

УДК 581.144:639.11

ГОРМОНАЛЬНЫЙ И БИОЭЛЕКТРИЧЕСКИЙ СИГНАЛЫ ПРИ НАРАСТАЮЩЕЙ КОРНЕВОЙ ГИПОКСИИ РАСТЕНИЙ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ

М.С. СИНЯВИН, Н.Н. ТРЕТЬЯКОВ

(Кафедра физиологии растений)

В условиях лабораторных опытов на водной культуре при нарастающей гипоксии, созданной пропуском азота через питательный раствор, изучалось образование этилена в надземной части и в корнях растений пшеницы в связи с биоэлектрической реакцией на гипоксический стресс. Предложена методика определения начала действия стресса. На примере трех сортов пшеницы сделана попытка описания их биотипического состава с применением электрофизиологического тестирования растений, испытывающих постепенное снижение концентрации кислорода в питательном растворе.

Метаболизм растений, подвергшихся действию такого неблагоприятного фактора, как гипоксия, претерпевает довольно существенные изменения, причем они тем сильнее выражены, чем дольше действует стрессор. Среди прочего происходит преобразование и гормональной системы, на первый план выходят гормоны — ингибиторы. Например, в листьях фасоли после 5-дневного затопления наблюдается значительное повышение содержания акцизовой кислоты АБК [15], у проростков риса накопление этого гормона наблюдается во всех органах. В этой связи следует отметить, что накопление АБК является общей ответной реакцией на действие неблагоприятных факторов.

Несомненно, значительная роль при затоплении принадлежит этилену. Впервые эту мысль высказала Н.С. Туркова [9]. Действительно, накопление этилена в надземной части при затоплении отмечено у многих растений: пшеницы, кукурузы, ячменя, риса, бобов, подсолнечни-

ка, томатов [12]. Позднее из работ, проведенных на томатах, выяснилось, что в затопленных корнях из метионина образуется АЦК (1-аминоциклопропан-1-карбоновая кислота) — непосредственный предшественник этилена. Она накапливается в анаэробных условиях, затем транспортируется по ксилеме и, вероятно, по флоэме в надземную часть и в аэробных условиях превращается в этилен [11]. Таким образом, установлено, что только конечный этап биосинтеза этилена требует присутствия кислорода. Однако каким образом анаэробно стимулирует накопление АЦК в корнях, до сих пор неизвестно.

В образовании придаточных корней при затоплении, помимо системы трофических связей, большая роль принадлежит участию гормонов [14]. У кукурузы в нижнем междоузлии имеются зачатки придаточных корней. У этой культуры в условиях затопления этилен ускоряет процесс корнеобразования [13] и, кроме того, корневое и полное затопление 10-су-

Данная работа выполнена в рамках ФЦП «Интеграция».

точных растений кукурузы способствует накоплению эндогенного этилена, который активирует целлюлазу и ксиланазу в придаточных корнях, а вследствие этого деградация клеточных стенок приводит к формированию азренхимы [1].

Экзогенные обработки фитогормонами способны повлиять на образование этилена: обработка затопленных молодых растений 6-бензил-амин-пурина 6-БАП увеличивает образование этилена у пшеницы на 24%, а у овса — на 35% (при затоплении образование этилена начинается уже через 24 ч — это можно связать с усилением синтеза и транспорта АЦК. На 2-7 сутки происходит уменьшение интенсивности выделения этилена, что, вероятно, связано с накоплением АБК [5].

