

На правах рукописи



**Прудников Григорий Александрович**

**УЧАСТИЕ ИОННЫХ КАНАЛОВ В ГЕНЕРАЦИИ МЕСТНОЙ  
БИОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ ЛИСТА ОГУРЦА НА  
ЛОКАЛЬНОЕ ОХЛАЖДЕНИЕ**

**03.01.05 – физиология и биохимия растений**

**Автореферат диссертации  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Москва – 2010**

Работа выполнена в лаборатории физиологии корня Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН и в Российском государственном аграрном университете – Московской сельскохозяйственной академии им. К.А.Тимирязева

**Научные руководители:**

кандидат биологических наук  
доктор биологических наук, профессор

Красавина Марина Сергеевна  
Паничкин Леонид Александрович

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук, профессор  
доктор биологических наук

Медведев Сергей Семенович  
Трофимова Марина Сергеевна

**Ведущая организация:**

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
биологический факультет

Защита диссертации состоится «22» июня 2010 г. в 11 часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Учреждении Российской академии наук Институте физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, д.35.  
Факс: (495) 977-80-18, e-mail: ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения российской академии наук Института физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН

Автореферат разослан «20» мая 2010 года

Ученый секретарь  
совета по защите докторских  
и кандидатских диссертаций,  
кандидат биологических наук



М.И. Азаркович

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** В процессе эволюции растений сформировалась сложная система внутриклеточной, внутриклеточной и внутриорганизменной сигнализации о действии биотических и абиотических факторов. В эту систему входят гормоны, метаболиты, специфические сигнальные молекулы и биоэлектрические потенциалы. Такая роль биопотенциалов хорошо изучена для животных объектов, а в последнее время обсуждается и применительно к растениям (см. обзоры Baluška et al., 2006; Baluška, Mancuso, 2009; Davies, 2006; Dicke, 2009; Trewavas, 2006, 2009).

Поскольку наиболее вероятное участие в координации ответной реакции различных органов растений признается за распространяющимися электрическими импульсами, основное внимание исследователей было обращено на потенциал действия (ПД) и вариабельный потенциал (ВП). Показано, что ПД распространяется по флоэме, и что в его генерации участвуют главным образом потенциал-зависимые  $\text{Ca}^{2+}$ -,  $\text{Cl}^-$ - и  $\text{K}^+$ - каналы. Механизм генерации ВП изучен слабее. Признается, что в его основе лежит «гидравлическая волна» – распространяющееся по ксилеме резкое повышение давления, вызывающее изменения тургорного давления в клетках по пути распространения. Предполагается участие механочувствительных ионных каналов в трансформации изменения тургорного давления в электрическую ответную реакцию, но они не идентифицированы. Механизмы генерации местной, нераспространяющейся биоэлектрической реакции (БЭР), участие в ней ионных каналов слабо изучены. Наиболее вероятен лишь вход кальция в клетки и повышение концентрации свободного  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме (Пятыгин и др., 2006). Между тем местные БЭР, по-видимому, являются начальным этапом возникновения любой формы биоэлектрической активности и первым электрическим ответом на раздражения. Наиболее интересна реакция растений на охлаждение как на одно из наиболее распространенных в естественных условиях нетравмирующих воздействий (Оприлов и др., 2005).

Большая роль в ответных реакциях на неблагоприятные факторы среды принадлежит салициловой кислоте (СК). Известны более отдаленные последствия ее влияния, приводящие к формированию защитных реакций растений – модуляция окислительно-восстановительных реакций, образование АФК, индукция генов защитного ответа, в том числе PR-генов (см. Nayat, Ahmad, 2007). Наиболее изучена защитная роль СК при патогенезе, влияние на устойчивость к абиотическим факторам изучено слабее. Особенно противоречивы сведения о значении СК для холодоустойчивости растений – по одним данным СК повышает устойчивость к охлаждению (Tasgin et al., 2003), по другим – снижает (Miura et al., 2007). Имеется небольшое число данных о более ранних изменениях, происходящих на плазмалемме и клеточной стенке, – синтезе и распаде каллозы, активности экстраклеточных пероксидаз и т.д. (см. Krasavina, 2007). Единичные данные об изменении под влиянием СК транспорта ионов и мембранного потенциала (Glass, 1973, 1975; Gordon et al., 2002) предполагают, что одним из наиболее ранних эффектов СК может быть ее влияние на генерируемые в растениях электрические импульсы. В этом случае можно полагать участие лиганд-чувствительных ионных каналов.

**Цель исследования** – изучить характеристики местной биоэлектрической реакции листа на охлаждение и возможность влияния салициловой кислоты на параметры биоэлектрических реакций.

**Задачи исследования.** 1. Охарактеризовать электрическую реакцию листа на локальное охлаждение;

2. Изучить влияние блокаторов потенциал-зависимых и механочувствительных ионных каналов на генерацию местной БЭР;

3. Выявить возможность действия салициловой кислоты на местную биоэлектрическую реакцию растений;

4. Сравнить действие салициловой кислоты на местную реакцию с ее влиянием на потенциал действия, механизм генерации которого хорошо изучен.

**Научная новизна работы.** Впервые дана достаточно полная характеристика местной биоэлектрической реакции листа на кратковременное локальное охлаждение. В отличие от широко распространенной монотонной деполяризации показана индукция импульсной активности, не распространяющейся от точки воздействия. Применение блокаторов ионных каналов выявило участие кальциевых, хлорных и калиевых ионных каналов, а также  $H^+$ -АТФазы в генерации импульса. Обнаружено сходство ионных потоков, лежащих в основе местной реакции и потенциала действия. Впервые показано влияние салициловой кислоты на форму и параметры местной реакции и потенциала действия. Показано, что салициловая кислота в зависимости от концентрации может как стимулировать, так и ингибировать электрическую активность, что дает основание предполагать ее роль в регуляции электрической активности листа. Доказано, что действие салициловой кислоты специфично.

**Научно-практическая значимость работы.** Расширено представление об участии локальных изменений мембранных потенциалов в первичном ответе растительных тканей на стрессовое воздействие. Влияние известного стрессового гормона – салициловой кислоты – на параметры местной электрической реакции предполагает вовлеченность этой реакции в индукцию внутриклеточных физиологических защитных механизмов. Материалы диссертации могут быть использованы при чтении курсов лекций в университетах и сельскохозяйственных институтах. Результаты исследования предполагают возможность использования метода экстраклеточной регистрации местной БЭР листа в качестве тест-метода для сравнения различных по холодоустойчивости сортов и гибридов растений.

**Апробация работы.** Результаты диссертационной работы доложены на Съезде физиологов растений (Вологда, 2005), I (IX) Международной конференции ботаников (Санкт-Петербург, 2006), Международной конференции «Современная физиология растений: от молекул до экосистем» (Сыктывкар, 2007), на Годичном собрании общества физиологов растений России «Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений» (Екатеринбург, 2008), Научной конференции ТСХА (Москва, 2007), Международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2009), ежегодных молодежных конференциях ИФР РАН (Москва, 2007-2009).

**Публикации.** По материалам диссертационной работы опубликовано 11 научных работ, в том числе 4 статьи, одна из которых – в рецензируемом журнале.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 137 страницах машинописного текста, включая 11 таблиц и 27 рисунков. Список литературных источников включает 229\_наименований, из них 177 – на иностранном языке.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основным объектом исследования служили 14-17-дневные растения огурца (*Cucumis sativus* L.) – менее холодоустойчивый гибрид «Мазай» и более устойчивый гибрид «Емеля». В опытах с экстраклеточным измерением БЭР использовали растения, выращенные в почвенной культуре при температуре 22-24°C и освещении лампой ДРЛФ-400 в течение 16 часов в сутки (освещенность 5000 люкс). Для микроэлектродного измерения ПД использовали водоросль *Chara corallina* Klein ex Willd, которая росла на искусственной прудовой воде (ИПВ) при комнатной температуре и дневном освещении.

