

ЭЛЕКТРОГЕННАЯ РАЗНОСТЬ ПОТЕНЦИАЛОВ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ГЕНОТИПИЧЕСКОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ РАСТЕНИЙ

Л. А. ПАНИЧКИН, М. Ю. ЧЕРНИЦКИЙ, О. А. БУКО

(Лаборатория биофизики растений)

Исследовали влияние резкого охлаждения 8—10-дневных проростков 4 сортов огурца на скорость восстановления исходной разности потенциалов (РП), т. е. способность поддерживать электрогенную составляющую. Установлено, что холодоустойчивые сорта быстрее восстанавливают РП. Через 5—7 мин после начала охлаждения возможно достоверное разделение сортов по значению РП на устойчивые, среднеустойчивые и неустойчивые при разнице между контрастными сортами 46 мВ. Выдерживание растений при повышенной влажности в течение 1 ч увеличивало разницу в значении РП: между контрастными сортами она составляла 62 мВ. Четко выделялась индивидуальная специфичность растений. Затраты времени на одно растение — около 6 мин.

Для оценки холодоустойчивости растений используют прямые и косвенные методы. Наиболее точные данные получаются в результате непосредственного выдерживания растений при критических температурах и последующего определения их выживаемости. Однако в практической работе применяют в основном экспрессные косвенные методы диагностики. Холодоустойчивость оценивают по температуре, при которой погибает 50 % паренхимных клеток в высечках листьев после промораживания [15], по температуре, вызывающей остановку

движения протоплазмы клеток при охлаждении [1], по количеству клеточного сока, отжимаемого из листьев при малых давлениях [9], по выделению электролитов из листьев и корней [7] и другими способами.

Более перспективными представляются электрофизиологические методы, позволяющие сохранить оцениваемые растения неповрежденными [2, 19]. Обычно определяют температуру, вызывающую резкую деполяризацию клеточных мембран, т. е. биоэлектрическую реакцию (БЭР). Для получения чет-

ких различий используют повторное охлаждение и по смещению температурного порога реакции судят о холодоустойчивости [15, 17]. Суть подобных способов диагностики состоит в том, что температурный фактор оказывает модифицирующее действие на работу ионных каналов, находящихся под генетическим контролем [14].

Известен и другой показатель биоэлектрической активности клеток — мембранный потенциал E_m , представляющий собой сумму диффузионной и электрогенной составляющих. Электрогенная составляющая E_p подавляется под действием ингибиторов, пониженных и повышенных температур [4, 12]. Так как попытки определения холодоустойчивости растений по этому признаку не предпринимались, мы сочли целесообразным исследовать способность проростков огурца разных сортов поддерживать электрогенную составляющую мембранного потенциала при действии пониженных температур.

Методика

В качестве объекта исследований были выбраны проростки огурца четырех сортов, которые мы называем в порядке убывания их холодоустойчивости: Весенний салатный, Сентябрьский, Эстафета, Марфинский. Растения выращивали в одинаковых условиях гидропонным способом на $1/4$ нормы раствора Кнопа при 13-часовом фотопериоде, освещенности 10—11 тыс. лк, температуре $+26^\circ\text{C}$ и относительной влажности воздуха 60%. Опыт проводили на семядольных листьях 7—15-дневных проростков. Для регистрации биопотенциалов использовали экстраклеточную методику: электроды ЭВЛ-1МЗ, подключенные на выход высокоомного вольтметра В7-30. Контакт с объектом осуще-

ствляли через переходные насадки, заполненные раствором Кнопа ($1/4$ нормы). Измерительный электрод контактировал с нижним эпидермисом листа между жилками, а электрод сравнения — с омывающим корни раствором. Воздействие пониженными температурами осуществляли путем помещения растений в охлажденную климатическую камеру КТЛК-1250 (ГДР), где и производили регистрацию биопотенциалов. Уровень освещенности сохраняли тот же, что и в нормальных условиях. Биологическая повторность опытов 16—30-кратная, результаты обработаны статистически для 95% уровня значимости.

