 заменяли соли калия солями аммония, так как ионы аммония включаются в органические соединения растений и не могут выполнить функции К в регуляторных процессах. Чтобы дозы азота были одинаковыми в контрольном и опытном растворах, при исключении солей К ( $KNO_3$ ,  $KH_2PO_4$ , KCl) вносили

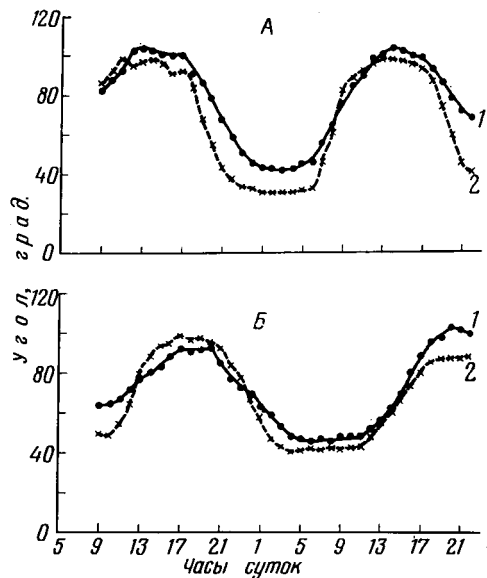


Рис. 1. Влияние дефицита К на ритм движения листьев фасоли при СТ-цикле 16:8 (А) и непрерывном освещении (Б).

1 — контроль; 2 — без К.

Параметры ритма движения листьев фасоли при СТ-цикле 16:8 и при непрерывном освещении у контрольных и дефицитных по К растений

Параметры	СТ-цикл		Непрерывный свет	
	контроль	без К	контроль	без К
Максимум, град.	107±8	102±4	100±3	96±3
Минимум, »	41±5	30±4	42±2	36±2
Амплитуда колебаний, град.	33±3	36±1	29±1	30±1
Продолжительность ночной фазы, ч	11,4±0,3	11,0±0,4	15,4±0,4	15,1±0,4

такое количество солей аммония, которое компенсировало уменьшение содержания нитратного азота (0,75 мэкв на 1 л). Было внесено с  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  по 0,5 мэкв азота и фосфора на 1 л (полная компенсация фосфатов) и еще с  $\text{NH}_4\text{Cl}$  — 0,25 мэкв азота на 1 л. При этом пришлось пренебречь тем, что в опытном растворе было в 2 раза меньше ионов хлора, чем в контрольном (0,25 вместо 0,5 мэкв на 1 л). Все остальные соли вносили в одинаковых количествах в растворы обоих вариантов опыта.

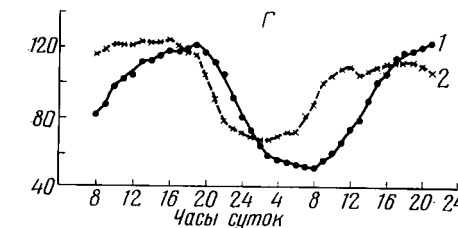
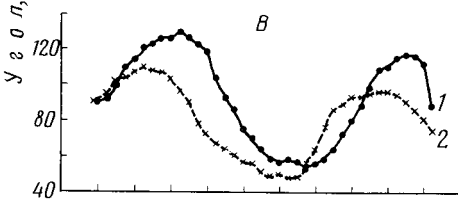
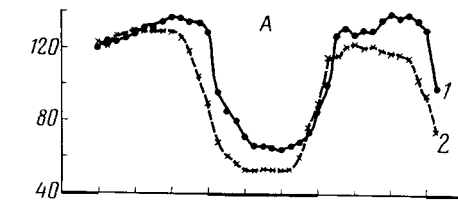


Рис. 2. Влияние дефицита К на ритм движения листьев фасоли при СТ-цикле 12:12 (А и Б) и непрерывном освещении (В и Г).

1 — контроль; 2 — без К; А, В — интактные растения; Б, Г — декапитированные.