Все вышесказанное иллюстрирует значимость гормональной системы, однако ее приоритет как центральной системы регуляции последнее время оспаривается; обсуждаются ее взаимосвязи с гидравлическими, электрическими и др. каналами управления. Есть данные о морфогенетическом влиянии электрических потенциалов на развитие растений, к примеру, образование побегов из пазушных почек и переход меристем во флоральное состояние тесно связаны с потенциалом [10]. Изменения разности биоэлектрических потенциалов (РБП) на мембранах клетки, например при контакте с патогеном, может иметь взрывообразный характер: происходит подкисление цитозоля и ядерной области, вызывающая этот процесс «Протонная вспышка» может начинаться без лаг-фазы и продолжаться десятки минут [7]. Трудно спорить со значимостью электрических сигналов в организме растения [3,4], однако пока еще ведутся дискуссии по поводу приоритета различных систем управления в растениях. Есть данные, ука-

зывающие на интегрированный характер взаимодействия гормональной и электрической систем [6]: в растительном организме функционирует сложная пространственно-временная система биоэлектродинамики (БЭП) — градиенты, осцилляции, распространяющиеся потенциалы. Отмечается сопряжение полярного транспорта индолил-3-уксусной кислоты (ИУК), осуществляющегося в осциллирующем режиме с генерацией медленных волн БЭП, перемещающихся одновременно с ИУК. Эти осцилляции рассматривают в качестве определяющей системы, организующей рост и функциональную активность растения. Хотя система распространяющихся потенциалов диффузна, т.е. не имеет центров управления, тем не менее, она индуцирует быстрые сдвиги в содержании и балансе фитогормонов, что является важным звеном в механизмах срочной дистанционной сигнализации при стрессах.

Проведенные нами ранее эксперименты [8] позволяют говорить не только о важности биоэлектрических потенциалов растений, как о системе их регуляции, но и как о достоверном источнике информации для исследователей. Мы выяснили, что, регистрируя возникновение потенциала действия (ПД) при нарастающей напряженности гипоксического стресса, можно довольно точно находить точку начала наступления стресса для каждого индивидуального растения. Задачей данной работы было выяснение временных параметров гормонального и биоэлектрического откликов сигнальной системы растений.

Методика

Используя динамический подход, мы попытались описать хронологию ответных реакций гормональной и электрической сторон интегрированной системы регуляции растений.

Опыты проводили в лаборатории «Фитотрон» кафедры физиологии растений МСХА на водной культуре. В качестве объектов использовали растения яровой пшеницы сорта Энита в фазе начало трубкования. Методика выращивания была следующей: ничем не обработанные семена при $t = 25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ проращивали 2 сут, затем 6 сут проростки находились на плавучих парафиновых матрицах на 0,5 Кнопа. Затем молодые растения высаживали по 4 шт. в стеклянные затемненные банки емкостью 1 л на полную питательную смесь Кнопа с $\text{pH} = 6$, меняли которую 2 раза в неделю. Таким образом, растения развивались до фазы начала трубкования. К моменту начала опыта по одному нетипичному растению из каждого сосуда отбраковывали.

Идея опыта была в непрерывном измерении РБП при постепенно увеличивающейся гипоксической нагрузке на корневую систему растений; считали точку устойчивого изменения потенциала покоя моментом начала стресса. С этого времени планировались срочные измерения этилена, т.к. технической возможности постоянно регистрировать этот параметр не было. Содержание этилена определяли в момент начала стресса, спустя 30 мин и спустя 1 ч по стандартной методике, описанной ниже.

Нарастающая гипоксия создавалась пропусканием через питательный раствор газообразного азота, который постепенно вытеснял кислород. Скорость пропускания азота была такова, что стрессовые условия наступали примерно спустя 65–80 мин после начала вытеснения кислорода из питательной среды. На одном растении в каждом сосуде с включением тока азота начинали регистрировать БЭП. Отведение БЭП осуществляли с помощью стандарт-

ных неполяризующихся хлорсеребряных электродов марки ЭВЛ-1МЗ, заполненных 1М раствором хлорида калия. Измерение электропотенциала проходило на высокоомном милливольтметре — иономере И-130 отечественного производства, а запись результатов измерений производилась самописцем КПС-4. Точками отведения потенциалов служила питательная среда, контактирующая непосредственно с корневой системой и влагище третьего по счету снизу листа.