Результаты

При перенесении исследуемых растений в охлажденную климатическую камеру и подведении к листу электрода регистрировалась резкая импульсная деполяризация амплитудой $146 \pm 3,4$ мВ (сорт Весенний салатный), затем потенциал выходил на стационарный уровень (рис. 1). Для выяснения конкретного фактора, вызывающего БЭР, на

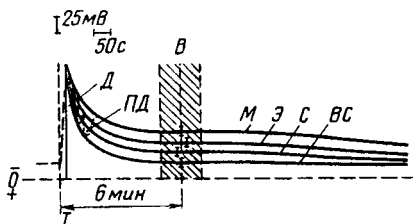


Рис. 1. Биоэлектрические реакции разных сортов огурца на резкое снижение температуры воздуха.

T — момент снижения температуры с 26 до $7,5^\circ\text{C}$; D — биоэлектрическая реакция (деполяризация); $ПД$ — потенциал действия от листьев к корням; V — оптимальное время определения РП; M — сорт Марфинский (неустойчивый); $Э$ — Эстафета (среднеустойчивый); $С$ — Сентябрьский (среднеустойчивый); $ВС$ — Весенний салатный (устойчивый).

холод переносили также растения с уже подведенными электродами. Амплитуда БЭР в этом случае была ниже: $98,7 \pm 4,3$ мВ. После БЭР часто можно было наблюдать один или несколько потенциалов действия, распространяющихся от листьев к корням. Затем происходило постепенное уменьшение разности потенциалов (РП), стремящейся при длительной экспозиции к 0, причем скорость этого процесса была неодинакова у исследуемых сортов. У более холодоустойчивых сортов быстрее восстанавливался исходный уровень и были ниже значения РП. Наибольшую разницу в значениях РП между сортами регистрировали через 5—7 мин после начала охлаждения. Она не была связана с исходной разницей между сортами: значение РП в норме составляло $25,3 \pm 3,1$ мВ у Весеннего салатного и $27,1 \pm 3,3$ мВ у Марфинского.

Исследовали влияние трех уровней снижения температуры на скорость восстановления исходной РП после реакции. При температурах $15-12^\circ\text{C}$ растения обладали высокой скоростью восстановления РП, и через 6 мин после охлаждения РП составляла $39,2 \pm 10,9$ мВ у Весеннего салатного и $44,9 \pm 8,1$ мВ у Марфинского. Снижение температуры до $0-+4^\circ\text{C}$ также не позволяло выявить сортовые различия, так как скорость восстановления РП была минимальна, потенциал выходил на стационарный уровень $60,7 \pm 20$ мВ у Весеннего салатного и $76,0 \pm 23$ мВ у Марфинского. В дальнейшем в качестве стандартной использовали температуру охлаждения до $7,5^\circ\text{C}$ и время регистрации РП — через 6 мин после начала охлаждения.

Оценивая таким образом сортовые различия у проростков разного возраста, выяснили, что с возрастом они уменьшались. У 9-дневных проростков контрастных сортов разница в значениях РП состав-

ляла $46,2 \pm 3,2$ мВ, у 11-дневных — $38,6 \pm 3,4$, у 13-дневных — $30,4 \pm 4,8$ мВ, поэтому в основном опыте использовали 9—10-дневные проростки.

Предварительная регистрация РП в норме была связана с увеличением поверхности листа в точке контакта с электродом. Интересно было выяснить, как влияет такое местное изменение водного режима на последующую реакцию клеток при охлаждении. Для этого две точки листа смачивали за 5 и 2 мин до охлаждения, третью — при регистрации в момент охлаждения, а четвертую — спустя еще 5 мин (рис. 2).