**Экстраклеточное отведение.** Участок диаметром 5 мм на нижней поверхности листовой пластинки охлаждали до 8-9°C с помощью охлаждающего столика ТОС-1 в течение 105 с. Такое воздействие не повреждало ткани и было полностью обратимым. Скорость охлаждения составляла около 8°C в минуту. После прекращения охлаждения температура постепенно восстанавливалась до исходного значения. Охлаждали участок листа в средней части листовой пластинки между жилками.

Регистрирующий хлорсеребряный электрод ЭВЛ-1М1 (Белоруссия) через переходную насадку с смоченным MES-буфером (рН 5.2) хлопковым фитильком подводили к верхней поверхности охлаждаемого участка листа, на который помещали небольшой кружок (диаметром около 5-7 мм) фильтровальной бумаги, смоченный или буферным раствором (контроль), или исследуемым раствором (опыт). Референтный электрод через солевой мостик контактировал с влажной почвой. Разность потенциалов между локально охлаждаемой частью листа и почвенным раствором регистрировали с помощью высокоомного рН-метра 5170 (Венгрия) и самопишущего двухкоординатного милливольтметра Н307/1 (Россия). Изменение температуры верхней поверхности листа регистрировали с помощью микротермистора конструкции В.Г. Карманова. Перед началом охлаждения растения с подведенными электродами находились в лаборатории около часа для стабилизации разности электрических потенциалов.

Участок листа в течение часа предобрабатывали растворами блокаторов ионных каналов или салициловой кислоты на MES-буфере (рН 5.2). В опытных вариантах эти растворы присутствовали на поверхности листа во время измерения или только во время предобработки, участки контрольных листьев предобрабатывали буфером. Контрольные и опытные измерения проводили или на одном и том же (с интервалом 1 ч) или на соседних листьях. Оба способа измерения давали сходные результаты.

**Нативность подвергнутых охлаждению листьев** оценивали по утечке электролитов из высечек в дистиллированную воду с использованием кондуктометра ОК-102 («Radeliks», Венгрия) с платиновым электродом. Определяли электропроводность дистиллированной воды после нахождения в ней высечек до и после кипячения. Утечку электролитов рассчитывали в процентах от полного выхода электролитов после кипячения.

**Внутриклеточное отведение** осуществляли с помощью стеклянных микроэлектродов с диаметром кончика 1-2 мкм, которые вводили в клетку с помощью микроманипулятора. Клетка находилась в кювете, заполненной искусственной прудовой водой. После стабилизации величины мембранного потенциала раствор в кювете заменяли на искусственную прудовую воду, содержащую исследуемые вещества. В качестве раздражителя использовали импульс электрического тока силой ~10 мкА и продолжительностью 150 мс.

Представленные в таблицах результаты – средние арифметические значения минимум из 3-х повторностей (как правило, 5-7) и их стандартные отклонения. Достоверность оценивали по *t*-критерию Стьюдента ( $P \leq 0.05$ ). На рисунках показаны типичные кривые.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Импульсная активность, генерируемая при локальном охлаждении

Начало снижения температуры можно было зарегистрировать через 4-5 с после включения термостолика. Несколько позднее – через 8-12 с – отмечали первые изменения разности потенциалов. За время охлаждения температура снижалась на 13-15°C. После выключения термостолика еще несколько секунд температура продолжала снижаться (до 9-10°C), затем начиналось восстановление исходной температуры (рис. 1).

В начале охлаждения наблюдали медленную фазу деполяризации (на несколько мВ), которая сменялась быстрой деполяризацией, достигающей 80-100 мВ. Продолжительность первой стадии деполяризации отмечена на рисунке 2б цифрой 1. В отличие от часто наблюдаемого при действии разных стимулов (солей, ингибиторов и др.) сохранения устойчивой деполяризации, в нашем случае деполяризация практически сразу сменялась реполяризацией. Реполяризация протекала с высокой скоростью, но не была полной, вскоре наблюдали генерацию еще одного импульса. Для второго импульса характерно отсутствие медленной стадии деполяризации, то есть сразу наблюдали деполяризацию с высокой скоростью. Часто амплитуда второго импульса была больше, чем первого. Как правило, регистрировали 2 импульса, однако их число колебалось от одного до трех. При этом импульсная активность не повторяла изменения температуры. Обе фазы первого импульса – и деполяризация, и реполяризация – проявлялись при продолжении снижения температуры листа. Формирование второго импульса начиналось еще до прекращения охлаждения (рис. 1).

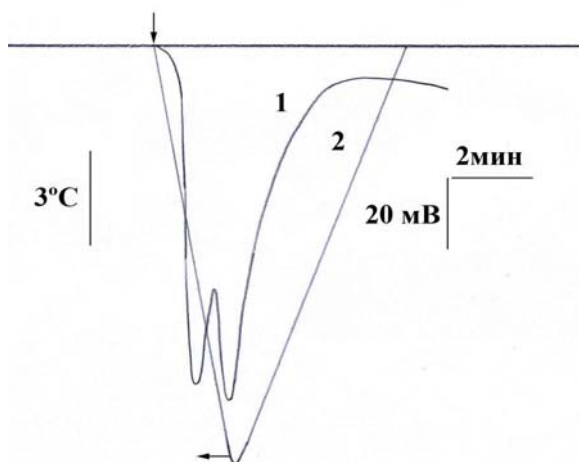


Рис.1. Изменение температуры верхней поверхности при локальном охлаждении участка нижней поверхности листа и типичная запись биоэлектрической реакции, регистрируемой на верхней поверхности листа в месте охлаждения (на всех рисунках стрелка, направленная вниз, – включение охлаждения; стрелка, направленная в сторону, – выключение).

1 – биоэлектрическая реакция на охлаждение;

2 – ход изменения температуры.

Восстановление температуры после прекращения охлаждения продолжалось около 4 минут. Восстановление исходной разности потенциалов было более длительным – 12-15 минут. Этот процесс можно разделить на 2 фазы: быструю, продолжительностью 30-50 с, и длительную – 10-15 мин. Восстановление исходной разности потенциалов в конце двух фаз реполяризации, как правило, было практически полным.

На рисунке 2 представлены основные параметры БЭР:

- амплитуда - основной параметр, характеризующий реакцию (вертикальная пунктирная линия на рис. 2б);
- первая (медленная) фаза деполяризации (цифра 1 на рис. 2а) и ее продолжительность (цифра 1 на рис. 2б);
- вторая (быстрая) фаза деполяризации (цифра 2 на рис. 2а);
- быстрая стадия восстановления РЭП (цифра 2 на рис. 2б), длящаяся 30-50 с;
- отличие РЭП, достигнутой после первой фазы реполяризации, от исходной (цифра 3 на рис. 2б).

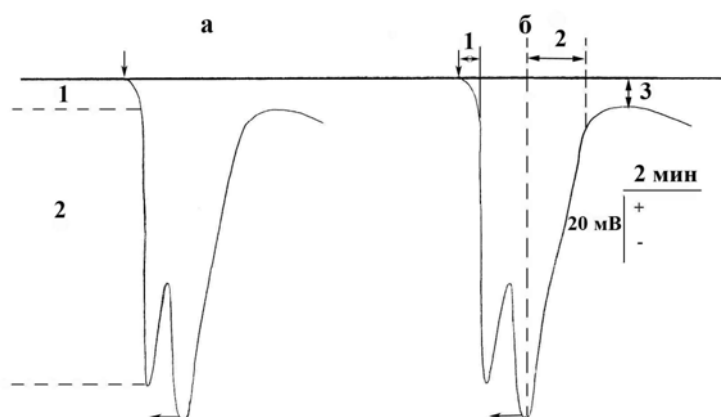


Рис. 2. Основные параметры БЭР листа огурца (объяснения в тексте).