В предыдущих работах при длительном измерении БЭП мы столкнулись с рядом методических трудностей, среди прочего, они касались проблем с продолжительным контактом электродов с тканями растения: из-за различной осмотической концентрации клеточного сока и водопроводной воды, используемой в качестве «мостика», спустя 20–30 мин после начала измерения возникал систематический дрейф потенциала. Эту проблему удалось решить путем измерения концентрации клеточного сока и подбора равной концентрации раствора KCl , используемого для «мостика». Еще одна методическая проблема была в подсыхании места касания референтного электрода при длительном контакте его с растением, при этом происходило увеличение концентрации раствора переходного мостика и, как следствие этого — систематический дрейф потенциала. Однако и эта проблема была решена с помощью дополнительного, защищенного от высыхания фитиля, который снабжал место контакта электрода с растением раствором KCl из специальной емкости. Таким образом, корректное измерение БЭП могло идти довольно продолжительное время (рис. 1).

Для определения интенсивности выделения этилена использовали метод газожидкостной хроматогра-

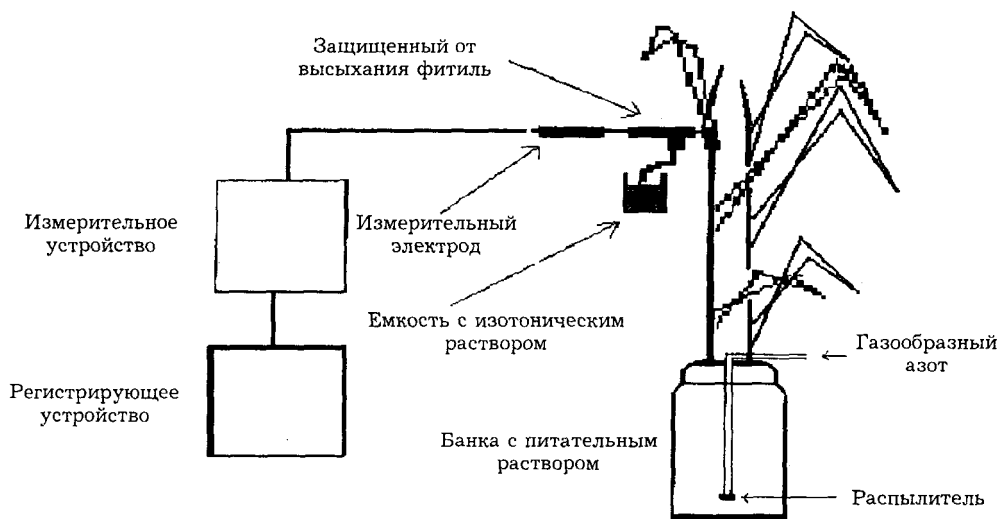


Рис. 1. Установка для измерения биоэлектрических свойств растений пшеницы при нарастающей гипоксии

фии [2]. Растения разделяли на корни и надземную часть, их отдельно взвешивали и помещали в герметичные флаконы. После экспозиции при температуре 25°C в темноте в течение 4 ч медицинским шприцем отбирали пробы газовой среды и вводили их в инжектор газового хроматографа Carlo Erba HRGG 5300 (Италия). Условия хроматографирования: колонка — 1200×3 мм, хромосорб 107 ($80 \sim 100$ мм); газоноситель — азот с давлением на входе колонки 1 атм., детектор пламенно-ионизационный; расход водорода — 40 мл в минуту; температура испарителя и колонки — 60°C , температура детектора — 100°C , время удержания этилена 2 мин. В качестве стандарта использовали раствор 2-ХЭФК, выделяющий 3,88 мкг этилена.

На одном растении в каждой банке постоянно регистрировался БЭП между корнями и влагилищем третьего листа. На определенном этапе эксперимента регистрировали потенциал действия, первую фазу которого мы принимали за начало дейст-