Дефицит К вызывал угнетение растений. Во время уборки в опытном варианте у них было меньше, чем у контрольных, число развернувшихся тройчатых листьев (три вместо четырех), короче стебель (17 против 33 см), значительно меньше воздушно-сухая масса (1,4 против 2,4 г на 1 растение).

При отсутствии в среде натрия опытные растения, не получающие калийного питания, имели хорошо выраженный циркадный ритм как при суточном СТ-цикле, так и при непрерывном освещении (рис. 2). Следовательно, и в первом опыте сохранение циркадной ритмичности у дефицитных по К растений не было обусловлено наличием натрия в питательной среде.

Однако в опыте 2 условия минерального питания оказали некоторое влияние на параметры ритма движения листьев фасоли, особенно при непрерывном освещении (табл. 3). При суточном СТ-цикле интактные растения двух вариантов питания различались по величине минимума, а декапитированные — по величине максимума. В константных условиях освещения и температуры опытные растения как интактные, так и декапитированные, имели ритм с более коротким периодом и меньшей амплитудой коле-

Параметры ритма движения листьев фасоли при СТ-цикле 12:12 и при непрерывном освещении у растений в контроле и в варианте без калия

Параметры	СТ-цикл		Непрерывный свет	
	контроль	без К	контроль	без К

## И н т а к т н ы е р а с т е н и я

Максимум, град.	143±6	130±5	126±6	106±2
Минимум, »	63±4	50±3	50±4	46±2
Амплитуда, »	40±2,1	40±1,7	38±2,3	30±1,2
Дневная фаза, ч	11,8±0,2	11,9±0,2	13,4±0,3	11,2±0,3
Ночная » , ч	12,2±0,2	12,1±0,2	14,3±0,5	13,9±0,4
Период, ч	24,0	24,0	27,7±0,5	25,1±0,4

## Д е к а п и т и р о в а н н ы е р а с т е н и я

Максимум, град.	125±3	140±3	122±3	121±4
Минимум, »	45±3	47±3	49±4	63±3
Амплитуда, »	40±1,2	46±1,3	36±1,0	29±2,8
Дневная фаза, ч	11,9±0,1	12,0±0,2	14,4±0,3	13,7±0,2
Ночная » , ч	12,1±0,1	12,0±0,2	13,8±0,2	10,9±0,6
Период, ч	24,0	24,0	28,2±0,3	24,6±0,6

баний, чем соответствующие контрольные. Уменьшение периода вызвало сдвиг фаз ритма, что хорошо прослеживается при рассмотрении рис. 2, В и Г. Математический анализ показал, что различия длины периода и амплитуды колебаний в ритмах опытных и контрольных растений при непрерывном освещении существенны при  $P=0,95$  и выше (табл. 3).

Сравнение результатов, полученных в опытах 1 и 2, показало, что дефицит К в растениях не сопровождался изменением параметров ритма движения листьев в том случае, когда в питательном растворе калий заменяли натрием, но такой же дефицит калия приводил к изменению параметров ритма при внесении в среду ионов аммония. Это позволяет предположить, что не калийное голодание, а питание аммиачным азотом оказывало влияние на параметры ритма фасоли. Для проверки этого предположения мы определили параметры ритма у растений, получающих нитратный и аммиачный азот при одинаковом количестве всех элементов питания, в том числе и К (опыт 3). Аммиачный азот давали в виде хлористого аммония, вместо нитратов К и Са — хлористые соли этих катионов.

Все растения опыта 3 имели хорошо выраженный циркадный ритм движения листьев. При суточном СТ-цикле форма азотного питания не оказывала существенного влияния на параметры ритма фасоли; только у декапитированных растений при разных источниках азота наблюдались небольшие различия в соотношении фаз и величине минимума ритма (рис. 3, А и Б, табл. 4). Однако эти различия не соответствовали тем, которые отмечались у декапитированных растений двух вариантов опыта 2.