Для выявления природы БЭР прежде всего необходимо определить ее возможность распространяться от места воздействия. Типичная БЭР генерировалась в месте охлаждения, где изменение температуры составляло  $14^{\circ}\text{C}$  (рис. 3). На расстоянии 1.5 см, где изменение температуры составляло  $6^{\circ}\text{C}$ , примерно 2 минуты наблюдали медленную деполяризацию, которая сменялась генерацией импульса с меньшей амплитудой и измененной формой. Кроме того, здесь всегда регистрировали только один импульс, в то время как в месте локального охлаждения регистрировали, как правило, 2 импульса. На расстоянии 3 см от места охлаждения, где максимальное снижение температуры не превышало  $1^{\circ}\text{C}$ , изменения исходной разности потенциалов не наблюдали. На основании этих данных можно говорить об отсутствии распространения импульса. Генерацию импульса на расстоянии 1.5 см от места охлаждения можно объяснить снижением температуры в этой области (рис. 3).

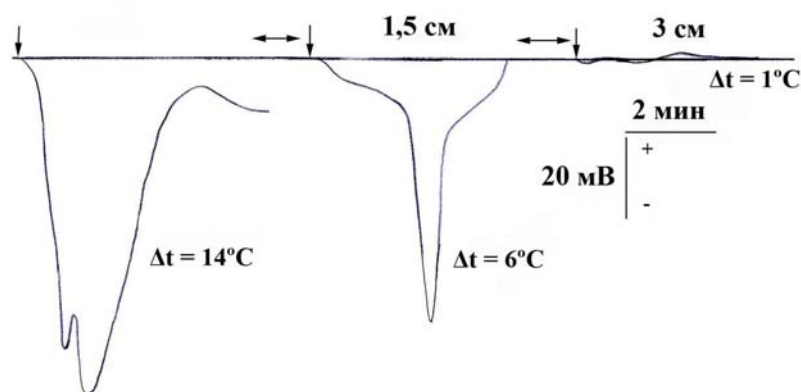


Рис. 3. Форма БЭР, регистрируемых на различном расстоянии от места охлаждения

При повторном охлаждении одного и того же участка листа практически одинаковую по форме реакцию можно было регистрировать через 30 мин. При последующих охлаждениях могла изменяться амплитуда реакции – регистрировали не только ее снижение, но часто и увеличение.

В разных группах растений, особенно при работе в разные времена года, форма вызываемых охлаждением биоэлектрических импульсов могла варьировать – менялось соотношение между двумя импульсами: степень их развития, продолжительность, амплитуда. Поэтому при изучении действия ингибиторов и СК сравнивали однотипные группы растений, выращенные в одно время.

**Сравнение БЭР разных участков листа и листьев разного возраста.** При охлаждении разных участков листа (у края листовой пластинки, в середине листа или у черешка) не обнаружили различий в параметрах регистрируемых импульсов. Но реакция листьев разного возраста заметно отличалась (табл. 1). Донорные листья (5-6-й лист от апекса побега) были более отзывчивыми на охлаждение. Это проявлялось в более быстром реагировании на изменение температуры. Первое изменение исходной разности потенциалов у донорных листьев наблюдали уже через 8 секунд, в то время как у акцепторных (2-й лист от апекса) – через 12 секунд. Амплитуда импульсов, генерируемых в донорных листьях, была значительно выше, чем в акцепторных. В то же время количество импульсов и их форма не отличались.

Таблица 1. Сравнение параметров БЭР донорного и акцепторного листьев огурца.

Параметры	Донорный лист	Акцепторный лист
Время начала реакции, с	8,5±1,0	12±1,5
Амплитуда, мВ	113±7,0	85±3,0
Скорость деполяризации, мВ/с	2,7±0,1	2,0±0,2
Количество импульсов	1,8	1,7

*Примечание.* Представлены средние значения из 5 измерений и их стандартные отклонения.

Различия между листьями разного возраста наблюдали и при измерении выхода электролитов из листовых высечек после их охлаждения до 1°C в течение 1 часа (табл. 2). Бóльшая утечка электролитов из высечек донорных листьев говорит об их бóльшей чувствительности к низкотемпературному стрессу.

Таким образом, судя по характеристикам БЭР и по выходу электролитов из клеток, донорные листья огурца оказались более чувствительными к охлаждению. Поэтому их использовали в дальнейших экспериментах.

Таблица 2. Выход электролитов из дисков, выделенных из донорных и акцепторных листьев

Листья разного возраста	Выход электролитов за 30 мин., %
Донорный лист	5,1±0,2 (6)
Акцепторный лист	10,4±0,7 (9)

*Примечание.* Представлены средние значения и их стандартные отклонения. В скобках дано число опытов. В каждом опыте по 7 дисков из 3-х листьев.



# Ионные механизмы местной реакции

## Участие Са-каналов

Пусковым процессом многих ответных реакций на воздействие внешних и внутренних стимулов является поступление в клетки кальция из апопласта или внутриклеточных депо, которое вызывает временное повышение концентрации этого катиона в цитоплазме. Для изучения влияния этого процесса на генерацию местной биоэлектрической реакции использовали ингибиторы, которые обычно применяют для выявления роли Са-каналов – лантан, гадолиний, верапамил, рутений красный (Медведев, 2005).

**Лантан ( $\text{La}^{3+}$ )** – наименее специфичный блокатор  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, конкурирующий с  $\text{Ca}^{2+}$  за  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающие места (Берестовский, 2001). Лантан в большей степени, чем другие ингибиторы влиял на форму и параметры биоэлектрической реакции (рис. 4, табл. 3). В концентрации 0.1 мМ он заметно тормозил обе стадии реакции – и деполяризацию, и реполяризацию, поэтому обычно формировался только один импульс. Заметно снижалась его амплитуда. В концентрации 5 мМ лантан еще сильнее подавлял импульсную активность. Резко, более чем вдвое, снижалась амплитуда БЭР. Сильно тормозилась первая стадия деполяризации, в результате чего быструю стадию деполяризации не наблюдали. Реполяризация также оказывалась затянутой.

**Гадолиний ( $\text{Gd}^{3+}$ )** – низкоселективный блокатор (Demidchik, 2006), тем не менее он обычно используется для преимущественного ингибирования активируемых деполяризацией механочувствительных  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов (Krol, Trebacz, 1999). Этот ингибитор действовал слабее, чем лантан и в более высоких концентрациях (рис. 5, табл. 3). В концентрации 1 мМ он практически не изменял форму импульса, лишь немного замедляя первую стадию деполяризации. В концентрации 10 мМ замедлялась общая деполяризация, особенно ее начальная стадия, и снижалась амплитуда БЭР. Тормозилась генерация второго импульса и увеличивалась продолжительность реполяризации.

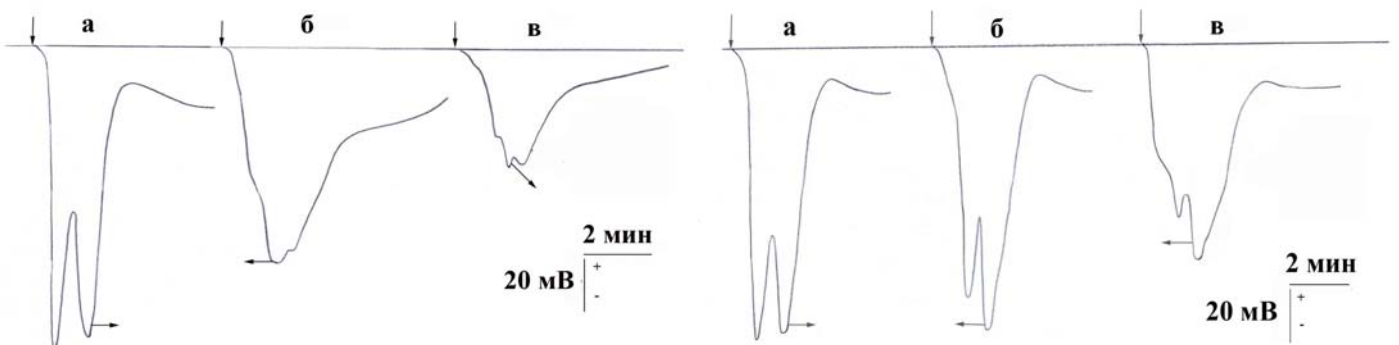


Рис 4. Влияние хлористого лантана на форму БЭР, генерируемых в листе огурца в ответ на локальное охлаждение  
а - контроль, б – 0.1 мМ, в – 5 мМ  $\text{LaCl}_3$