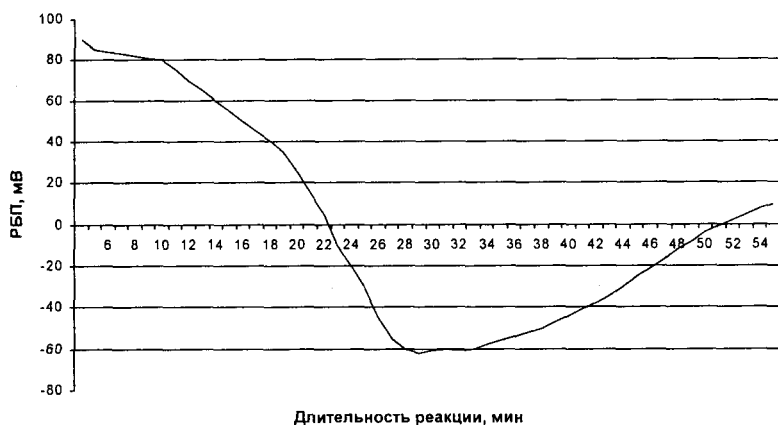
вия стресса. За редким исключением ход изменения РБП был одинаков: примерно после 70 мин пропускания азота разность потенциалов начинала снижаться и спустя 30-40 мин достигала своего минимума. Темпы восстановления потенциала были значительно меньшими (рис. 2). Мы не ставили целью этой работы изучение дальнейшего хода РБП, однако ее значение, измеренное спустя сутки на растениях, перенесших накануне гипоксический стресс (не пошедших на определение концентрации в них этилена), было в среднем на 20-30 мВ меньше, чем в день проведения опыта.

Содержание этилена определяли в момент начала стресса, спустя 30 мин и спустя 1 ч. Повторность определения 10-15-кратная.

Результаты и их обсуждение

В первые два срока этилен обнаружен не был ни в корнях, ни в надземной части растений, его обнаружили только спустя 1 ч после возникновения потенциала действия, причем

Рис. 2 Ответная БЭР растений пшеницы на нарастающую гипоксию (спустя 65 мин после начала пропуска азота)



достоверная разница с контролем была только в надземной части (рис. 3). В опытном варианте уровень образования этилена в надземной части спустя 1 ч после регистрации ПД составил $6,98 \pm 0,50$ мкг на 1 г сырой навески, в контроле этот показатель оказался на уровне $5,64 \pm 0,59$ мкг на 1 г сырой навески.

Таким образом, мы пришли к выводу, что в надземную часть информацию о стрессе корней первой приносит электрическая система. Гормональная, очевидно, срабатывает

тогда, когда стрессор действует систематически. Однако нельзя с полной уверенностью говорить о приоритете электрической системы перед гормональной, в этом опыте демонстрируется лишь ее информационная роль в надземной части. Ведь можно предположить, что распространение изменения электрического потенциала от корней в апикальном направлении — это «дальний транспорт» информации о воздействии стрессора на корни, которая была получена, в свою очередь, при участии «местных отделений» гормональной системы в корнях.

В ходе эксперимента было отмечено варьирование порогов реакции растений на снижение концентрации кислорода внутри одного сорта. Разброс значений концентрации кислорода, при которой начиналась биоэлектрическая реакция (БЭР) носил систематический характер и не зависел ни от качества заземления или экранирования, ни от времени суток, когда проходили измерения, поэтому предположили, что сорт может состоять из различных биотипов растений, обладающих неодинаковой устойчивостью к нарастающей гипоксии и соответственно имеет различные пороги «срабатывания» БЭР.