Влияние формы азотного питания проявилось при непрерывном освещении растений, когда ритм движения листьев контролируется только биологическими часами и его период соответствует периоду колебаний эндогенного осциллятора. У интактных растений средняя длина периода ритма была равна 27,6 ч при нитратном азоте и 25,1 ч при аммиачном азоте, а у декапитированных растений — 26,4 и 25,3 ч соот-

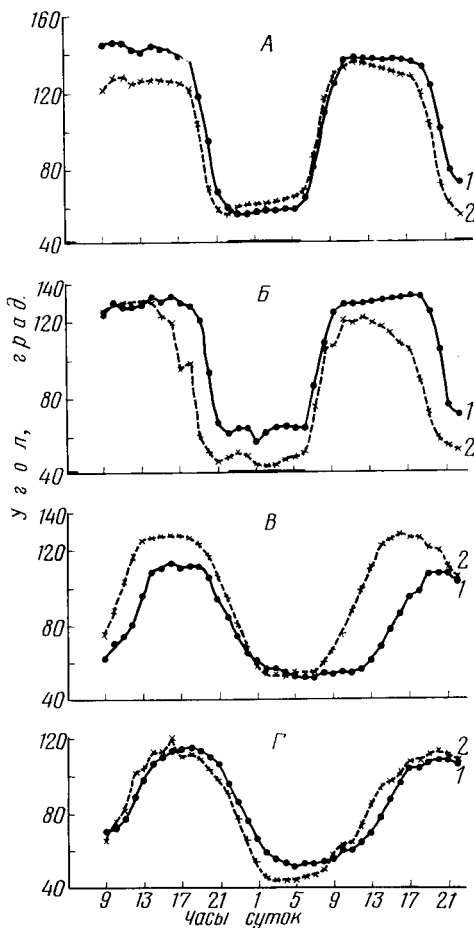


Рис. 3. Влияние формы азотного питания на ритм движения листьев фасоли при СТ-цикле 16:8 (А и Б) непрерывном освещении (В и Г).

1 — нитратный азот; 2 — аммиачный азот; остальные обозначения те же, что на рис. 2.

аммония, внесенных в питательный раствор вместо ионов К, на длину периода циркадного ритма движения листьев фасоли в условиях непрерывного освещения.

Полученные результаты позволяют нам сделать один вполне достоверный, не вызывающий сомнения вывод: у фасоли сохраняется устойчивый циркадный ритм движения листьев при полном исключении К из питательной среды, причем не только в условиях суточного чередования света и темноты, затягивающего этот ритм, но и в константных условиях, когда ритм поддерживается биологическими часами. Этот вывод имеет большое теоретическое значение, так как вызывает вполне оправданное сомнение в правильности гипотез об участии ионов К в механизме биологических часов [6]. Наши данные говорят также о том, что необходимо продолжать изучение роли К в самом механизме движения листьев растений. Если при остром дефиците К листья сохраняют способность к движению, то возникает вопрос, имеет ли значение для этого механизма абсолютная концентрация К в листовых подушечках или важен только градиент концентрации этого элемента между дорзальной и вентральной сторонами листовой подушечки. Видимо, для решения этого вопроса следует изучить влияние калийного голодания на градиенты К в листовых подушечках.

ответственно (табл. 4, рис. 3, В и Г). Природа указанного влияния формы азотного питания на частоту циркадных колебаний неясна, и этот вопрос требует дальнейшего изучения. Однако отмеченный факт позволяет объяснить, почему не изменялась длина периода в ритме растений при непрерывном освещении и замене в среде калия натрием, но уменьшалась — при замене калия аммонием (в опытах 1 и 2 соответственно).

В опыте 3 у растений, питающихся аммиачным азотом, в условиях непрерывного освещения амплитуда колебаний в ритме движения листьев была больше, чем у контрольных. Наоборот, у опытных растений, получающих аммоний вместо калия (опыт 2), при таких же световых условиях она оказалась меньше. Следовательно, в данном случае нельзя сопоставлять результаты опытов 2 и 3. Однако следует учесть, что в этих опытах растения, получающие аммиачный азот, сильно различались по своему физиологическому состоянию; только в опыте 2 они были сильно угнетены из-за калийного голодания. Кроме того, опытные растения в одном случае получали только аммиачный азот (опыт 3), а в другом — обе формы азота (опыт 2, где не исключали из раствора нитрат Са). Поэтому мы должны быть очень осторожны при оценке влияния ионов