Рис 5. Влияние хлористого гадолиния на форму БЭР, генерируемых в листе огурца в ответ на локальное охлаждение:  
а – контроль, б – 1 мМ, в – 10 мМ  $\text{GdCl}_3$

**Рутений красный** часто используется для ингибирования выхода  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо (Subbaiah et al., 1994). Так же как и гадолиний, рутений красный в концентрации 1 мМ значительно замедлял начальную стадию деполяризации, однако не влиял на быструю фазу деполяризации и форму реакции (рис. 6, табл. 3). Не происходило также существенного снижения амплитуды. Можно отметить, что обработка рутением красным незначительно тормозила ход реполяризации. В более высокой концентрации (10 мМ) рутений красный значительно снижал амплитуду БЭР (сравнимо с действием лантана в концентрации 10 мМ), резко затормаживал деполяризацию и увеличивал продолжительность реполяризации.

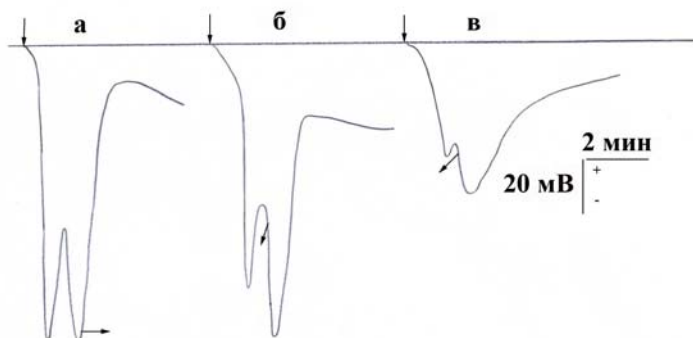


Рис. 6. Влияние рутения красного на форму БЭР, генерируемых в листе огурца на локальное охлаждение  
а – контроль, б – 1 мМ, в – 10 мМ рутений красный

**Верапамил** – известный антагонист кальциевых каналов, блокирующий вход  $\text{Ca}$  в клетки (Demidchik, 2006). В наших опытах действие верапамила было подобно действию других блокаторов кальциевых каналов в такой же концентрации – гадолиния и рутения красного (рис. 8, табл. 3). При концентрации 0.5 мМ наблюдали лишь незначительное замедление деполяризации, в то время как амплитуда и продолжительность реполяризации не отличались от контрольных значений. Более высокая концентрация верапамила (1 мМ) еще больше увеличивала продолжительность начальной деполяризации, незначительно снижая амплитуду и совсем не влияя на продолжительность реполяризации (рис. 8, табл. 3). Так же как при действии гадолиния и рутения, в концентрациях до 1 мМ верапамила не происходило подавления генерации обоих импульсов.

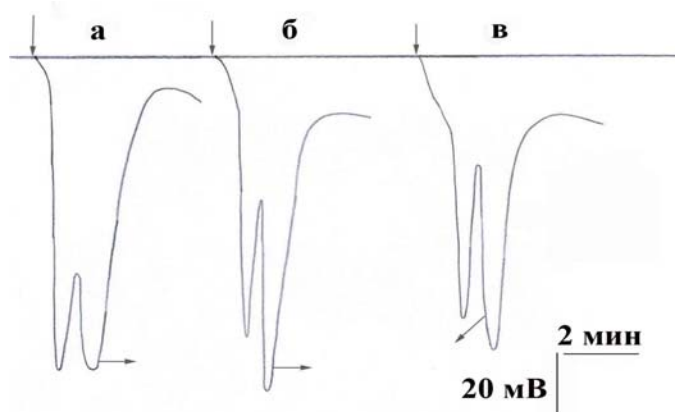


Рис. 7. Влияние верапамила на форму БЭР листа огурца:  
а – контроль, б – 0.5 мМ, в – 1 мМ верапамил

Таким образом, все блокаторы кальциевых каналов в концентрации 1 мМ тормозили начальную деполяризацию, не влияя заметно на скорость быстрой стадии деполяризации. Это свидетельствует об участии поступления  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазму в

начале БЭР.  $\text{Ca}^{2+}$  может поступать как из апопласта (эффект лантана, гадолиния, верапамила), так и из внутриклеточных хранилищ (действие рутения красного). Действие лантана проявлялось уже в концентрации 0.1 мМ, при которой тормозились не только обе стадии деполяризации, но и процесс реполяризации, что может быть следствием его неспецифического действия. В высоких концентрациях все агенты изменяли форму и продолжительность ответной реакции – замедлялись процессы де- и реполяризации, что приводило к снижению амплитуды реакции. Эти данные делают очевидной роль кальция в формировании местной реакции, прежде всего на стадии первичной деполяризации.

### Роль анионных каналов в генерации местной реакции

В качестве блокатора анионных каналов использовали СИТС (4-ацетамид-4'-изотиоцианат-2,2'-стилбендисульфоновая кислота). В отличие от ингибиторов кальциевых каналов, СИТС не оказывал влияния на начальную стадию деполяризации. В то же время в концентрации 0.5 мМ СИТС заметно увеличивал продолжительность второй, быстрой стадии деполяризации, не влияя на амплитуду и продолжительность реполяризации. В более высокой концентрации (5 мМ) СИТС полностью подавлял импульсную активность (рис. 8).

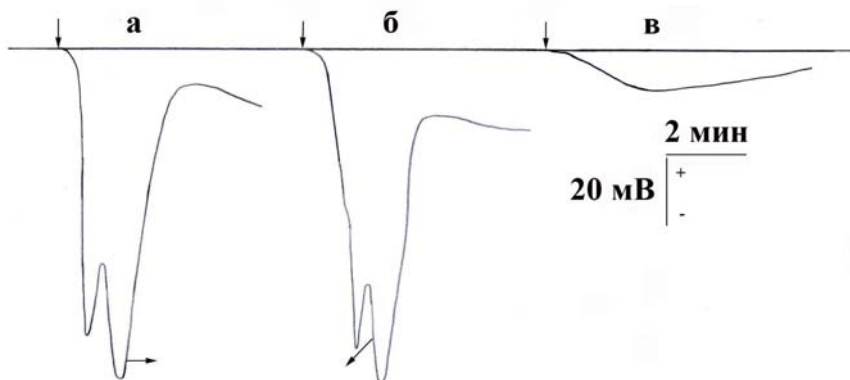


Рис. 8. Влияние СИТС на форму БЭР листа огурца, генерируемой в ответ на локальное охлаждение: *а* – контроль, *б* – 0.5 мМ, *в* – 5 мМ СИТС

Можно заключить, что в формировании местной реакции участвуют не только  $\text{Ca}^{2+}$ , но и анионы. Однако если кальций запускает формирование импульса, то анионы принимают участие в его дальнейшей генерации.

### Роль калиевых каналов в генерации местной реакции

При генерации ПД в формировании стадии реполяризации основная роль принадлежит калию. В конце стадии деполяризации в результате резкого снижения мембранного потенциала (МП) ионы калия по электрохимическому градиенту устремляются из цитоплазмы, тем самым реполяризуя плазмалемму. Для изучения роли калиевых каналов в формировании стадии реполяризации во время местной БЭР использовали блокаторы калиевых каналов – тетраэтиламмоний (ТЭА) и хинин сульфат.