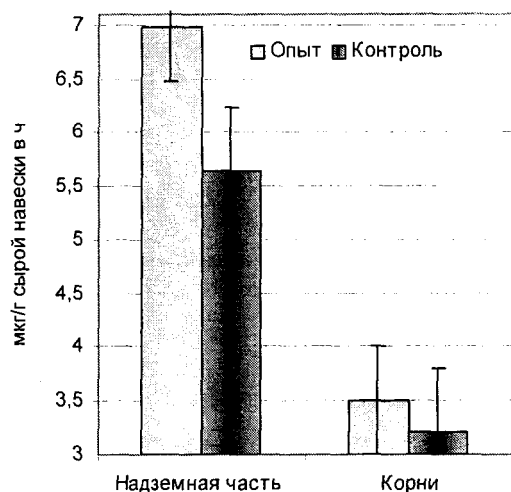


Рис. 3. Интенсивность выделения этилена в разных частях растения

Используя описанный выше методический подход определения момента начала действия стресса, мы попытались проанализировать на чувствительность к нарастающей гипоксии большое количество растений сортов, заведомо отличающихся по устойчивости к изучаемому фактору. Для этого был поставлен еще один лабораторный опыт, в котором участвовали яровые сорта пшеницы Белорусская 80, Кутулукская и озимый сорт Мироновская 808. Целью этой работы было выяснение границ разброса значений концентрации кислорода в питательной среде, при котором происходит устойчивое изменение РБП.

Концентрацию кислорода в питательном растворе измеряли по стандартной методике Винклера. Она основана на способности гидрата закиси марганца окисляться в щелочной среде в соединение высшей валентности, количественно связывая растворенный в воде кислород. Марганец снова переходит в кислой среде в двухвалентное состояние, окисляя при этом эквивалентное связанному кислороду количество йода. Выделившийся йод определяют титрованием гипосульфитом. Чувствитель-

ность метода — 0,05 мг/л O_2 . (Инструкция по химическому анализу воды прудов, 1985). Анализировались растения в фазе начала трубкования.

Весь диапазон значений концентраций кислорода, при которых у растений фиксировали БЭР, был разделен на 16 групп. Каждая группа охватывает интервал в 0,3 мг/л. Это деление условно, но необходимо для упорядочения значений и удобства подсчета частоты встречаемости данных.

На рис. 4-6 представлены сгруппированные значения количества среагировавших растений, выраженные в процентах от всего количества растений, участвовавших в эксперименте, при конкретных значениях концентрации кислорода в питательном растворе. Методика подсчета для всех 3 сортов была одинакова.

Прежде всего, необходимо отметить, что степень разбросанности значений была наибольшей у сорта Мироновская 808. Наибольшую сгруппированность данных показал сорт Кутулукская. У этого сорта пикообразный максимум находился в интервале 6,8-7,0 мг/л кислорода. Это значит, что при нарастающей гипоксии у данного сорта соответ-

