

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДА ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ХОЛОДОУСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ

Л.А. ПАНИЧКИН, Г.А. ПРУДНИКОВ*, М.С. КРАСАВИНА*

(Кафедра физиологии растений)

Предложено техническое решение и дано обоснование метода оценки холодоустойчивости растений по параметрам местной биоэлектрической реакции листа на локальное охлаждение. Метод апробирован на двух гибридах огурца (*Cucumis sativus* L.), отличающихся разным уровнем холодоустойчивости. При использовании этого метода выявлены также различия в параметрах биоэлектрической реакции донорных и акцепторных листьев огурца на Холодовой стресс.

Ключевые слова: *Cucumis sativus* L., холодоустойчивость, диагностика, разность электрических потенциалов, биоэлектрическая реакция.

В физиологических исследованиях, селекционной работе возникает необходимость оценки холодоустойчивости растений. Разработано немало прямых и косвенных методов диагностики устойчивости растений к низким положительным температурам [3].

Из косвенных методов наибольший интерес представляют биофизические методы прижизненной оценки устойчивости [9] и, прежде всего, электрофизиологические, основанные на регистрации и анализе параметров биоэлектрических реакций растений на стрессовый фактор [2, 4-6]. Биоэлектрические реакции (БЭР) растений, регистрируемые в месте раздражения, являются местными электрическими реакциями и отражают изменение стационарного уровня разности потенциалов клеток, подвергаемых стрессовому воздействию. Разность электрических потенциалов (РЭП) клеток высших растений обусловлена пассивной и активной компонентами. Пассивная (диффузионная) компонента РЭП, формируемая на плазмалемме растительных клеток,

создается при участии ионов хлора, калия, кальция и натрия. Активная (метаболическая) компонента связана с работой электрогенной помпы — Н-АТФазы [1].

Как и на любое раздражение достаточной силы, при холодовом стрессовом воздействии наблюдаются двухфазные БЭР. Первая фаза — деполяризация — регистрируется вследствие поступления ионов кальция в клетку, активации хлорных каналов и синхронной инактивации Н-АТФазы [1]. При неповреждающем воздействии вслед за деполяризацией наступает реполяризация, т.е. восстановление исходной разности потенциалов, связанное с выходом ионов калия из клетки и активацией Н-АТФазы [1]. Участие Н-АТФазы в формировании местной биоэлектрической реакции обуславливает зависимость параметров местной БЭР от мембранных градиентов электрических потенциалов клеток растения, их функционального состояния.

На основе изучения особенностей биоэлектрических реакций растений

* ИФР РАН.

на стрессовые воздействия разработан ряд методических подходов для диагностики холодоустойчивости растений. В их основе — регистрация параметров биоэлектрических реакций в ответ на стандартное холодовое раздражение. Для создания стандартного холодового стресса обычно используется промышленный термоэлектрический столик ТОС-1. На термостолик устанавливают кювету с раствором, в который помещают корни или участок стебля проростка [1, 6]. Использование промежуточного звена — кюветы с раствором — ограничивает скорость охлаждения объекта исследования и соответственно интенсивность стрессового воздействия. В работе [6] для регистрации местной БЭР у листа платана и берёзы использовали метод непосредственного контакта тканей растения с ТОС-1, при этом площадь охлаждаемого участка составляла 250 мм², что исключало возможность локального охлаждения листа. Кроме того, в упомянутом методе для поддержания температурного режима (плавное, импульсное или ступенчатое изменение температуры) авторы использовали сложную электронную аппаратуру.

Для оценки генотипических и адаптивных особенностей растений нами усовершенствован метод регистрации местной биоэлектрической реакции листа при его локальном охлаждении.