**Тетраэтиламмоний** несколько затормаживал начальную стадию реполяризации (рис. 9). Наиболее заметным было снижение степени восстановления исходной РЭП.

Если у контрольных растений после первой стадии реполяризации исходная разность потенциалов восстанавливалась в значительной степени, то в присутствии ТЭА этого не наблюдали. ТЭА не изменял амплитуду местной реакции в концентрации 1 мМ, увеличивая в концентрации 10 мМ, увеличивал продолжительность реполяризации.

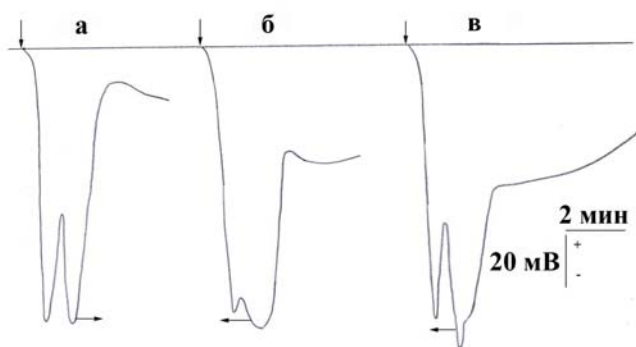


Рис. 9. Влияние ТЭА на форму БЭР листа огурца, генерируемых в ответ на локальное охлаждение: *а* – контроль, *б* – 1 мМ, *в* – 10 мМ ТЭА

**Хинин сульфат** – блокатор низкоселективных, активируемых деполяризацией  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительных  $\text{K}^+$ -каналов. Его действие на БЭР было сильнее (рис. 10), чем действие ТЭА. В концентрации 0.1 мМ хинин сульфат значительно замедлял прохождение начального этапа стадии деполяризации, хотя амплитуда местной реакции не снижалась. Наиболее заметное действие хинин сульфата проявлялось на стадии реполяризации (рис. 10). В концентрации 0.1 мМ хинин сульфат сильно ингибировал, а в концентрации 1 мМ полностью снимал генерацию второго импульса.

При действии 1 мМ хинин сульфата тормозилась не только скорость начальной деполяризации, но и общий процесс деполяризации, и снижалась амплитуда БЭР.

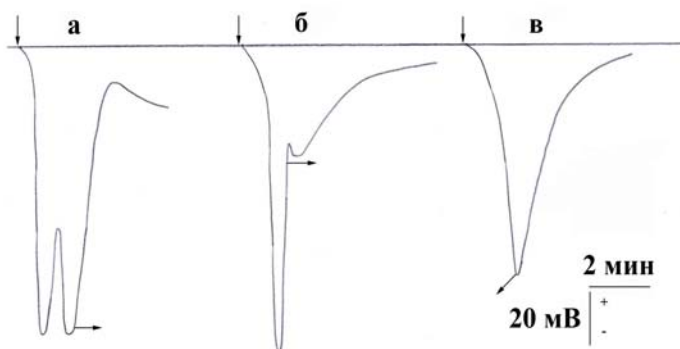


Рис. 10. Влияние хинин сульфата на форму БЭР листа огурца: *а* – контроль, *б* – 0.1 мМ, *в* – 1 мМ хинин сульфат

Таким образом, если тетраэтиламмоний оказывал влияние только на стадию реполяризации, то действие хинин сульфата было более комплексным. Помимо торможения реполяризации хинин сульфат влиял на амплитуду и продолжительность деполяризации. Кроме того, в его присутствии образовывался только один полный импульс.

### Влияние предобработки листьев хлористым гадолинием и ТЭА

Если обработку  $\text{Gd}^{3+}$  и ТЭА проводили только до опыта (рис 11), а во время измерений ингибиторы не присутствовали на поверхности листа, характер БЭР не отличался от регистрируемых в описанных выше опытах, в которых обработку  $\text{Gd}^{3+}$  и ТЭА проводили и во время измерений. По-видимому, при предобработке ингибиторами в течение 1 часа в листе достигалась концентрация, достаточная для

воздействия на генерацию импульсов. На примере гадолиния показана двойственность его действия – при концентрации 1 мМ амплитуда ответа несколько повышалась, а 10 мМ  $Gd^{3+}$  заметно снижал амплитуду.

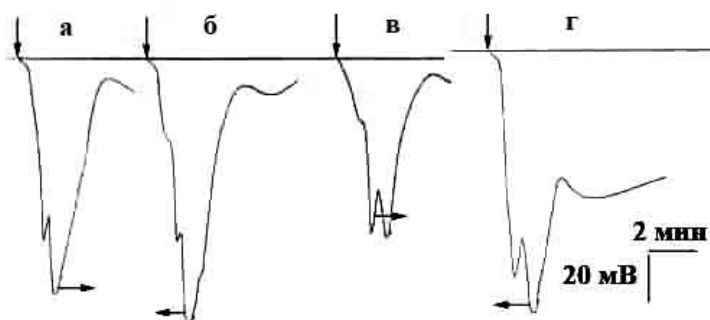


Рис. 11. Влияние предобработки гадолинием и тетраэтиламмонием на форму БЭР: а – контроль, б –  $Gd^{3+}$  1 мМ, в –  $Gd^{3+}$  10 мМ, г – ТЭА 10 мМ

### Возможная роль $H^+$ -АТФазы в генерации местной реакции

В последнее время обсуждается возможность участия  $H^+$ -АТФазы в электрическом ответе на действие различных стимулов (Bulychev, Vredenberg, 1995; Воденеев, 2006). Известно, что мембранный потенциал состоит из двух компонент: диффузионной, определяемой электрохимическим градиентом диффундирующих через клеточную мембрану ионов, и метаболической, определяемой работой  $H^+$ -АТФазы. Значительный вклад метаболической составляющей в величину мембранного потенциала предполагает вероятность участия протонного насоса и в генерации электрического ответа на раздражения. Для оценки роли  $H^+$ -АТФазы в формировании местной реакции использовали ингибиторы протонного насоса – ДЦКД и ортованадат.

ДЦКД (N,N'-дициклогексилкарбодиимид) – неспецифичный ингибитор АТФаз. В концентрации 0.1 мМ ДЦКД замедлял стадию реполяризации (рис. 12), преимущественно вторую фазу. Стадия деполяризации и амплитуда БЭР при этом практически не изменялись. В концентрации 1 мМ ДЦКД сильно ингибировал импульсную активность.

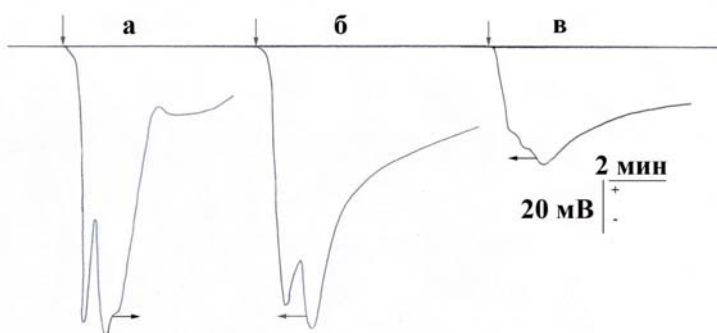


Рис. 12. Влияние ДЦКД на БЭР листа огурца: а – контроль, б – 0.1 мМ, в – 1 мМ ДЦКД.

**Ортованадат** – специфичный ингибитор  $H^+$ -АТФазы плазматической мембраны. Ортованадат натрия в концентрациях 0.1 и 1 мМ действовал практически одинаково. При обеих концентрациях снижалась скорость деполяризации, что приводило к уменьшению амплитуды, при этом, как правило, генерировался только один импульс.

Ортованадат также замедлял по сравнению с контролем процесс реполяризации и изменял форму кривой (рис. 13).