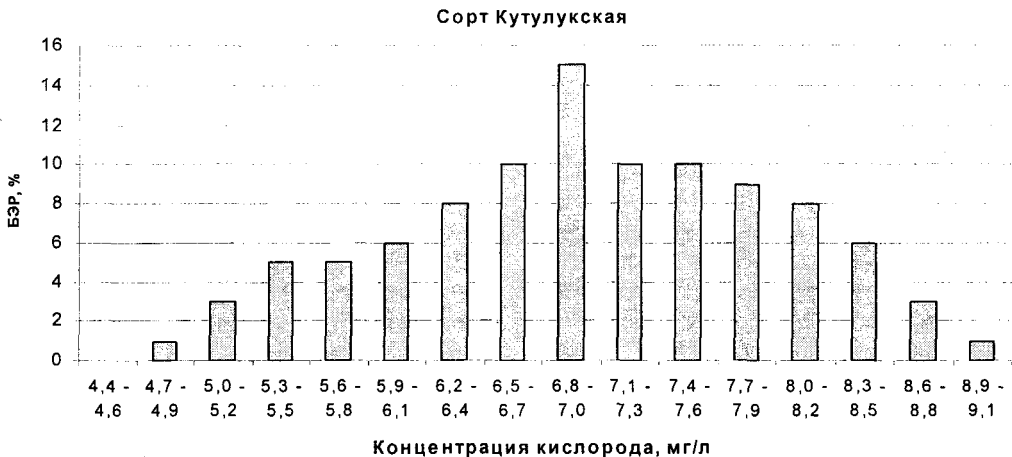


Рис. 4. Распределение БЭР по концентрациям кислорода

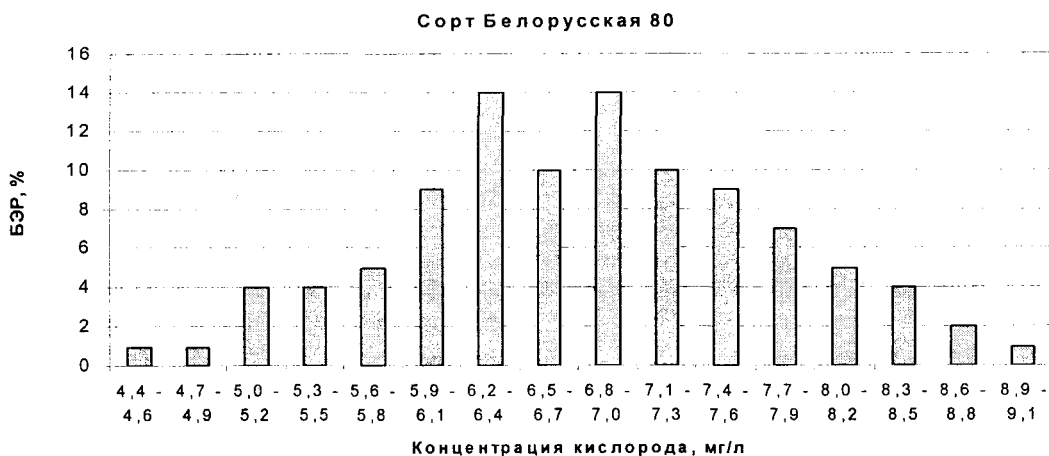


Рис. 5. Распределение БЭР по концентрациям кислорода

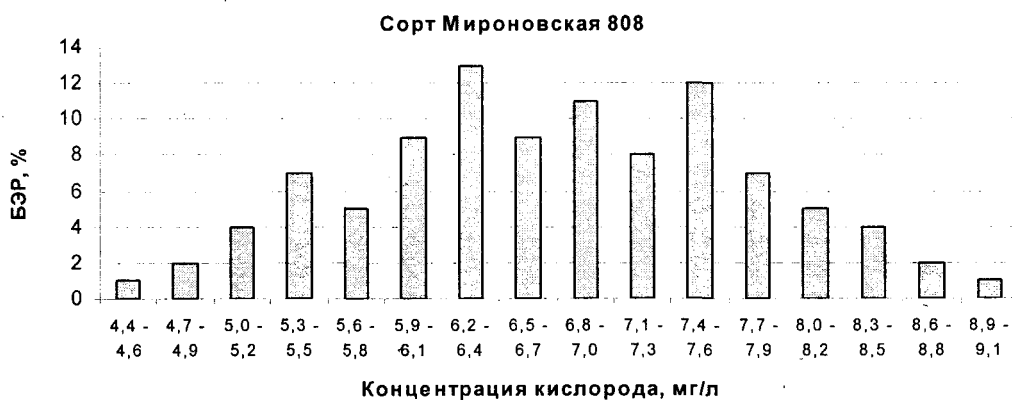


Рис. 6. Распределения БЭР по концентрациям кислорода

вующие концентрации вызывают изменение статуса электрических систем у большего числа растений, нежели другие концентрации. В данном случае среагировали 15% растений от общего их числа.

У сорта Белорусская 80 наблюдали два ярко выраженных пика в интервалах концентраций кислорода 6,2-6,4 мг/л и 6,8-7,0 мг/л. Даже при беглом анализе диаграмм можно заметить, что у Белорусской 80 на сгруппированных значениях малых концентраций кислорода расположено больше наблюдений, чем в той же области диаграммы в случае с сортом Кутуловская.

При анализе данных по сорту Мироновская 808 на фоне большой разбросанности значений видны 3 максимума в средней области концентраций, менее ярко выраженный всплеск — на интервале 5,3-5,5 мг/л.

Представляется возможным изменением стрессорной БЭР обнаружить растения биотипов, составляющих тот или иной сорт, которые имеют различную устойчивость к гипоксии или специфику строения систем, обуславливающих данную устойчивость.

К большому сожалению, не удалось получить урожай растений, различающихся по биоэлектрической ре-

акции. Подтвердить или опровергнуть выдвинутую гипотезу о принадлежности растений к различным биотипам было возможно только при дальнейшем анализе растений и их потомства.