Объекты и методы исследования

Исследования проводили на 14-17-дневных растениях гибридов огурца (*Cucumis sativus* L.) Емеля и Мазай, отличающихся по холодоустойчивости (более устойчив гибриды Емеля). Растения выращивали в почвенной культуре при температуре 22~24°C и освещении лампой ДРЛФ-400 при 16-часовом световом периоде. Освещенность составляла 5000 люкс. В ряде опытов при оценке возрастных особенностей БЭР растения гибрида Мазай выращивали до формирования 5~7 листьев. Часть растений подвер-

гали холодовому стрессу (2°, 24 ч) в климакамере КТЛК-1250 (Германия). Выделение электролитов из листовых высечек гибрида огурца Мазай осуществляли по ранее изложенной методике [8]. Биоэлектрические потенциалы регистрировали с помощью лабораторных хлорсеребряных электродов ЭВЛ-1М1 с переходными насадками, заполненными водопроводной водой. Индифферентный электрод через переходную насадку контактировал с раствором, окружающим корень, отводящий электрод подводили через увлажненный хлопковый фитиль в хлорвиниловой трубке к верхней поверхности листа. Таким образом, регистрировали разность потенциалов между средой и локально охлаждаемой частью листа (рисунок). Холодовой стресс создавали кратковременным включением термоэлектрического столика ТОС-11.

Новизна метода электрофизиологической оценки холодоустойчивости растений состоит в следующем. Для охлаждения участка листа мы использовали, как и в упомянутых выше работах, столик ТОС-11, но охлаждение листа осуществляли не прямым контактом его с ТОС-11, а через металлический переходник в виде перевернутой буквы Т. С этой целью из алюминиевой заготовки вытачивали диск с выступом в центральной части. Диск

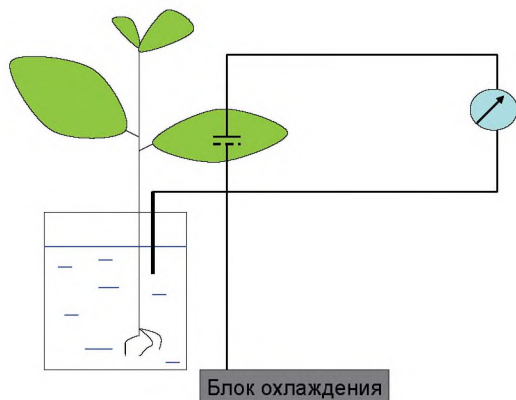


Схема опыта

плотно фиксировали на термостоліке, а на изолированный (электрически) выступ помещали неотделённый от растения лист. Небольшая площадь контакта с листом (10—20 мм²) позволяла охлаждать ткани листа между крупными жилками. От диаметра выступа зависела площадь охлаждаемого участка листа и скорость изменения температуры. При изменении полярности включения термодатчика ТОС-11 можно было не только охлаждать, но и нагревать локально лист.

Усовершенствован был также способ контакта отводящего электрода с верхней поверхностью листа. Он осуществлялся не путём открытого контакта, как это делалось в вышеупомянутой работе [6], а с использованием слегка прижатой к листу ниппельной резинки, в которой находился влажный контактный фитилёк, защищённый таким образом от высыхания.

Нижняя сторона листа охлаждалась, а на верхней стороне листа регистрировали изменение электрических потенциалов относительно среды. В качестве высокоомного входного устройства при регистрации БЭР применяли рН-метр 5170 (Венгрия), запись температуры и БЭР проводили на самопишущем двухкоординатном милливольтметре НЗО7/1 (Россия).

С помощью микротермистора конструкции В.Г. Карманова записывали на самопишущем приборе изменение температуры листа. В предварительных опытах были установлены оптимальные параметры холодового воздействия, вызывающего воспроизводимые БЭР листа. Вначале в течение 105 с термостолік работал в режиме охлаждения, за это время температура снижалась с 23–24 до 8–9°C. Затем полярность включения термоохлаждающих элементов століка меняли и за 45 с исходная температура листа восстанавливалась, после чего ТОС-11 выключали.

Перед регистрацией БЭР к опытному растению подводили отводящие электроды и оставляли растение в по-

кое на 1 ч для стабилизации разности электрических потенциалов (РЭП), после чего растение подвергалось стандартному температурному воздействию.