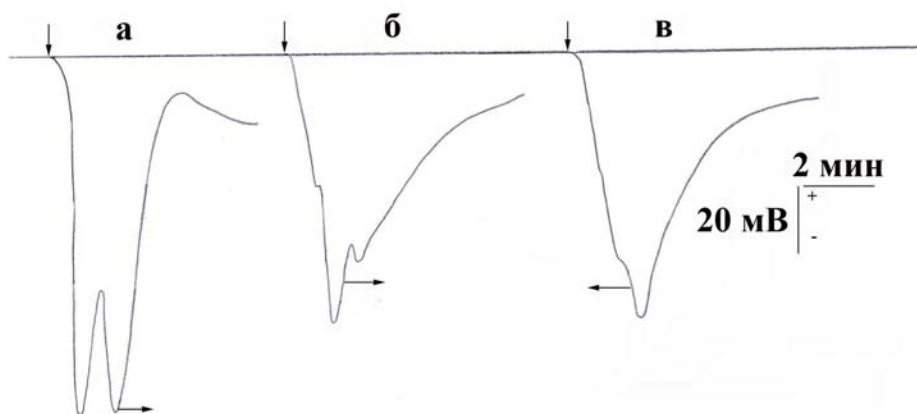


Рис. 13. Влияние ортованадата натрия на форму БЭР, регистрируемую в листе огурца при локальном охлаждении: *а* – контроль, *б* – 0.1 мМ, *в* – 1 мМ

В наших экспериментах и неспецифичный ингибитор  $H^+$ -АТФаз (ДЦКД), и специфичный ингибитор (ортованадат) оказывали влияние на местную реакцию. Общее в действии этих ингибиторов – замедление реполяризации клеточной мембраны.

Таким образом, результаты ингибиторного анализа предполагают, что начальным этапом местного ответа на снижение температуры является активация  $Ca^{2+}$ -каналов как на плазмалемме, так и на эндомембранах. Активация анионных каналов усиливает вызванную кальцием деполяризацию, а в реполяризации участвуют  $K^+$ -каналы. Наши данные свидетельствуют также о том, что функционирование  $H^+$ -насоса, по-видимому, важно на всем протяжении импульсной активности БЭР.

Влияние блокаторов ионных каналов на параметры БЭР суммированы в табл.3.

### **Влияние салициловой кислоты на местную БЭР и ПД**

Помимо механочувствительных и потенциалзависимых каналов, на плазматической мембране присутствуют и лиганд-чувствительные каналы, активность которых зависит от действия на них какого-либо активатора – лиганда. Возможно, что салициловая кислота может выступать в качестве одного из лигандов. Такое предположение основывается на ее влиянии на ионные потоки через плазматическую мембрану и на присутствии в растительных клетках связывающего салициловую кислоту белка.

В этой серии опытов участок листа в течение 1 часа предобрабатывали салициловой кислотой в нескольких концентрациях, т.е. изучали последствие СК на параметры БЭР. Действие салициловой кислоты на местную БЭР зависело от ее концентрации (рис. 14). Активация при 0.1 мМ СК выражалась в увеличении скорости деполяризации, что в данном случае приводило к увеличению амплитуды. Высокая концентрации СК (5 мМ) вызывала торможение БЭР – значительно снижалась амплитуда импульсов.

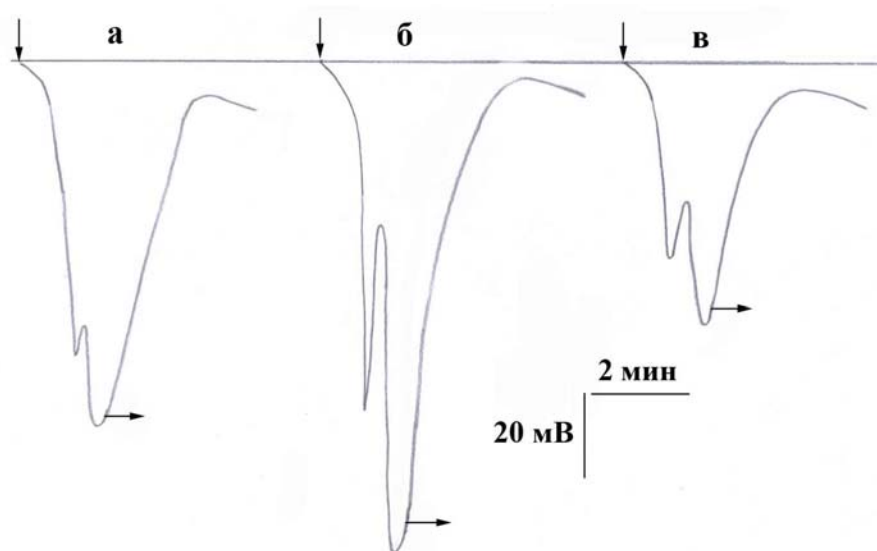


Рис. 14. Действие предобработки салициловой кислотой (рН 5.2) на местную БЭР, генерируемую в листе огурца: а – контроль, б – СК 0.1 мМ, в – СК 5 мМ

**Влияние салициловой кислоты на ПД, генерируемые *Chara corallina*.** Ионные механизмы ПД для харовых водорослей хорошо изучены, что позволяет интерпретировать изменения в форме и параметрах ПД. Как видно на рис. 15, салициловая кислота в концентрации 0.1 мМ влияла на параметры генерируемого потенциала действия – амплитуда ПД изменялась незначительно, но сильно увеличивалась продолжительность импульса. Похожее, но более сильное увеличение продолжительности наблюдали при действии ТЭА (рис. 16), что предполагает возможность влияния СК на выход  $K^+$  из клетки. Торможение генерации импульса при высокой концентрации СК (1 мМ) может свидетельствовать о неспецифичном ингибировании ПД у хары (рис. 15).

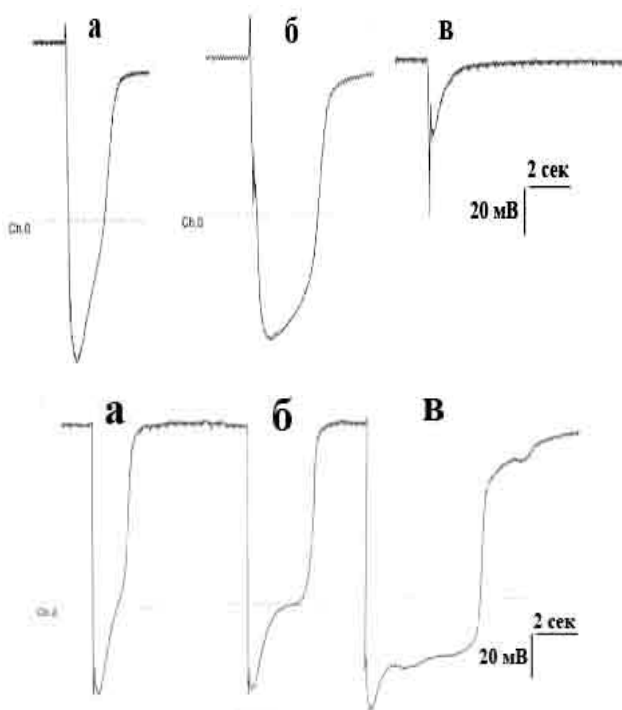


Рис. 15. Действие СК (рН 5.2) на ПД *Chara corallina*.  
а – контроль; б – СК 0.1 мМ; в – СК 1 мМ.

Рис.16. Влияние ТЭА на ПД *Chara corallina*.  
а – контроль; б – ТЭА 5 мМ; в – ТЭА 10 мМ

**Специфичность действия СК.** Действие СК на параметры местной реакции и потенциала действия можно было объяснить ее слабокислотными свойствами. Для проверки возможного действия СК как слабой кислоты использовали предобработку участка листа другой слабой кислотой – ацетатом Na. Как видно из рис. 17, ацетат натрия не влиял значительно на амплитуду и продолжительность стадий де- и реполяризации генерируемых в листе огурца импульсов.