Из-за большой разбросанности значений мы не приводим результаты статистической обработки. Таким образом, эти данные следует считать лишь тенденциями, однако при доработке предложенной методики можно получить хороший тест для определения устойчивости к условиям недостатка кислорода в корнеобитаемой среде.

Заключение

В результате лабораторных исследований установлено, что при гипоксическом стрессе, создаваемом при постепенном вытеснении кислорода из питательного раствора, в момент регистрации распространяющегося ПД, этилен не обнаруживается ни в корнях, ни в надземной части. Впервые он регистрируется спустя 60 мин после начала устойчивого изменения РБП, связанного с действием гипоксии.

Используя предложенную нами методику определения момента наступления стресса у растений по биоэлектрическому отклику, представляется возможным разделить популяций на группы по устойчивости к гипоксии.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Гринева Г.М., Брагина Т.В., Платонов А.В.* Индуцированные этиленом адаптивные реакции кукурузы при корневом и полном затоплении. — V Межд. конф. Регуляторы роста и разв. расте-

ний. М., 1999, ч. 1, с. 21-22. — 2. *Крейсберг О.Э., Романовская О.Л., Павулина Т.А.* Модификация метода определения по этилену остатков 2 ХЕФК в растительном материале. — Изв. академии наук Латв. ССР. 1983, № 12, с. 82-87. — 3. *Опритов В.А.* Электричество в жизни животных и растений. — Соросовский образовательный журнал, 1996, № 9. — 4. *Опритов В.А.* Электрические сигналы у высших растений. — Соросовский образовательный журнал, 1996 № 10. — 5. *Платонов А.В., Бахтенко Е.Ю., Соркина Г.Л.* Влияние длительности затопления и обработок фитогормонами на синтез этилена. — V Межд. конф. Регуляторы роста и разв. растений. М., 1999, ч. 1. — 6. *Полевой В.В.* Взаимосвязь гормональных и электрических сигналов у растений. — V Межд. конф. Регуляторы роста и разв. растений. М., 1999, ч. 1. — 7. *Тарчевский И.А.* Сигнальные системы клеток растений. М.: Наука, 2002. — 8. *Третьяков Н.Н., Карнаухова Т.В., Синявин М.С.* Динамика интенсивности дыхания и разности биопотенциалов растений пшеницы при нарастающей корневой гипоксии. — Изв. ТСХА, 1996, вып 2, с. 145-151. — 9. *Туркова Н.С.* Ростовые реакции растений при избыточном поливе. — Докл. АН СССР, 1944, т. 42, № 2, с. 84-88. — 10. *Benada J.* Электрический потенциал как фактор морфогенеза и онтогенеза растений. — Biol. Plant, 1994, 36. — 11. *Bradford K.J., Hsiao T.C.* — Plant Physiol, 1982, vol. 70, № 5, pp. 1508-1513. 12. *Jackson M.B., Campbell D.J.* — Planta, 1976, vol. 129, p. 273. 13. *Jackson M.B.* — Annu. Rev. Plant Physiol, 1985, vol. 36, pp. 145-174. — 14. *Reid D.M., Bradford K.J.* — Flooding and Plant Growth/T.T.Kozlowski ed. — Florida: Acad. Press, 1984, pp. 195-219. 15. *Wright S.T.C., Hiron R.W.P.* — Plant Growth Substances/ D.J. Carr ed. — Berlin-New York:Springer-Verlag, 1972, pp. 291-298.

Статья поступила
14 апреля 2004 г.

SUMMARY

Formation of ethylene in above-ground part and in roots of wheat plants in connection with bioelectric reaction on hypoxic stress was studied in laboratory experiments on water crop with increasing hypoxu due to passing nitrogen through nutrient solution. Methods of determining the beginning of stress action are proposed. On the example of three wheat varieties it was attempted to describe their biotypical composition using electrophysiological testing the plants having gradual decrease of oxygen in nutrient solution.