Учитывая зависимость динамики РП от водного режима, мы оценили предварительное воздействие повышенной влажностью воздуха перед охлаждением растений. Повышение влажности воздуха до 85% вызывало увеличение значения РП на холоде у всех сортов, которое затем постепенно восстанавливалось до уровня, зарегистрированного до повышения влажности (рис. 3). Однако скорость восстановления исходных значений РП существенно различалась у исследуемых сортов. Как видно на рис. 3, наибольшая разница между сортами по этому показателю была при выдерживании растений в условиях повышенной влажности в течение 1 ч. В этом случае возможно было достоверное разделение четырех сортов по уровню РП, соответствующее их характеристикам холодоустойчивости. Разница между контрастными сортами возрастала до $62,5 \pm 4,8$ мВ.

Коэффициент вариации РП у сортов был высок — 10—30% в зависимости от сорта. Это заставило искать причины разброса и многократно повторять записи на одних и тех же растениях с перерывом в сутки. В данных опытах была обнаружена индивидуальная специфич-

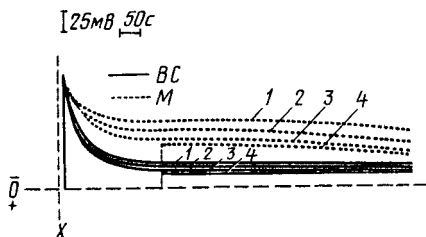


Рис. 2. Влияние локального увлажнения поверхности листа на кинетику восстановления его РП в ответ на охлаждение. 1 — увлажнение за 5 мин до охлаждения; 2 — за 2 мин; 3 — увлажнение в момент охлаждения; 4 — спустя 5 мин; BC — сорт Весенний салатный; M — Марфинский.

ность динамики изменения РП при резком охлаждении растений. Следует учесть, что регистрацию производили на различных точках листьев и даже на различных семядольных листьях.

Перенесение на холод растений вызывало импульсную деполаризацию клеток листа, обусловленную действием охлажденного воздуха и прикосновением к листу капли охлажденной контактной жидкости. После этого в нормальных условиях потенциал должен был вернуться на свой исходный уровень. Однако этого не происходило и причиной являлось продолжающееся действие холода, угнетавшего электрогенную составляющую E_p мембранного потенциала клеток листа. Значение E_p , полученное с помощью микроэлектродной техники на клетках стебля тыквы, составляло около $80 \div -90$ мВ и снижалось под действием пониженных температур [11]. В наших опытах РП неустойчивого сорта Марфинский после часовой выдержки при повышенной влажности и перенесении на холод была равна $-109,5 \pm 6,6$ мВ, т. е. при значении РП в номере $-27,1 \pm 3,3$ мВ деполаризация клеток составляла 82,5 мВ, что соответствует значению E_p

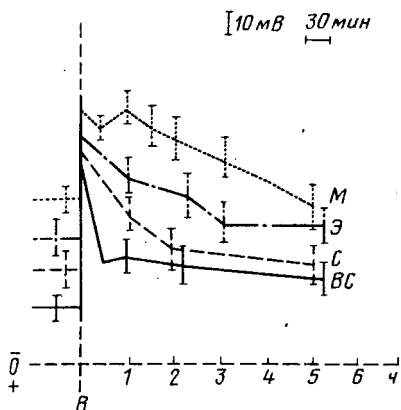


Рис. 3. Влияние повышения влажности воздуха в норме с 60 до 85 % на РП сортов, измеренную через 6 мин после начала охлаждения.

B — момент повышения влажности; остальные обозначения те же, что на рис. 1.

Снижение РП при длительной регистрации объясняется неполным подавлением E_p , а также постепенным охлаждением питательного раствора и деполаризацией корневой системы, поэтому наибольшую разницу в значении РП у сортов регистрировали через 5—7 мин после охлаждения.

Предположение о сортовой специфичности подавления холодом составляющей E_p подтверждается и ее температурной зависимостью: относительно высокие температуры ($15-12^\circ\text{C}$) не вызывали подавления E_p , а слишком низкие ($0-+4^\circ\text{C}$) подавляли ее у всех сортов одинаково, и лишь при оптимальной для диагностики данного вида растений температуре $7-9^\circ\text{C}$ происходило разделение сортов по степени сохранения E_p при действии стресса.