Ответная реакция не изменялась и при предобработке неактивным аналогом СК – 4-оксибензойной кислотой, – которая отличается от СК различным положением ОН-группы в бензольном кольце (у 2-го атома углерода у СК, у 4-го атома у 4-оксибензойной кислоты). На рисунке 17 представлены записи БЭР листьев контрольных растений и растений, предобработанных 4-оксибензойной кислотой. Существенных различий между контрольной записью БЭР и реакцией в листьях растений, предобработанных неактивным аналогом СК, не обнаружили.

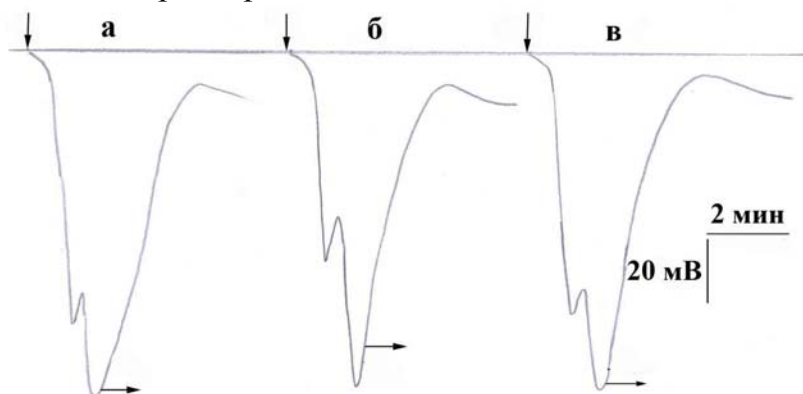


Рис. 17. БЭР листа огурца, предобработанного 0.1 мМ ацетатом Na и 0.1 мМ 4-оксибензойной кислотой: а – контроль; б – ацетат Na; в – 4-оксибензойная кислота

Специфичность действия салициловой кислоты проверяли при сравнении ее влияния и влияния 4-оксибензойной кислоты на генерацию ПД у *Chara corallina* (рис. 18). Так же как и при изучении действия этого аналога СК на местную реакцию, генерируемые в их присутствии ПД практически не различались по форме и параметрам БЭР. Таким образом, можно говорить о специфичности действия СК.



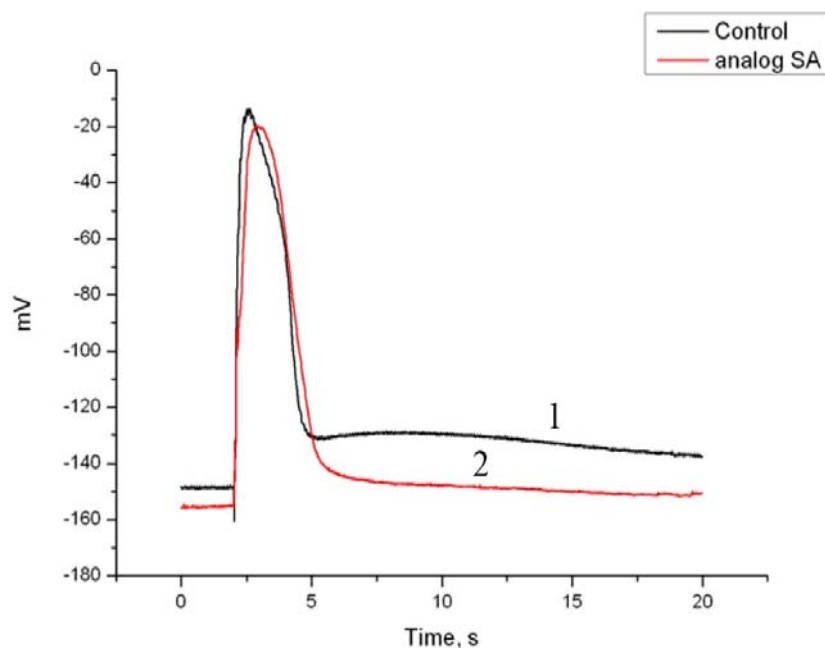


Рис. 18. Влияние неактивного аналога 0,1 мМ СК (4-оксибензойной кислоты) на ПД: 1– контроль; 2 – аналог СК

Таблица 3. Влияние блокаторов ионных каналов на параметры БЭР, генерируемые в листе огурца в ответ на локальное охлаждение

Ингибитор	Повторности	Концентрация, мМ	Число пиков в одной БЭР	Начало быстрой деполяризации, с	Амплитуда, мВ	Продолжительность реполяризации, с
Контроль	14		2, редко 3	27±1	118±2	34±1
Лантан	5	0,1	1-2	38±2	93±7	-
Лантан	6	1	1, редко 2	57±4	76±4	59±5
Лантан	5	5	1, 2 менее четко	55±5	46±4	60±2
Гадолиний	7	1	1-2, второй слабо	40±2	120±3	40±2
Гадолиний	6	10	1-2, второй слабо	50±1	72±4	65±1
Рутений красный	7	1	2, редко 1	45±3	116±2	34±3
Рутений красный	6	10	нет	-	50±5	-
Верапамил	5	0,05	2	30±1	116±1	32±2
Верапамил	7	0,5	2	44±1	122±3	36±2
Верапамил	7	1	2	49±2	106±3	34±3

ТЭА	8	1	2, редко 3	27±1	114±2	34±2
ТЭА	5	10	2, редко 3	28±2	130±2	53±2
Хинин	6	0,1	1	70±6	121±4	55±4
Хинин	6	1	1	-	79±2	82±2
ДЦКД	7	0,1	2	29±1	107±2	59±3
ДЦКД	6	1	2	-	40±4	-
Ортованадат	5	0,1	1, второй слабо	31±1	93±4	60±3
Ортованадат	6	1	1, второй слабо	41±1	92±3	70±3

*Примечание.* Число растений в каждом опыте не менее 3, на каждом растении для регистрации импульсов брали в среднем по 2 листа. Повторности – количество листьев, на которых проводили измерения

### Сравнение параметров БЭР у растений, различающихся по чувствительности к холоду

Использовали 2 гибрида огурца: более чувствительный к охлаждению «Мазай» и менее чувствительный «Емеля». Выявили некоторые различия БЭР между этими гибридами. У холодочувствительного гибрида «Мазай» амплитуда БЭР была значительно больше, чем у холодоустойчивого гибрида «Емеля». Таким образом, можно говорить о наличии различий в параметрах БЭР между гибридами огурца, различающимися по чувствительности к охлаждению.

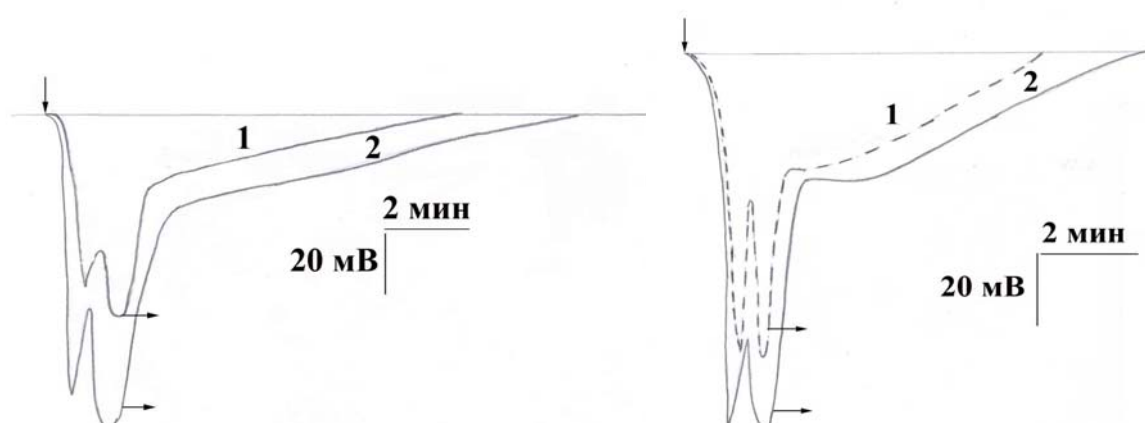


Рис. 19. Действие СК на местную реакцию при охлаждении менее чувствительного к холоду гибрида «Емеля» (слева) и более чувствительного гибрида «Мазай» (справа): 1 – растение, обработанное 5 мМ СК; 2 – контроль