Параметры ритма движения листьев фасоли при нитратном и аммиачном питании  
и в разных условиях освещения

Параметры	СТ-цикл		Непрерывный свет	
	нитратный азот	аммиачный азот	нитратный азот	аммиачный азот
Интактные растения				
Максимум, град.	145±5	134±6	116±4	132±3
Минимум, »	53±4	54±12	48±6	50±3
Амплитуда, »	46±1,2	40±4,4	34±1,4	41±0,9
Дневная фаза, ч	12,2±0,3	11,8±0,2	10,0±0,6	12,3±0,4
Ночная фаза, »	11,8±0,3	12,2±0,2	17,6±0,6	12,8±0,4
Период, »	24,0	24,0	27,6±0,4	25,1±0,3
Декапитированные растения				
Максимум, град.	135±5	129±3	114±3	118±6
Минимум, »	57±3	43±4	50±2	40±3
Амплитуда, »	39±1,6	43±2,4	32±0,9	39±2,3
Дневная фаза, ч	12,4±0,2	11,0±0,1	11,6±0,3	12,4±0,4
Ночная фаза, »	11,6±0,2	13,0±0,1	14,8±0,4	12,9±0,5
Период, »	24,0	24,0	26,4±0,4	25,3±0,5

## ЛИТЕРАТУРА

1. Крастина Е. Е., Лосева А. С. Изменения циркадного ритма движения листьев фасоли при остром дефиците азота, фосфора и магния. «Изв. ТСХА», 1972, вып. 2, с. 3—11. — 2. Brown F. A., Hastings J. W., Palmer J. D. The Biological Clock (two views). N.-Y.-L., Academic Press, 1970. — 3. Bünning E., Moser J. "Proc. Nat. Acad. Sci. USA", 1972, vol. 69, p. 2732—2733. — 4. Bünning E., Moser J. "Proc. Nat. Acad. Sci. USA", 1973, vol. 70, N 12, p. 3387—3389. — 5. Kiyosawa K., Tanaka H. "Plant a. Cell Physiol.", 1976, vol. 17, N 2, p. 289—298. — 6. Njus D., Sulzman F. M., Hastings J. W. "Nature", 1974, vol. 248, p. 116—120. — 7. Palmer J. D. An Introd. to Biological Rhythms. N.-Y., San Francisco, L., Academic Press., 1976. — 8. Satter R. L., Galston A. W. "Sci.", 1971, vol. 174, N 4008, p. 518—520. — 9. Satter R. L., Geballe G. T., Applewhite P. B., Galston A. W. "J. Gen. Physiol.", 1974, vol. 64, N 4, p. 413—430. — 10. Satter R. L., Geballe G. T., Galston A. W. "J. Gen. Physiol.", 1974, vol. 64, N 4, p. 431—442. — 11. Satter R. L., Marinoff P., Galston A. W. "Amer. J. Bot.", 1970, vol. 57, N 8, p. 916—926. — 12. Sweeney B. M. "Plant Physiol.", 1974, vol. 53, N 3, p. 337—342.

Статья поступила 12 сентября 1977 г.

## SUMMARY

The plants were grown in water culture under constant temperature (20°) and luminescent light (9—10 thousand luxes): control plants—on the full Knop's solution, experimental plants—on the solution without K. The experimental plants retained their ability to circadian movement of leaves both under daily light-dark cycle and under continuous illumination. Substitution of K<sup>+</sup> by Na<sup>+</sup> in the solution did not effect rhythm parameters, but substitution of K<sup>+</sup> by KH<sub>4</sub><sup>+</sup> reduced the period and the amplitude of rhythm oscillation in plants under conditions of continuous illumination. The reduced rhythm period is supposed to be connected not with K deficiency but with the presence of ammonium ions in the medium. In plants receiving potassium nutrition the length of the rhythm period under conditions of continuous illumination is shorter with ammonia nitrogen than with nitrate nitrogen.