Достоверное уменьшение разницы между сортами по значению РП с возрастом растений объясняется их адаптацией к одинаковым условиям выращивания при относитель-

но высоких температурах. Вероятно, происходит смена исходных генетических программ в процессе приспособления к температурным условиям среды.

Локальное подавление транспирации листа в месте контакта с электродом или при повышении влажности воздуха приводило к увеличению РП на холоде, т. е. к снижению устойчивости — эффекту, известному в литературе [10]. Без какой-либо предварительной обработки удавалось разделить сорта на три категории: устойчивые, среднеустойчивые и неустойчивые, а в случае выдерживания растений при повышенной влажности в течение часа возможно достоверное разделение по холодоустойчивости четырех сортов.

Хорошая воспроизводимость кинетики РП каждого растения, регистрируемая у разных листьев одного и того же растения в разном возрасте, подтверждает ее генетическую обусловленность. По сути дела, в наших опытах оценивалась генотипическая специфичность работы активного ионного транспорта, ответственного за генерацию E_p .

У высших растений E_p связана прежде всего с активностью $H \pm AT$ Фазы плазматических мембран [11, 13], с функционированием системы сопряженного транспорта по каналам. Электрогенная активность опосредована также со свойствами мембранных фосфолипидов, поскольку вязкость липидной фазы мембран контролирует конформационное состояние транспортных АТФаз и пассивных каналов утечки [8, 10].

Известно, что многие из перечисленных факторов, влияющих на значения E_p генетически обусловлены. Холодоустойчивость связана с увеличением степени ненасыщенности жирнокислотных остатков фосфолипидов [6, 16], сдвигом тем-

пературных оптимумов синтезируемых растворимых и мембраносвязанных изоферментов [18]. Генотипическая специфичность на уровне сортов показана на примере функционирования $H \pm AT$ Фазы плазмалеммы корней пшеницы [3].

Заключение

Показатель E_p представляется нам весьма информативным. Он тесно коррелирует с температурной устойчивостью. Без участия E_p не могут сформироваться значительные электрохимические градиенты на мембранах, разрядка которых формирует электрические импульсы возбуждения.

Диагностика холодоустойчивости по значению E_p технически весьма проста. Для нее не требуется регистрации кинетики БЭР, отпадает необходимость в самописце и достаточно только электродов, вольтметра и охлаждающего устройства. Затраты времени на регистрацию РП у каждого индивидуального растения составляют 6 мин.

Предлагаемый способ диагностики является очень перспективным, однако необходимы дальнейшие всесторонние исследования с целью уменьшения коэффициентов вариации РП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александров В. Я. Цитофизиологические и цитозкологические исследования устойчивости растительной клетки к действию высоких и низких температур.— Тр. БИН АН СССР, 1963, сер. 4, вып. 16, с. 234—274.— 2. Воробьев Л. Н., Тарусов Б. Н. Биофизические исследования на Звенигородской биостанции и направления их развития.— В сб.: Экология и биогеоценология.— М.: Изд-во МГУ, 1974.— 3. Воробьев Л. Н. Регулирование ионного транспорта: теоретические и практические аспекты минерального питания растений.— Итоги науки и техники. Сер. физиол. раст.— М.: ВИНТИ, 1988, т. 5. с. 5—160.— 4. Гу-