Результаты и их обсуждение

Локальное снижение температуры листа вызывало негативацию РЭП в зоне охлаждения. Начало изменения разности потенциалов наблюдали спустя 8–12 с после включения термоэлектрического століка, хотя изменение температуры участка листа наступало через 4–5 с после его включения. Первоначальное плавное изменение разности потенциалов сменялось фазой быстрой деполяризации. Часто при формировании импульса негативации наблюдали частичную реполяризацию, которая сменялась еще одной фазой деполяризации (формирование второго импульса). Импульсная активность не следовала линейно за изменением температуры. Переключение режима охлаждения на нагрев приводило к восстановлению температуры и развитию фазы реполяризации. Через 45 с (время работы ТОС-11 в режиме нагрева) полного восстановления исходной разности потенциалов не наблюдали. Первоначальная величина РЭП восстанавливалась спустя 10–15 мин после выключения термостоліка.

Интересно было выявить продолжительность рефрактерного периода после воздействия. Известно, что в среднем рефрактерный период у растений составляет от 20 мин до 1 ч [1]. Сравнивали записи биоэлектрических реакций с периодичностью охлаждения 15, 30 и 45 мин. За 15 мин не всегда полностью восстанавливались параметры БЭР после предыдущего воздействия. Существенных различий в параметрах БЭР при периодичности охлаждения 30 и 45 мин не выявили. Поэтому использовали как стандарт 30-минутный интервал между опытами. Для характеристики БЭР использовали следующие параметры:

- время начала реакции (временной интервал от начала охлаждения до изменения разности потенциалов);

- амплитуда изменения РЭП;

- скорость нарастания (отношение амплитуды изменения РЭП ко времени, за которое она достигала максимального значения);

- число импульсов за период БЭР;

- время восстановления исходной разности потенциалов;

- площадь регулирования (площадь отклонения регистрируемой величины от исходного значения за определенный промежуток времени определяли планиметром).

Важно было выяснить, существуют ли различия в параметрах биоэлектрической реакции при охлаждении различных частей одного листа. Для этого охлаждали участки листа у основания, в середине и на кончике листовой пластинки. Оказалось, что существенных различий между БЭР в разных точках нет. В дальнейшей работе использовали охлаждение листа в средней части листовой пластинки на расстоянии 15-20 мм от края листа.

Для выявления корреляции параметров биоэлектрической реакции и холодоустойчивости сравнивали БЭР гибридов огурца Мазай и Емеля. Параметры местной БЭР листьев гибридов огурца на Холодовой стресс достоверно различались (табл. 1). У менее устойчивого гибрида Мазай наблюдалась большая амплитуда изменения РЭП, скорость нарастания импульса, площадь регулирования. Не было существенных различий в числе импульсов. Незначительные различия наблюдали во времени начала реакции — быстрее изменялась разность потенциалов у холодочувствительного гибрида.

Исследовали БЭР, вызванные охлаждением, у листьев разного возраста. Для этого подвергали локальному охлаждению донорный (5-6-й сверху) и акцепторный (2-й сверху) листья и сравнивали их БЭР (табл. 2).

Параметры БЭР на локальное охлаждение листьев двух гибридов огурца

Параметры БЭР	Емеля	Мазай
Время начала реакции, с	10±1,5	9,5±2,0
Амплитуда, мВ	72±12,1	116±15,3
Площадь регулирования, %	100±11,3	130±7,5
Скорость нарастания, мВ/с	2,06±0,12	2,78±0,10

Таблица 2

Параметры БЭР на локальное охлаждение донорного и акцепторного листьев гибрида огурца Мазай

Параметры БЭР	Донорный лист	Акцепторный лист
Время начала реакции, с	8,5±1	12±1,5
Амплитуда, мВ	113±7	85±10
Площадь регулирования, %	130±11	100±9
Количество импульсов, шт.	1,8	1,7
Скорость нарастания РЭП, мВ/с	2,73±0,3	2,05±0,2

Для донорного листа характерна более высокая отзывчивость на стресс. Изменение биоэлектрических потенциалов при охлаждении у донорных листьев происходит значительно быстрее, чем у акцепторного листа. Амплитуда импульса у донорного листа также существенно выше, чем у акцепторного. Выявлены четкие различия в скорости нарастания биоэлектрического импульса и в площади регулирования. Из литературы [7] известно, что более устойчивы к стрессовым воздействиям акцепторные листья. В наших опытах, по параметрам БЭР, также установлена большая холодоустойчивость акцепторных листьев гибрида огурца.