После предобработки 5 мМ салициловой кислотой у обоих гибридов значительно снижались по сравнению с необработанными растениями амплитуда и скорость деполяризации (рис. 19). Изменения происходили в направлении, свойственном более устойчивым гибридам. Это позволяет предполагать, что предобработка высокими концентрациями СК может способствовать снижению чувствительности растений к холоду.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на схожесть форм БЭР и ПД, ряд признаков позволяют отнести регистрируемую нами БЭР к местным изменениям потенциалов. Так, в отличие от ПД, импульсы БЭР не распространялись от места воздействия, их форма зависела от степени и продолжительности охлаждения, не выявлялся рефрактерный период – следующий импульс начинал генерироваться до того, как полностью развился предыдущий, образуя «сдвоенный» или даже «утроенный» импульс. В то же время механизмы генерации местной БЭР схожи с механизмами генерации ПД. В обоих случаях происходило последовательное изменение проводимости ионных каналов. На первой стадии деполяризации активировались потенциал-зависимые и, возможно, механочувствительные  $Ca^{2+}$ -каналы на плазмалемме и эндомембранах. Вторая, более быстрая стадия деполяризации осуществлялась за счет активации выхода анионов из клетки. Действие ингибиторов  $H^+$ -АТФазы – ДЦКД и, особенно, ортованадата – на параметры местной электрической реакции позволяет предположить участие этого фермента как на стадии деполяризации, так и во время реполяризации. При сходстве механизмов генерации остается неясным, что делает БЭР неспособной распространяться за пределы действия раздражителя. Возможно, что порог возбудимости клеток мезофилла слишком высок. Кроме того, раздражение наносили вдалеке от крупных проводящих пучков, оно могло распространяться по плазмодесмам и мельчайшим жилкам, электрическое сопряжение которых недостаточно для быстрого распространения импульсов.

Влияние СК на параметры БЭР предполагает участие лиганд-чувствительных ионных каналов. Сравнивая действие СК с действием различных ингибиторов, можно предположить, что СК влияет на активность кальциевых и калиевых каналов. Параметры БЭР под влиянием СК изменялись в направлении, свойственном менее чувствительному к холоду гибриду, что согласуется с ее ролью в защитных реакциях растений.

Несмотря на активное обсуждение физиологической роли ПД, ряд его свойств не предполагает специфичности вызываемых им реакций. Это обусловлено его основным свойством – генерированием по закону «все или ничего». По определению, форма ПД не зависит ни от природы, ни от силы раздражителя. Таким образом, вне зависимости от свойств раздражителя при достижении пороговых значений мембранного потенциала формируется импульс стандартной формы. Тем самым, распространяясь по растению, ПД несет информацию лишь о наличии раздражителя, не оповещая ни о силе раздражителя, ни о его природе. Вероятно, этим объясняется множественные изменения при генерации ПД физиологических процессов в клетке – дыхания, фотосинтеза, транспорта веществ и т.д. Активируются, по-видимому, неспецифические защитные реакции, а ПД является сигналом SOS. В отличие от ПД, местная реакция зависит от природы раздражителя и от силы стимула, в ее генерации участвуют многие механизмы. Это позволяет формировать более специфичный ответ, затрагивающий, возможно, большее количество внутриклеточных процессов.

## ВЫВОДЫ

1. Местная биоэлектрическая реакция на снижение температуры имеет импульсную форму и не распространяется по листу на заметные расстояния от места воздействия;

2. Используя блокаторы ионных каналов, показали, что в основе генерации местной БЭР лежат изменения проводимости различных ионных каналов. Начальная медленная деполяризация связана с активацией  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов как на плазмалемме, так и на эндомембранах. Следующая за ней фаза быстрой деполяризации связана с активацией анионных каналов. Фаза реполяризации определяется повышением проводимости калиевых каналов;

3. В генерации местной электрической реакции участвуют потенциал-зависимые, механо-чувствительные и предположительно лиганд-чувствительные ионные каналы;

4.  $\text{H}^+$ -АТФаза участвует в формировании местной реакции на стадии реполяризации и, возможно, деполяризации;

5. Салициловая кислота влияет на параметры как местной реакции, так и потенциала действия, увеличивая амплитуду местной реакции листа и продолжительность ПД в клетках хары. Действие салициловой кислоты специфично: ни слабая кислота (ацетат), ни неактивный аналог салициловой кислоты (4-оксибензойная кислота) не изменяли заметно параметров биоэлектрической реакции;

6. Разные по чувствительности к холоду гибриды огурца различались по параметрам местной реакции на охлаждение. Это допускает возможность использования местной реакции для оценки устойчивости растений.

## Публикации по материалам диссертации

1. **Прудников Г.А., Паничкин Л.А., Бурмистрова Н.А., Красавина М.С.** (2005) Электрофизиологическая реакция листьев на локальное охлаждение как показатель устойчивости растений к низкотемпературному стрессу. В сб. *Международная конференция «Физиологические и молекулярно-генетические аспекты сохранения биоразнообразия»*. Вологда, с. 145.

2. **Паничкин Л.А., Красавина М.С., Прудников Г.А.** (2006) Электрофизиологическая диагностика устойчивости и функционального состояния растения. *Доклады ТСХА*, **278**, 84-89.

3. **Прудников Г.А.** (2006) Устойчивость к низкотемпературному стрессу растений табака. В сб. *Материалы I (IX) Международной конференции ботаников*. Санкт-Петербург, с. 188.

4. **Прудников Г.А., Паничкин Л.А., Красавина М.С.** (2007) Влияние салициловой кислоты на биоэлектрическую реакцию листа при локальном охлаждении. *Доклады ТСХА*, **279**, 39-43.

5. **Красавина М.С., Прудников Г.А., Паничкин Л.А.** (2007) Влияние салициловой кислоты на биоэлектрические потенциалы листа огурца. В сб.: *Труды Международной научно-практической конференции «Агротехнологии XXI века»*. Москва, с. 58-61.

6. **Паничкин Л.А., Красавина М.С., Прудников Г.А.** (2007) Электрофизиологическая реакция листа огурца на локальные холодные стрессы. В

сб.: *Современная физиология растений: от молекул до экосистем*. Ч. 2. Сыктывкар, с. 313.

7. **Прудников Г.А., Паничкин Л. А., Красавина М. С.** (2008) Некоторые характеристики биоэлектрической реакции листа огурца на локальное охлаждение. В сб.: *Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений*. Екатеринбург, с. 46-347.

8. **Прудников Г.А., Красавина М.С., Паничкин Л.А., Бурмистрова Н.А.** (2009) Возможно ли взаимодействие салицилат-зависимой и электрической сигнальных систем растений. В сб.: *Рецепция и внутриклеточная сигнализация*. Под ред. Зинченко В.П. и др., Пущино, с. 689-694.

9. **Красавина М.С., Бурмистрова Н.А., Прудников Г.А., Паничкин Л.А.** (2009) Возможные пути влияния салициловой кислоты на холодоустойчивость растений. В сб.: *Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях Крайнего Севера*. Апатиты, с 179.

10. **Паничкин Л.А. Прудников Г.А. Красавина М.С.** (2009) Усовершенствование метода электрофизиологической диагностики холодоустойчивости растений. *Известия ТСХА*, 4, 133-137.

11. **Прудников Г.А., Паничкин Л. А., Красавина М. С.** (2010) Влияние блокаторов ионных каналов и  $H^+$ -АТФазы на генерацию местной электрической реакции в листе огурца. *Физиология растений*, 57.