нар И. И., Паничкин Л. А. Зависимость разности электрических потенциалов клеток корня тыквы от температуры.— Изв. ТСХА, 1975, вып. 2, с. 3—6.— 5. Дроздов С. Н., Сычева З. Ф., Будыкина Н. П., Балагурова Н. И., Холопцева Н. П. Влияние предшествующей температуры на заморозкоустойчивость растений.— Физиол. раст., 1976, т. 23, № 2. с. 385—390.— 6. Ивков В. Г., Берестовский Г. Н. Липидный бислой биологических мембран.— М.: Наука, 1982, с. 224.— 7. Карнаухова Т. В., Третьяков Н. Н., Крылов О. Н., Гаркавенкова А. Ф., Зидан Р. Способ оценки холодостойкости огурца.— В сб.: Рост и устойчивость растений.— Новосибирск: Наука, 1988, с. 163—168.— 8. Мусаев Н. А., Воробьев Л. Н. Электрогенная активность и структурная лабильность плазмалеммы клеток *Nitellopsis obtusa* при повышенных температурах.— Физиол. раст., 1981, т. 28, № 1, с. 86—93.— 9. Незговоров Л. Н., Соловьев А. К., Родина Л. Н. Определение изменений в холодостойкости растений по количеству сока, отжимаемого из листьев.— Физиол. раст., 1969, т. 16, вып. 4, с. 650—659.— 10. Опригов В. А., Пятыхин С. С., Худяков В. А. О роли структурных перестроек липидов возбудимых мембран в генерации потенциала действия высших растений при умеренном охлаждении.— Биофизика, 1984, т. 29, вып. 3, с. 415—418.— 11. Опригов В. А., Пятыхин С. С. Ингибиторный анализ природы электрогенной компоненты мембранного потенциала у клеток стебля тыквы.— В сб.: Биоэлектрические явления и мембранный транспорт у растений / Горьк. ун-т, 1985, с. 3—7.— 12. Опригов В. А., Ретивин В. Г., Пятыхин С. С. О природе потенциалов действия высших растений.— В сб.: Электрофизиологические методы в изучении функционального состояния растений. М.: ТСХА, 1988, с. 14—22.— 13. Полевой В. В., Саламатова Т. С. Протонные насосы и их функциональная роль.— В кн.: ионный транспорт в растениях. Итоги науки и техники. Сер. физиол. раст.— М.: ВИНТИ, 1980, т. 4, с. 78—125.— 14. Пятыхин С. С., Опригов В. А. Влияние температуры на способность возбудимых клеток высших растений генерировать ритмически повторяющиеся потенциалы действия.— В сб.: Биоэлектрическая активность и мембранный транспорт у растений / Горьк. ун-т, 1988, с. 5—12.— 15. Ретивин В. Г., Соловьев В. В. Электрофизиологическое определение холодоустойчивости у проростков огурца.— В сб.: Биоэлектрическая активность и мембранный транспорт у растений. Горьк. ун-т, 1988, с. 36—41.— 16. Родионов В. С. Влияние низких температур на липидный обмен в растениях и фазовые переходы в мембранах.— В сб.: Эколого-физиологические механизмы устойчивости растений к действию экстремальных температур. Карельский филиал АН СССР, Петрозаводск, 1978, с. 37—51.— 17. Стадник С. А., Боберский Г. А. Электрофизиологические параметры древесных растений при различных температурных режимах.— В сб.: Электрофизиологические методы в изучении функционального состояния растений М.: ТСХА, 1988, с. 78—82.— 18. Титов А. Ф. Полиморфизм ферментных систем и устойчивость растений к экстремальным (низким) температурам.— Успехи соврем. биологии, 1978, т. 85, вып. 1, с. 63—70.— 19. Тхаханов А. К. Зависимость биоэлектрических потенциалов растений от понижающейся температуры корней.— Физиол. раст., 1972, т. 19, № 6, с. 1211—1214.— 20. Холодоустойчивость растений.— Сельскохозяйственный энциклопедический словарь.— М.: Сов. энциклопедия, 1989, с. 580.

Статья поступила 15 марта 1991 г.

SUMMARY

The effect of abrupt cooling of 8—10-days-old sprouts of 4 cucumber varieties on the rate of recovering the initial potential difference (PD) was studied. It has been found that cold resistant varieties recover PD more quickly. In 5—7 minutes after the cooling started the varieties may be reliably divided according to PD value into resistant, mean-resistant and non-resistant ones, the difference between contrast varieties being 46 mV. Keeping the plants under higher humidity for 1 hour increased the difference in RD value. Specificity of individual plants was clearly seen. Time expenditure per one plant was about 6 minutes.