Подобная зависимость (табл. 3) наблюдалась и в опытах по определению выделения электролитов из высечек донорных и акцепторных листьев

Таблица 3

Выделение электролитов за 30 мин из листовых высечек растений огурца, подвергнутых холодовому стрессу
(% от общего содержания в высечке)

Листья	Выход электролитов за 30 мин, %
Акцепторные	5,10±0,2 (6)
Донорные	10,4±0,7 (9)

растений огурца (гибрид Мазай), подвергнутых в климакамере холодовому стрессу (2°, 24 ч).

Выделение электролитов из акцепторных листьев было в 2 раза меньше, чем из донорных, менее устойчивых к холодовому стрессу (см. табл. 2).

Библиографический список

1. *Воденев В.А.* Механизмы генерации и функциональная роль потенциалов возбуждения у высших растений. Автореф. докт. дис. М., 2009.
2. *Гунар И.И., Маслов А.П., Паничкин Л.А.* Электрофизиологическая характеристика репродукций комбинационной ценности гибридов озимой пшеницы в связи с морозостойкостью // Доклады ВАСХНИЛ, 1971. № 9. С. 7-8.
3. Диагностика устойчивости растений к стрессовым воздействиям (методическое руководство). Л.: Изд-во ВИР, 1988.
4. *Паничкин Л.А., Черницкий Ю.М.* Способ оценки холодоустойчивости растений огурца, 1991. А. с. № 1701175.
5. *Стадник С.А., Боберский Г.А.* Электрофизиологические параметры древесных растений при различных температурных режимах. Сб. научных трудов. М.: Изд-во ТСХА, 1988. С. 78-82.
6. *Ретивин В.Г., Опритов В.А.* К оценке холодоустойчивости высших растений на основе электрофизиологического анализа их возбудимости // Физиология растений, 1992. Т. 39. № 6. С. 1224-1231.
7. *Трунова Т.И., Шаяхметова И.Ш., Новицкая Г.В.* Особенности закаливания разновозрастных листьев озимой пшеницы к морозу и их роль в формировании морозостойкости узлов кущения // Физиология растений, 1984. Т. 16. № 6. С. 560-566.
8. *Земский В.Г., Карнаухова Т.В., Паничкин Л.А.* Проницаемость и электропроводность листьев разных ярусов фасоли при подвядании // Известия ТСХА, 1979. Вып. 6. С. 8-13.
9. *Федулов Ю.П.* Биофизические методы оценки устойчивости растений к стрессам. — Диагностика устойчивости растений к стрессовым воздействиям (методическое руководство). Л.: Изд-во ВИР, 1988. С. 195-211.

Рецензент — д. с.-х. н. Е.В. Мамонов

SUMMARY

Both experimental approach and theoretical background to plant cold-resistance estimation according to local bioelectric response are suggested. The method has been tested on the two cucumber (*Cucumis sativus L.*), cultivars with various levels of cold-resistance.

Key words: cold-resistance, diagnostics, difference of electric potentials, bioelectric reaction.

Паничкин Леонид Александрович — д. б. н., РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел. (499) 976-20-54. Эл. почта: plantphysic@timacadru

Прудников Григорий Александрович — асп. ИФН РАН. Тел. (499) 231-83-71.

Эл. почта: grigorio3@yandex.ru

Красавина Марина Сергеевна — к. б. н. ИФН РАН. Тел. (499) 231-83-71.

Эл. почта: krasavina.m@mail.ru

Таким образом, модифицированный нами метод регистрации биоэлектрической реакции листа на локальное охлаждение позволяет выявлять сортовые и возрастные особенности холодоустойчивости растений.

Конечно, у авторов нет достаточных оснований рекомендовать наш модифицированный метод в практику селекционной работы. Необходимо проверить метод на разных культурах, с большим числом сортов. Анализ параметров БЭР должен осуществляться с помощью компьютерной программы, что позволит повысить производительность и точность оценки.